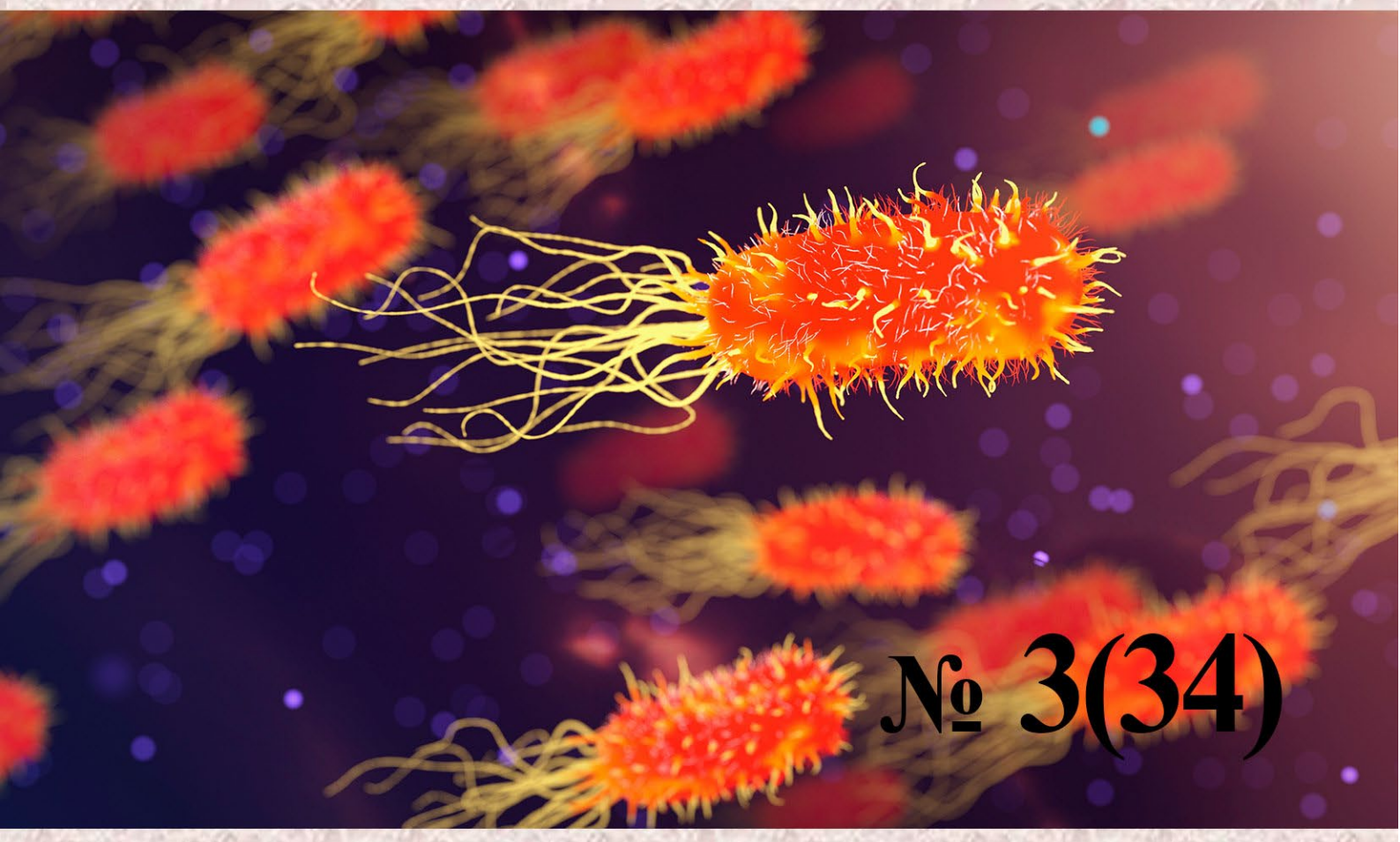
16+

ISSN 2304-4691

Актуальная биотехнология



№ 3(34)

2020

ISSN 2304-4691

Основан в 2012г.
г. Воронеж

Актуальная биотехнология

№ 3 (34)

2020

16+

Учредитель ООО «Биоактуаль»

Главный редактор
д.б.н., профессор О.С. Корнеева

Редакционный совет
д.б.н., профессор Ф.К. Алимова
д.т.н., профессор В.В. Бирюков
д.т.н., профессор Л.А. Иванова
д.б.н., профессор Л.П. Лазурина
д.б.н., профессор Е.Г. Новосёлова
д.х.н., профессор Т.В. Овчинникова
д.т.н., профессор А.Н. Остриков
д.б.н., профессор В.Н. Попов
д.т.н., Член-Корр. РАСХН Л.В. Римарева

Ответственный редактор
к.т.н. А.А. Дерканосова

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций:
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-62393 от 14 июля 2015 г.

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год

Подписной индекс издания в агентстве «Роспечать» 58012
По каталогу «Издания органов научно-технической информации» физические и юридические лица могут оформить подписку во всех отделениях почтовой связи Российской Федерации и странах СНГ и Балтии.

Адрес редакции и издательства
394026, г. Воронеж, пр-т Труда, д. 48, корп. 4, оф. 11

Отпечано в типографии ООО Фирма «Элист»
Адрес типографии
394000, г. Воронеж, ул. Никитинская, 11

E-mail: actbio@mail.ru

Сдано в набор 14.09.2020. Подписано в печать 22.09.2020.
Дата выхода в свет: 26.09.2020
Усл. печ. л. 4,6. Тираж 1500 экз. Заказ 50
Цена – свободная.

Содержание

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

СЕКЦИЯ 1. ПИЩЕВАЯ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ И ЛЕСНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

НОВЫЕ РЕЦЕПТУРЫ ПРЯНИКОВ ДИАБЕТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ
Т.Н. Тертычная, И.В. Мажулина, С.Ф. Яковлева 17

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВ
И.А. Дегтярева, Е.А. Прищепенко 20

ОСОБЕННОСТИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕЩЕВИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ СОРТОВ ЗАНЗИБАР ГРИН И ИМПАЛА БРОНЗОВАЯ
Н.Р. Петров, О.С. Александров 22

ХАРАКТЕРИСТИКА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЫСОКОСТАБИЛЬНОЙ В-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ИЗ *DESULFUROCOCCUS AMYLOLITICUS*
В.Р. Сергеев, Ю.В. Киль, Ибатуллин Ф.М., Г.Н. Рычков 23

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИНГЕРОЛА ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ВАРЕНЫХ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ
А.А. Валишев, С.В. Мурашев 24

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ СЕЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ
Н.А. Волкова, Б.С. Иолчиев, В.А. Багиров, Н.А. Зиновьева 29

ОЦЕНКА СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ГЕН-НОКАУТНЫХ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА
В.С. Камбурова, Ш.Э. Шерматов, И.Б. Салахутдинов, О.С. Чарышникова, Г.Ф. Маматкулова, Ф.С. Раджабов, Ш.Х. Маматкулова 30

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ГИАЛУРОНИДАЗЫ
О.Ю. Мальцева, Е.И. Гребенюк 35

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА ФИТОХРОМА А1 НА АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА
В.С. Камбурова, Ш.Э. Шерматов, Г.Ф. Маматкулова, Ш.Х. Маматкулова 36

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПЕСТИЦИДОВ НА КЛЕТОЧНЫХ И ОРГАНИЗМЕННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ
Н.Е. Шувалова, М.Г. Сульман, Е.А. Прутенская 40

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ
Г.П. Шуваева, Т.В. Свиридова, О.Л. Мещерякова, В.Э. Дробных 44

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ХВОИ *PICEA ABIES* НА РАННИЕ ЭТАПЫ ОНТОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ
Е.М. Короткова, Е.В. Ожимкова, М.Г. Сульман 45

РАЗРАБОТКА РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩЕЙ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ БОБОВ ФАСОЛИ
Е.А. Прутенская, В.А. Сильченко 46

КОМПЛЕКСНАЯ ПЕРЕРАБОТКА СЕМЯН БОБОВЫХ КУЛЬТУР
Е.В. Ожимкова, М.Г. Сульман 47

ОРИЕНТАЦИЯ ГАПТЕНА И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУНОАНАЛИЗА МАЛЫХ МОЛЕКУЛ
М.А. Буркин, И.А. Гальвидис 48

ГРУППОВОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОГЛИКОЗИДОВ С ПОМОЩЬЮ ИФА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ
И.А. Гальвидис, К.М. Буркин, М.А. Буркин 53

КУЛЬТУРА SHED – МИКРОСПОР ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ
А.О. Блинков, В.С. Рубец, М.Р. Халилуев 57

УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА В ПОВЫШЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ДЕФИЦИТУ ВЛАГИ
Д.Р. Масленникова, Ф.М. Шакирова 60

RHUS CORIARIA (SUMAC): FROM OF UNDERSTANDING THE BIOTECH POTENTIAL TO İTS INDUSTRIAL USES
Gharib Hafizov, Ilham Qurbanov, Samir Hafizov 63

КОНСТРУКЦИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ КОНКУРЕНТНОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНАЛИЗА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ
Т.С. Серченя, И.В. Горбачева, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов 72

CLONING AND EXPRESSION OF CHITINASE 19 FAMILIE FROM *D.CAPENSIS*
I.G. Sinelnikov, A.M. Chulkin, A.M. Rozhkova 76

ВЛИЯНИЕ ГАЗОВОЙ ДЕКОМПРЕССИИ НА ВСХОЖЕСТЬ И РОСТ СЕЯНЦЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО
Т.А. Благодарова, А.Ю. Кошелев, А.И. Сиволапов 77

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ В МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ ПЕРСПЕКТИВНОЙ СТАРТОВОЙ КУЛЬТУРЫ НА ОСНОВЕ KOCURIA VARIANS
М.Ю. Минаев, Е.А. Коноров ... **79**

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С АПОМИКСИСОМ, *CENH3* И *APOLLO*
Е.А. Бакин, Ф. Сезер, М.П. Райко, К.М. Таскин, В.Б. Брюхин ... **81**

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЛКОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ BRUCELLA В СЕРОДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА
А.К. Булашев, О.С. Акибеков, А. Сыздыкова, Ж.А. Сураншиев, Б. Инербай ... **86**

ПОЛУЧЕНИЕ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЗАРОДЫШЕВЫХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ В РАМКАХ СОЗДАНИЯ КРИОБАНКОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
Н.Ю. Герман, Б.С. Иолчиев, Н.А. Волкова ... **91**

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПО ВВЕДЕНИЮ СИСТЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ И СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ
А.Н. Ветох, Т.О. Котова, Л.А. Волкова, Е.К. Томгорова, Н.А. Волкова ... **93**

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ МЁДА НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОЛОЧНО-КИСЛЫХ БАКТЕРИЙ
Л.Р. Гайфуллина, Е.С. Салтыкова, М.Д. Каскинова, А.В. Поскряков, А.Г. Николенко ... **95**

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ФЕРМЕНТНОГО РАСТВОРА НА ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS*)
Ц.С. Гарибян, З.С. Константинов, Е.В. Захарова ... **98**

НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ DAPHNIA MAGNA ПРИ ИСКУССТВЕННОЙ КУЛЬТИВАЦИИ В ЧИСТОЙ И СМЕШАННОЙ ВОДОРОСЛЕВОЙ КУЛЬТУРЕ
Н.И. Кочетков, О.Г. Бугаев, П.Ю. Татаренко, А.В. Горбунов ... **100**

ЭФФЕКТИВНЫЙ И НЕТОКСИЧНЫЙ СПОСОБ ЭКСТРАКЦИИ СУММАРНОЙ ДНК ИЗ ХВОИ *PINUS SYLVESTRIS* L.
М.Ю. Петюренко, И.И. Камалова, А.П. Сердюкова ... **101**

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ХАЛЯЛЬНОСТИ ПРОДУКТОВ
О.Д. Гендрикон, Е.А. Зверева, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев ... **102**

МЕТАГЕНОМНЫЕ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ СНЕЖНОЙ ПЛЕСЕНИ ЗЛАКОВ И «ЧЕРНОЙ НОЖКИ» ПАСЛЕНОВЫХ
Ю.В. Гоголев, М.А. Сайганова, М.Д. Бойцова, А.С. Балкин, В.Ю. Горшков ... **104**

ЧЕЧЕВИЧНОЕ МОЛОКО, ОБОГАЩЕННОЕ ЙОДОМ
А.О. Дарьин, Л.В. Антипова ... **108**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОИНОКУЛЯЦИИ МИКРОКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП В УСЛОВИЯХ *INVITRO*
Н.В. Евсеева, Г.Л. Бурыгин, О.В. Ткаченко, А.А. Старчиков, М.А. Григорян ... **109**

ОСОБЕННОСТИ ЭТАПА ПРОБОПОДГОТОВКИ В КУЛЬТУРЕ МИКРОСПОР *IN VITRO* РЕДИСА ЕВРОПЕЙСКОГО.
Е.В. Козарь, Е.А. Домблидес, А.В. Солдатенко ... **110**

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОДЛИННОСТИ И СОСТАВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ
Е.А. Зверева, О.Д. Гендриксон, Н.И. Смирнова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев ... **112**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА ОРГАМИКА Ф В КАРТОФЕЛЕВОДСТВЕ
Д.Д. Зиганшин, М.А. Лукьянцев, А.А. Егоршина, А.С. Сироткин ... **114**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ В ВОСПРОИЗВОДСТВЕ
Б.С. Иолчиев, О.Э. Бадмаев, П.М. Кленовицкий, А.В. Таджиева, Н.А. Комбарова ... **117**

АНТИМУТАГЕННЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ P. LACTOBACILLUS
С.В. Китаевская, О.А. Решетник ... **119**

КОЛЛАГЕНОВЫЕ СУБСТАНЦИИ РЫБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ОТРАСЛЯХ ЭКОНОМИКИ
Л.В. Антипова ... **122**

ОЦЕНКА ПЕПТИДНОГО ПОТЕНЦИАЛА СТАРТОВЫХ КУЛЬТУР, А ТАКЖЕ ИХ КОМПОЗИЦИИ, В МЯСНОМ СЫРЬЕ
Д.А. Афанасьев, И.М. Чернуха, Н.Г. Машенцева ... **123**

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ НАПИТКИ И ДЕСЕРТЫ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТСОДЕРЖАЩЕГО БИОГЕЛЯ ИЗ ЛАМИНАРИИ «ВИТАЛЬГАР КАРДИО»
Л.Х. Котельникова, А.В. Подкорытова, А.Н. Рощина, И.А. Шашкина ... **128**

ОСОБЕННОСТИ СОЗДАНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ КОРМОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ
М.В. Лукьяненко ... **132**

ВЛИЯНИЕ ПОРОШКА ИЗ ВЁШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ НА БРОДИЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ
А.В. Маслов, З.Ш. Мингалеева, О.В. Старовойтова, Л.И. Агзамова, О.А. Решетник ... **135**

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ
И.С. Гайворонская, В.В. Колпакова, Л.В. Чумикина ... **136**

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕРБИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА
О.Д. Петровская ... **140**

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ МОЛОЧНЫХ, РАСТИТЕЛЬНЫХ И КОМБИНИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ
И.С. Полянская, О.С. Тиханова ... **144**

СПЕЦИФИКА ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФЛОКУЛЯНТОВ НА КУЛЬТУРУ МИКРОВОДОРОСЛИ SCENEDESMUS QUADRICAUDA
А.К. Пономарев, Л.Л. Брежнев, А.В. Черенков, О.В. Горбунов ... **145**

ОТБОР ДЕРЕВЬЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR L.*) ПО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИМ КРИТЕРИЯМ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ЛЕСНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ
А.А. Попова, В.Т. Попова, С.В. Кирьянова ... **147**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АССОЦИАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С ДРОЖЖАМИ В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ
В.С. Ржевская, Л.М. Теплицкая, Е.Ф. Семенова **149**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУКЦИНАТОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПРОДУКЦИИ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
Н.К. Романова, Е.В. Романова, Т.А. Ямашев, О.А. Решетник **154**

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ РАСТВОРИТЕЛЯ НА НАКОПЛЕНИЕ ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРОГЕСТЕРОНА ШТАММАМИ *ASPERGILLUS NIDULANS*
О.С. Савинова, Т.В. Федорова, Н.К. Давыдова, Т.С. Савинова **155**

ОЦЕНКА ПРЕБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ТРАВ ПЕРМСКОГО КРАЯ
З.Ю. Самойлова, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский **156**

СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *B. SUBTILIS* С НОКАУТИРОВАННЫМИ ГЕНАМИ СУРФАКТИН-СИНТЕТЕАЗ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФИТОПАТОГЕНЕЗ
Е.Р. Сарварова, Д.К. Благова, А.В. Сорокань, И.В. Максимов **157**

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ ПТИЦЕФАБРИК
О.С. Корнеева, Т.В. Свиридова, Г.П. Шуваева, О.Л. Мещерякова, Е.А. Василаки **160**

БИОТЕХНОЛОГИИ И ТРАДИЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОЗДАНИЯ КУЛЬТУР ТОПОЛЯ В ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ ЦЧР
А.И. Сиволапов, В.А. Сиволапов **161**

ВЛИЯНИЕ АССОЦИАЦИЙ ЭФФЕКТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ
А.К. Саданов, И.Э. Смирнова **166**

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ *ДЕРБЕННИКА ИВОЛИСТНОГО* (*LYTHRUM SALICARIA)*, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ ПАВЛОДАРСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Б.Ж. Баймурзина, Д.К. – К. Шакенева, Н.П. Корогод, З.М. Хасанова, Л.А. Хасанова **169**

ПОРИСТЫЕ КОЛЛАГЕНОВЫЕ СУБСТАНЦИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ СРЕДСТВ ЛИЧНОЙ ГИГИЕНЫ
И.В. Сухов, Л.В. Антипова **170**

ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОИЗВОДСТВА НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА
Л.В. Антипова, И.В. Новикова, Т.И. Романюк **171**

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОРОЩЕННЫХ СЕМЯН РАЗЛИЧНЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В ИНДУСТРИИ ПРОДУКТОВ ЗДОРОВОГО ПИТАНИЯ
А.В. Черкасова, Л.П. Бессонова, Л.В. Антипова **172**

РАЗРАБОТКА МЕТАБОЛИЧЕСКИ АДАПТИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ
Ю.А. Семисажонова, Ж.В. Новикова, А.А. Максимкин, С.М. Сергеева, Д.С. Лавринович **173**

ВЛИЯНИЕ СЕМЯН КАНИХУА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РУБЛЕННЫХ КУЛИНАРНЫХ ИЗДЕЛИЙ
С.М. Сергеева, Ж.В. Новикова, А.А. Максимкин, Д.С. Лавринович **174**

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕРОКСИДОВ НА РОСТ ЭНТАМОПАТОГЕННОГО ГРИБА ASCOSPHAERA APIS И ИХ ТОКСИЧНОСТИ ДЛЯ BOMBUS TERRESTRIS
М.Ю. Сыромятников , В.Н. Попов **176**

ТЕХНОЛОГИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ РЫБНОГО ФАРША С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ
О.В. Бредихина, Н.Ю. Зарубин, Н.Г. Строкова **177**

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ ПРОДУЦЕНТА КОРМОВОГО БЕЛКА
О.С. Корнеева, С.Ф. Яковлева, Е.А. Мотина, Т.Н. Тертычная **180**

ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЦЕСС БРОЖЕНИЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЭТАНОЛА ИЗ СМЕСИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР
А.Н. Яковлев, С.Ф. Яковлева, Т.С. Ковалева, Т.Н. Тертычная **181**

ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ DELFTIA SPP. НА РАЗВИТИЕ РОСТКОВ САЛАТА, ВЫРАЩЕННЫХ В ПРИСУТСТВИИ МЕТСУЛЬФУРОН-МЕТИЛА
Н.В. Агафонова, Н.В. Доронина **182**

БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКОТОКСИНОВ
Р.Ф. Ахундов, Т.Б. Ершова, И.В. Лягин, Е.Н. Ефременко **183**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОЛОНГИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ФУНГИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТА) В БОРЬБЕ С КОРНЕВЫМИ ГНИЛЯМИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР
Н.В. Стрельцова **184**

ПОВЕДЕНИЕ ПЛАНКТОННЫХ УРЕОЛИТИЧЕСКИХ КЛЕТОК BACILLUS LICHENIFORMIS ПРИ БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ $CaCO_3$
Л.А. Иванова, Д.А. Головкина, Е.В. Журишкина, В.В. Егоров, А.А. Кульминская **187**

НОВЫЙ МЕТИЛОТРОФНЫЙ ФИТОСИМБИОНТ ANCYLOBACTER SP. VT
Е.Н. Капаруллина, Н.В. Агафонова, Н.В. Доронина **188**

МАРКЕР-ОПОСРЕДОВАННАЯ СЕЛЕКЦИЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ APIS MELLIFERA L.
М.Д. Каскинова, Л.Р. Гайфуллина, Л.Р. Салтыкова, А.Г. Поскряков, А.Г. Николенко **189**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СЫРЬЯ АЛТАЙСКОГО КРАЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ СЫРОВ
О.Н. Мусина, Н.И. Бондаренко, Д.А. Усатюк **191**

СУПЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ХРИЗАНТЕМЫ CDM44 ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К ПОНИЖЕННЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ
А.В. Нежданова, А.М. Камионская, А.В. Щенникова **193**

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ И СОХРАНЯЕМОСТИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ В ЖИДКОЙ РЖАНОЙ ЗАКВАСКЕ
О.А. Савкина, М.Н. Локачук, Л.И. Кузнецова, Е.Н. Павловская, В.К. Хлесткин **195**

PSEUDOMONAS ASPLENII 11RW В КАЧЕСТВЕ АНТАГОНИСТА ЗАБОЛЕВАНИЙ ЯБЛОНИ
С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов **198**

НАУЧНЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ РЕЦЕПТУР ПЕЧЕНЬЯ
Т.Н. Тертычная, И.В. Мажулина, С.Ф. Яковлева **199**

БИОТЕХНОЛОГИЯ СМЕТАННОГО ПРОДУКТА С ПРОЛОНГИРОВАННЫМИ СРОКАМИ ГОДНОСТИ
О.И. Долматова **200**

РИЗОГЕНЕЗ ВИНОГРАДА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *EX VITRO*
Т.А. Красинская **201**

НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ БИОДЕСТРУКЦИИ КСАНТАНА: ПОЛНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ IN VITRO И ВОЗМОЖНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
С.В. Швецова, Л.В. Юрченко, Е.В. Журишкина, К.С. Бобров, А.А. Кульминская **202**

ПРИМЕНЕНИЕ ОБОРУДОВАНИЯ FLOTTWEG В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ
М.М. Аксенов, О.В. Дубровская **206**

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК ДЛЯ СКРИНИНГА ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ВИНОГРАДА
В.А. Полтораченко, Я.И. Алексеев, Вей Чен, В.А. Володин, С.М. Гориславец, В.И. Рисованная, С.А. Блинова **210**

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ
Н.А. Лесникова, Т.В. Котова **214**

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОМАТИЧЕСКОГО КЛОНИРОВАНИЯ И РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
Г.Н. Сингина, П.В. Сергиев, А.В. Лопухов, Е.Н. Шедова, Т.Е. Тарадайник **218**

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ФИТОЭКДИСТЕРОИД СОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ШПИНАТА
В.А. Шипелин, Н.А. Петров, С.Н. Зорин, С.Х. Сото, В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова **220**

НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В РЕЦЕПТУРЕ ОБОГАЩЕННОГО ХЛЕБА
Т.Н. Тертычная, Л.И. Лыткина., Д.В. Коптев., С.Ф. Яковлева **224**

СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКИХ ЭКЗОПРОТЕАЗ МИКРОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
С.Н. Тиморшина, А.А. Осмоловский **225**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГРИБА ASPERGILLUS ORYZAE В ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТАЦИИ КАПУСТЫ
Е.И. Кипрушкина, А.А. Сергеева, В.В. Бакланова, В.А. Максимчук **228**

СТИМУЛИРОВАНИЕ СИНТЕЗА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ PAL-АССОЦИИРОВАННЫЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (TRÍTICUM AESTÍVUM L.)
П.В. Федураев, Л.Н. Скрыпник, А.В. Рябова, А.В. Пунгин, Э.В. Токупова, П.В. Масленников **231**

НАПРАВЛЕННОСТЬ И ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В РУБЦЕ ОВЕЦ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В РАЦИОН ПРИРОДНЫХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК С РАЗЛИЧНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ
Ю.П Фомичев, Н.В. Боголюбова **234**

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ КАК ОДНА ИЗ ВАЖНЕЙШИХ (ЗАВЕРШАЮЩИХ) СТАДИЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ГЛЮКОЗЫ
Л.С. Хворова **239**

БАКТЕРИИ РОДА PSEUDOMONAS: ПОТЕЦИАЛ В НИВЕЛИРОВАНИИ ГЕРБИЦИДНОГО СТРЕССА РАСТЕНИЙ
С.П. Четвериков **240**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ МАСЛИЧНЫХ СЕМЯН
А.А. Шевцов, Т.Н. Тертычная, Н.А. Сердюкова **245**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЕКТИНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЯГОДНОГО СЫРЬЯ
В.А. Щелконогов , О.А. Баранова , А.В. Чеканов , К.Д. Казаринов , Э.Ю. Соловьева , А.И. Федин **246**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СОРТОВ СОРГО С УЛУЧШЕННОЙ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТЬЮ БЕЛКОВ ЗЕРНА
Л.А. Эльконин, В.М. Панин, О.А. Кенжегулов, С.Х. Сарсенова **247**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР НА ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВАХ
С.Н. Сушкова, Т.М. Минкина, А.И. Барбашев, Т.С. Дудникова, Е.М. Антоненко **251**

ВЛИЯНИЕ КОНВЕКТИВНОЙ И СВЧ-СУШКИ СЕМЯН РАПСА НА ПОКАЗАТЕЛИ БЕЗОПАСНОСТИ РАПСОВОГО МАСЛА
Е.С. Бунин, Г.В. Калашников, С.В. Макеев **252**

АНАЛИЗ ПРОТЕИНОВОГО СОСТАВА СЕМЯН РАПСА ПРИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ С СВЧ-СУШКОЙ
Е.С. Бунин, Г.В. Калашников, С.В. Макеев **254**

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОРТА НИГЕЛЛЫ ДАМАССКОЙ И НИГЕЛЛЫ ПОСЕВНОЙ, АДАПТИРОВАННЫЕ К УСЛОВИЯМ КРЫМСКОГО ПОЛУОСТРОВА
В.С. Паштецкий, Ю.Н. Костанчук, В.С. Власова, З.М. Хасанова, Л.А. Хасанова **256**

СОДЕРЖАНИЕ НИТРАТОВ И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В КОРНЕПЛОДАХ МОРКОВИ ПРИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ
Г.В. Калашников, О.В. Черняев **258**

ОДНОКЛЕТОЧНАЯ ЗЕЛЕНАЯ МИКРОВОДОРОСЛЬ CHLORELLA КАК ОСНОВА ПРОДУКТОВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ
Р.И. Абдрахманова, Л.Ф. Ахмадеева, Б.Ж. Баймурзина, Д.А. Булкова, Б.Ш. Ишмуратова, Г.Ш. Казыханова, Н.В. Калинина, З.Ю. Ибрагимова, З.Н. Кашапова, А.С. Муканова, О.Н. Мухина, А.М. Нафикова, Р.Х. Нигматуллин, С.А. Николаева, М.Н. Рахмангулов, Э.Ю. Страхова, З.Н. Сулейманова, Л.А. Сулейманова, А.А. Харрасов, В.Г. Хасанов, А.К. Шарипова, О.В. Черноусова, Л.А. Гайсина, З.М. Хасанова, Л.А. Хасанова **259**

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА МЕДА И ПЕРГИ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОНАПИТКОВ И НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ
В.Н. Саттаров, Р.Г. Фархутдинов, З.М. Хасанова, З.З. Харрасова, Л.Ю. Кулбахтина, А.В. Харрасов, Л.А. Хасанова **261**

БИОИНОКУЛЯНТЫ НА ОСНОВЕ РИЗОСФЕРНЫХ STREPTOMYCES ДЛЯ УСТОЙЧИВОГО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
Тинатин Доолоткелдиева, Сандра Тынчтыкбек Кызы **262**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВТОРИЧНОГО РЫБНОГО СЫРЬЯ В ТЕХНОЛОГИИ ГЕРОДИЕТИЧЕСКОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ
Е.Н. Харенко, Е.С. Беломытцева **266**

К ВОПРОСУ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЧАБРЕЦА В НАПИТКАХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ
Л.А. Хасанова, Л.А. Сулейманова, В.В. Назаров, З.Н. Сулейманова, Г.Ш. Казыханова, Б.Ш. Ишмуратова, В.С. Власова, О.В. Топорков, Р.З. Тагиров, А.В. Миронова, З.Ю. Ибрагимова, Э.Ю. Страхова, Р.С. Кираев, З.М. Хасанова **269**

БЕЗОПАСНОЕ ПОТРЕБЛЕНИЕ МОРЕПРОДУКТОВ
С.А. Лопатин, А.Н. Шаронов **271**

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА СОЛЕНЫХ СЫРОВ
Г.Р. Утаргалиева, А.Г. Жумина, М.Ю. Ишмуратова **272**

КОЛЛАГЕНОВЫЕ СУБСТАНЦИИ РЫБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА
Л.В. Антипова, И.И. Котов, С.С. Антипов, З.Н. Хатко, М.М. Дударь, М.З. Болоков, М.Г. Хатхоху **274**

СЕКЦИЯ 2. МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И БИОФАРМАЦЕВТИКА

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ПОИСКА ИНГИБИТОРОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1 И КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА KU70 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИНГИБИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА КОНЪЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ЭОЗИНОМ
А.Н. Анисенко. С.О. Галкин, А.А. Розина, М.Б. Готтих **276**

КЕРАСОМЫ НА ОСНОВЕ СИЛОКСАНОВОГО ПРОИЗВОДНОГО L-ОРНИТИНА С НЕНАСЫЩЕННЫМИ УГЛЕВОДОРОДНЫМИ ЦЕПЯМИ
У.А. Буданова, Дениева З.Г., Ю.Л. Себякин **276**

ЭЛЕКТРОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ЦИТОХРОМ P450 СИСТЕМЫ КАК МОДЕЛИ В ПОИСКЕ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИССЛЕДОВАНИИ МЕТАБОЛИЗМА И АНАЛИЗЕ МЕЖЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
В.В. Шумянцева, Т.В. Булко, А.В. Кузиков, Р.А. Масамрех, П.И. Королева **277**

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА НА ОСНОВЕ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УЧАСТКОВ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС В БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ (НА ПРИМЕРЕ ФИБРИНОГЕНА).
Л.В. Юрина, А.Д. Васильева, А.Е. Бугрова, М.И. Индейкина, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, М.А. Розенфельд **280**

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕПАТИТА Е МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
Л.Н. Нестеренко , Г.И. Алаторцева , И.И. Амиантова , Л.Н. Лухверчик , Л.С. Зимарин , О.И. Лебедев **281**

АНТИМИКРОБНАЯ И РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАН-ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФИЦИНА
Д.Р. Байдамшина, Е.Ю. Тризна, М.Г. Холявка, А.Р. Каюмов **282**

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ LEN C 3
Д.Н. Мельникова, Е.И. Финкина, И.В. Богданов, Т.В. Овчинникова **285**

СИНТЕЗ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ НА ОСНОВЕ ДИЭТАНОЛАМИНА
М.К. Гусева, Т.Г. Бодрова, У.А. Буданова, Ю.Л. Себякин **286**

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ
Т.С. Демина, Т.А. Акопова, П.С. Тимашев **287**

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СЛИТОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА OPRF-ATOX-OPRI
Е.М. Зимина, А.А Калошин, А.В. Солдатенкова, Н.А. Михайлова, Е.Д. Меркушова **290**

КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЛЕНОК БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ
Н.А. Кленова, З.П. Белоусова, А.С. Тряпочкина, А.С. Дуюнова **292**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННОЙ ПНЕВМОНИИ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР
Е.С. Клочихина, С.А. Лапа, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов **293**

НАНОЗИМЫ НА ОСНОВЕ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ И ИММУНОАНАЛИЗ
М.Д. Кропанева, П.В. Храмцов, М.Б. Раев **294**

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИУРЕТАНА ХИТОЗАНОМ / ГЕПАРИНОМ И ИЗУЧЕНИЕ ТРОМБОРЕЗИСТЕНТНОСТИ НОВОГО МАТЕРИАЛА
Н.Н. Дрозд, А.П. Луньков, Ю.В. Жуйкова, Б.Ц. Шагдарова, А.В. Ильина, В.П. Варламов **297**

РОЛЬ МУЛЬТИВИДОВЫХ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК В БИОКОРРОЗИИ ПОЛИЭТИЛЕНОВ
М.В. Журина, С.В. Мартьянов, А.В. Ганнесен, В.К. Плакунов **298**

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩИЕ БЕЛКИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПЕРЕНОСЧИКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
Д.Н. Мельникова, Т.В. Овчинникова **300**

ПРИМЕНЕНИЕ БИОФАРАМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДЕСЕНСИБИЛИЗАЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
А.В. Печерский, В.И. Печерский, В.Н. Вильянинов, О.В. Печерская, В.Ф. Семиглазов **301**

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОМ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ
А.Ю. Хрущев, Э.Р. Акмаев, С.В. Колячкина, Т.Н. Лихих **302**

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ КОМПЛЕКСОМ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА МЕТОДОМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ
Т.И. Пономарева, Д.А. Слядовский, М.А. Тимченко, М.В. Молчанов, Е.А. Согорин **305**

МИКРОМИЦЕТЫ РОДА ASPERGILLUS КАК ПРОДУЦЕНТЫ ГЕМОСТАТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОТЕАЗ
А.Г. Очнева, А.А. Осмоловский **306**

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ТРЕХКОМПОНЕНТНЫХ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ
Е.В. Шмендель, Д.М. Макарова, Н.Г. Морозова, М.А. Зенкова, М.А. Маслов **307**

ВЛИЯНИЕ ГИДРОФИЛЬНОСТИ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДНЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ ПО С5 ПОЛОЖЕНИЮ ПИРИМИДИНОВОГО ЦИКЛА ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ ДНК ПОЛИМЕРАЗАМИ
О.А. Заседателева, С.А. Суржиков, В.Е. Шершов, Р.А. Мифтахов, Д.А. Юрасов, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов **308**

МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ ПРОТИВОАНЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИГЛИКАНОВ КИСЛОЙ ПРИРОДЫ
С.Т. Минзанова, В.Ф. Миронов, Л.Г. Миронова, Е.В. Чекунков, В.А. Милюков **309**

МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИГЛИКАНОВ КИСЛОЙ ПРИРОДЫ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ
С.Т. Минзанова, Л.Г. Миронова, А.И. Дойникова, До Тхи Бич Нгок, В.А. Милюков **314**

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ
Е.В. Филатова, М.И. Шадрина, И.Н. Власов, П.А. Сломинский **317**

ПОРИСТЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ КАТАЛАЗЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ ВАТЕРИТА $CaCO_3$
М.А. Тагирова, Н.Г. Балабушевич, Н.Л. Клячко, Д.В. Володькин **318**

ОСНОВНЫЕ ПУТИ ПРОВЕДЕНИЯ ВАЛИДАЦИИ ПРОЦЕССА ОЧИСТКИ ОБОРУДОВАНИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ
А.А. Татарникова, Н.Л. Клейменова, Л.И. Назина **319**

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ХОНДРОИТИН СУЛЬФАТА: СОВРЕМЕННЫЕ РЕШЕНИЯ
А.И. Капитунова, Н.Е. Патюков, С.А. Сухих, О.О. Бабич **320**

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СТРУКТУРЫ УЛЬТРАТОНКИХ ВОЛОКОН НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ ДЛЯ МЕДЦИНЫ
П.М. Тюбаева, А.А. Ольхов, А.К. Зыкова, Е.С. Мороков, А.А. Попов **321**

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ НА ПОДВЕРГНУТОЙ АНОДНОМУ ОКИСЛЕНИЮ ПОВЕРХНОСТИ СПЛАВА ВТ1–0, ИСПОЛЬЗУЕМОГО В ИМПЛАНТОЛОГИИ
Ф.А. Фадеев, Ю.Я. Хруник, С.В. Беликов, Д.В. Седнева-Луговец, О.В. Губаева, А.А. Попов **323**

СОЗДАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ДАРПИНОВ
Е.В. Коновалова, А.А. Шульга, Т.И. Лукьянова, А.Г. Воробьева, В.М. Толмачев, С.М. Деев **324**

ИНГИБИРОВАНИЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SET7/9 ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК К ГЕНОТОКСИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ
А.А. Дакс, О.М. Семенов, А.В. Жарова, О.Ю. Шувалов, О.А. Федорова, А.В. Петухов, Н.А. Барлев **325**

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ
В.Е. Кузнецова, В.Е. Шершов, Р.А. Мифтахов, А.В. Чудинов **326**

ИССЛЕДОВАНИЕ СУБСТРАТНЫХ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ DU И DC С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ УДЛИНЕНИЯ ПРАЙМЕРА (РЕХ) И ПЦР
О.С. Волкова, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов, С.А. Лапа **327**

АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ НА АДГЕЗИОННЫЕ КОНТАКТЫ МЕЖДУ ЭНДОТЕЛИОЦИТАМИ И НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ
С.З. Бобык **329**

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА МАГНИТООТДЕЛЯЕМЫХ ОКСИДАХ
А.М. Сульман, О.В. Гребенникова, Е.М. Михайлова, М.Г. Сульман, В.Г. Матвеева **330**

ПОИСК ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
С.А. Кондратьева, А.И. Кузьмич, В.В. Плешкан, Д.А. Дидыч, О.А. Безбородова **334**

ПЕПТИДНЫЙ МОДУЛЯТОР КАНАЛА TRPV1 УМЕНЬШАЕТ БОЛЬ И ВОСПАЛЕНИЕ В МОДЕЛЯХ АРТРИТА У КРЫС
Я.А. Андреев **335**

ИЗУЧЕНИЕ J-АГРЕГАТОВ ПРИРОДНОГО АНТИОКСИДАНТА АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ
Е.А. Куликов, И.С. Куликова, Е.В. Вязов, Р.Г. Гончарик, А.А. Селищева **336**

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ КАК ИНСТРУМЕНТ ПОИСКА МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ОПУХОЛИ: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ
Д.А. Дидыч, А.И. Кузьмич, В.В. Плешкан, И.В. Алексеенко, Е.Д. Свердлов **338**

МИКРОРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАПИИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ
Л.Н. Гринкевич **339**

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПРИДАНИЯ ИМ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ ОТ ДЕЙСТВИЯ ТОКСИКАНТОВ
И.В. Лягин, О.В. Маслова, О.В. Сенько, Н.А. Степанов, А. Асланлы, Е.Н. Ефременко **342**

ПРЕВЕНТИВНОЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ НА РАЗВИТИЕ МЕЛАНОМЫ B16
С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова, В.В. Яглов **343**

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНАЗЫ, СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА
С.М. Панкова, Ф.А. Сакибаев, Т.Н. Беляева, А.Н. Дубовицкая, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов **346**

ЭКДИСТЕРОН ПОДАВЛЯЕТ РОСТ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА
О. Шувалов, О. Федорова, А. Дакс, Е. Тананыкина, Ю. Гненная, Н. Барлев **347**

СОЧЕТАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ NUTLIN И ИНГИБИТОРА ТИРОЗИНКИНАЗ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК HER2-ПОЗИТИВНОГО ТИПА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
О. Федорова, О. Шувалов, А. Дакс, А. Гудович, Н. Барлев **347**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУСНЫХ И АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ (ПЦР, ИФА, РЛА)
А.И. Чижикова, А.М. Стойнова **348**

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA1, BRCA2, CHEK2, ATM, PALB2, BLM, NBS1 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКЕ ЯИЧНИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЧИПОВ
А.И. Закаморная, И.С. Абрамов, А.Ю. Иконникова, Д.О. Фесенко, Т.С. Лисица, Т.В. Наседкина **349**

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ВСПЫШЕК СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ B. ANTHRACIS В ТУРКЕСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ
А.Б.Шевцов , Л.Ю.Лухнова , У.А. Избанова, В.Б.Луцай **350**

ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В 3D-КУЛЬТУРАХ
П.Ю. Бикмулина, Н.В. Кошелева, А.И. Шпичка, В.И. Юсупов, Ю.А. Рочев, П.С. Тимашев **351**

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ УПОТРЕБЛЕНИИ ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ
Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, В.А. Митрофанова, В.В. Яглов **355**

БИОПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
Р.Д. Якупова, И.Р. Гильмутдинова, П.С. Еремин, Е.Ю. Костромина **358**

3D КО-КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И НОРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КАК МОДЕЛЬ РЕКРУТИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ В ОПУХОЛЬ
О.А. Ракитина, Д.А. Дидыч, Н.И. Игнатова, Г.В. Шаронов, А.И. Кузьмич **361**

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С КАРНОЗИНОМ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ
О.В. Космачевская, К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов **363**

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА КАК ИНСТРУМЕНТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
А.Ф. Топунов, О.В. Космачевская, Э.И. Насыбуллина, Н.Н. Новикова **365**

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА ГЕМОГЛОБИН ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПЕРОКСИНИТРИТОМ
Э.И. Насыбуллина, О.В. Космачевская, К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов **369**

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА ОСНОВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1 ИЗ THERMUS THERMOPHILUS
С.Р. Курпе, С.Ю. Гришин, О.М. Селиванова, А.К. Сурин, О.В. Галзитская **372**

SYNTHETIC INHIBITORS TARGETING KU/DNA INTERACTION AS A POSSIBLE TOOL TO STUDY DNA-MEDIATED REGULATION OF TRANSCRIPTION BY KU PROTEIN.
E. Pavlova, S. Korolev, O. Shadrina, A. Mantsyzov, M. Gottikh **376**

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ДЕСОРБЦИИ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ С МАТРИЦЫ ХИТОЗАНА
В.А. Королева, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов **377**

ДЕСНА КАК ИСТОЧНИК АУТОЛОГИЧНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ
Н.В. Кошелева, И.М. Зурина, А.А. Горкун, П.Ю. Бикмулина, А.А. Пулин, И.Н. Сабурина **378**

ИЗУЧЕНИЕ СЫВОРОТОК ПАЦИЕНТОВ МОСКОВСКОГО РЕГИОНА С ПЫЛЬЦЕВОЙ АЛЛЕРГИЕЙ, ИМЕЮЩИХ СЕНСИБИЛИЗАЦИЮ К МАЖОРНЫМ АЛЛЕРГЕНАМ КЛАССОВ LTP И PR-10, С ПРИМЕНЕНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ПОДХОДА
И.В. Богданов, Д.Н. Мельникова, Е.И. Финкина, Т.В. Овчинникова **381**

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГИСТОНОВЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОПРЕПАРАТОВ В ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ
А.И. Кузьмич, О.А. Ракитина, М.В. Зиновьева, Д.А. Дидыч, И.В. Алексеенко **382**

ВЛИЯНИЕ ПОЛИДИСПЕРСНЫХ ФУКОИДАНОВ ИЗ FUCUS VESICULOSUS НА КЛЕТКИ HEP G2 И CHANG LIVER
И.М. Лапина **383**

ВЛИЯНИЕ ДВУХ ТИПОВ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
Н.Д. Федорова, Д.А. Сумбатян, М.А. Стукова, Е.Ю. Варфоломеева **385**

КОЛЛАГЕНОВАЯ СЕТЧАТАЯ СТРУКТУРА КАК НАДЕЖНЫЙ КАРКАС ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ
А.А Фролова, Ю.М. Ефремов, С.Л. Котова, П.С. Тимашев **387**

МЕТОД УЛЬТРАЗВУКОВОГО ДИСПЕРГИРОВАНИЯ КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ ФУЛЛЕРЕНОВ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА
К.С. Эльбекьян , А.А. Комарова, О.А. Дюдюн , З.Х. Султыгова , Р.Д. Арчакова , О.А. Яндиев, А.В. Блинов **388**

НОВЫЙ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВЫЙ КРАСИТЕЛЬ ДЛЯ МАРКИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ
В.Е. Шершов, В.Е. Кузнецова, Р.А. Мифтахов, А.В. Чудинов **389**

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ЛАНТАНИДОВ В ИММУНОАНАЛИЗЕ
П.В. Храмцов **390**

МИФЫ И РЕАЛЬНОСТЬ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ: НОВЫЕ ВЫЗОВЫ В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ
П.С. Тимашев **390**

БИОТЕХНОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ БАРНАЗЫ И БИНАЗЫ
А.А. Шульга[1], Е.В. Коновалова[1], Т.И. Лукьянова[1], В.А. Миткевич[2], А.А. Макаров[2], С.М. Деев[1] **391**

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
З.И. Хайбуллин, А.С. Курьянова, Т.С. Демина, П.С. Тимашев, Т.А. Акопова **393**

ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И КОЛЛАГЕНА ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН
Б.Ц. Шагдарова, А.В. Ильина, В.П. Варламов **397**

БИОМАРКЕРЫ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА
М.И. Шадрина, М.М. Руденок, А.Х. Алиева, П.А. Сломинский **398**

ВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ: КАК ДОБИТЬСЯ ФОРМИРОВАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КОНСТРУКТОВ
А.И. Шпичка, П.С. Тимашев **399**

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТНОЙ ПЛЕНКЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК
Р.А. Мифтахов, А.Ю. Иконникова, С.А. Суржиков, А.В. Чудинов **400**

СЕКЦИЯ 3. ЭКОЛОГИЯ, БИОЭНЕРГЕТИКА И БИОГЕОТЕХНОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ ДИРОФИЛЯРИОЗА У СОБАК
А.Н. Панкрушина, М.А. Горшкова **402**

ВОЗДЕЙСТВИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА БЕЛЫЙ ФОСФОР
А.З. Миндубаев, Э.В. Бабынин, Е.К. Бадеева, А.Д. Волошина, С.Т. Минзанова, Л.Г. Миронова, Й.А. Акосах **403**

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ БИОСУРФАКТАНТОВ: СКРИНИНГ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЕГАЛОЛИПИДОВ
О.Н. Понаморева, Мо Лыонг, И.А. Нечаева **404**

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОРМОВ ПО МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТНОМУ СОСТАВУ
Х.Х. Тагиров, Н.Ю. Николаева **408**

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИИ ЦИНКА МЕТАЛЛРЕЗИСТЕНТНЫМИ ШТАММАМИ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*
П.Д. Погонышев, П.П. Якупов, В.В. Зинченко, А.В. Горовцов, Т.М. Минкина **411**

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ АМАРАНТА – АККУМУЛЯТОРЫ КАДМИЯ
З.Р. Вершинина, Л.Р. Хакимова, О.В. Чубукова **412**

АНАЛИЗ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЗОН РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТОВ
Т.Н. Ажогина **416**

МОДИФИКАЦИЯ ИОНООБМЕННЫХ ВОЛОКОН ДЛЯ СОРБЦИИ АММИАКА
А.В. Астапов, Ю.С. Перегудов, О.И. Долматова, П.А. Поздняков **417**

ВЛИЯНИЕ БИОЧАРА НА ФРАКЦИОННО-ГРУППОВОЙ СОСТАВ МЕДИ В ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВАХ
Т.В. Бауэр, Т.М. Минкина, С.С. Манджиева А.Г. Федоренко **418**

ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДИСТОГО СОРБЕНТА НА ПОДВИЖНОСТЬ ЦИНКА В ПОЧВЕ
М.В. Бурачевская, Т.В. Бауэр, В.С. Цицуашвили, И.П. Лобзенко, П.Д. Погонышев **422**

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ДЕТОКСИЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БИОКОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ТОРФОВ И МИКРООРГАНИЗМОВ-НЕФТЕДЕСТКРУТОРОВ РОДА *RHODOCOCCUS* ПО ОТНОШЕНИЮ К НЕФТЕПРОДУКТАМ В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ (ВОДА И ПОЧВА)
М.М. Герцен, Е.Д. Дмитриева **425**

НОВЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ЦЕЛЕВОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНОЙ МОДИФИКАЦИИ ДРЕВЕСИНЫ
А.Б. Дягилева, А.И. Смирнова **429**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИВНОЙ ДРОБИНЫ В КАЧЕСТВЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО ЭНЕРГОНОСИТЕЛЯ НА ПИВОВАРЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЯХ
В.В. Житков, Б.Н. Федоренко **432**

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА КАДМИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ
О.А. Журавлева, Е.И. Кожухова, Т.А. Воейкова, Кулигин В.С., В.Г. Дебабов **433**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛЕКТИНОВ БАКТЕРИЙ
А.В. Кобелев, С.В. Клементьев, Т.В. Вдовина, А.С. Сироткин **434**

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД С РЕГУЛИРУЕМЫМ ОКСИДАТИВНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ (РОВ-ТЕХНОЛОГИЯ)
А.Е. Кузнецов, А.В. Мелиоранский **435**

ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА КАДМИЯ НА МОДЕЛИ ОБЕСЦВЕЧИВАНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО
В.С. Кулигин, О.А. Журавлева, Т.А Воейкова, В.Г. Дебабов **439**

ЖЕЛЕЗООКИСЛЯЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ФАКТОР КОРРОЗИИ ГИДРОТЕХНИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ
Г.Г. Няникова, К.К. Лебедева, И.М. Царовцева **440**

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СВОЙСТВА-СТРОЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИЦЫ ФЕРМЕНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, В.Г. Матвеева, Г.Ю. Рабинович **441**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS* С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТОВ
М.А. Кузнецов, А.А. Щербаков, С.В. Иващенко, Е.А. Горельникова, Н.С. Червякова **445**

АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОБАКТЕРИИ КАК ОСНОВА БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА
Т.А. Кузнецова **448**

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА НА СВОЙСТВА БИОГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ИММОБИЛИЗАЦИИ В ОРГАНОСИЛИКАТНЫЕ МАТРИЦЫ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ В УСЛОВИЯХ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗА
Д.Г. Лаврова, М.С. Тимошина, О.Н. Понаморева **451**

ГЕОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОЧВ ЭКОСИСТЕМ БАЛТИЙСКОГО РЕГИОНА
М.В. Куркина, П.В. Масленников, А.С. Уманский **454**

СТРУКТУРА НАСЕЛЕНИЯ И БИОТОПИЧЕСКАЯ ПРИУРОЧЕННОСТЬ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ОТРЯДОВ ГРЫЗУНЫ И НАСЕКОМОЯДНЫЕ ЛУГОВЫХ И ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМ БЕЛАРУСИ
Е.И. Машков, Е.С. Гайдученко, А.И, Крищук **458**

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АКТИВНОГО ИЛА ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ ХИМИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ
Е.В. Перушкина, Е.Н. Семенова **462**

ВЛИЯНИЕ НИТРАТА СВИНЦА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ
А.А. Празян, С.В. Битаришвили, Е.С. Макаренко, М.А. Лыченкова, М.С. Подлуцкий **463**

ЦИАНОБАКТЕРИИ КАК БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ГЛОБАЛЬНОГО ПОТЕПЛЕНИЯ
В.Б. Сбойчаков, А.Л. Панин **465**

МЕТАНОГЕННАЯ КОНСОРЦИЯ НА ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ: КОМПОНЕНТЫ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА И ИХ ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ
Е.М. Семенова, Д.С. Груздев, Т.П. Турова, Т.Н. Назина **469**

ЭФФЕКТ КОМПЛЕКСНОГО ВНЕСЕНИЯ СОРБЕНТОВ В ЗАГРЯЗНЕННУЮ ПОЧВУ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ЯЧМЕНЯ ЯРОВОГО
Т.С. Дудникова, С.Н. Сушкова, Т.М. Минкина, Е.М. Антоненко, А.И. Барбашев, Н.П. Черникова **472**

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАККАЗ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОКАТОДОВ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ.
С.В. Алферов, В.И. Голикова, Т.А. Гордеева **474**

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ РЕДОКС-АКТИВНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ УНТ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ МАТРИЦ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БПК-БИОСЕНСОРА
В.А. Арляпов, А.С. Харькова, С.К. Курбаналиева, Л.С. Кузнецова **478**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА МЕХАНИЗМ ФИТОЭКСТРАКЦИИ РАСТЕНИЙ
Т.С. Авдеенкова, А.С. Макарова, А.В. Матасов, В.В. Челноков **482**

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРА КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ НА СКОРОСТЬ РОСТА РАСТЕНИЙ
Н.В. Будаговская **484**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *PSYCHROBACTER* К ТРАНСФОРМАЦИИ СТЕРИНОВ И ХОЛЕВЫХ КИСЛОТ
Н.О. Дещеревская, М.В. Донова **485**

ЕДИНИЧНЫЕ ЗАМЕНЫ ПРОТИЯ НА ДЕЙТЕРИЙ В МОЛЕКУЛЕ ДНК ИЗМЕНЯЮТ ВЕРОЯТНОСТЬ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОТКРЫТЫХ СОСТОЯНИЙ
А.А. Свидлов, М.И. Дроботенко, С.С. Джимак, А.А. Елкина **486**

МЕХАНИЗМЫ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ ПРИ ФРАКЦИОНИРОВАНИИ ИЗОТОПОВ
С.С. Джимак , А.А. Басов, А.А. Елкина **487**

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХВОИ СОСНЫ В РАЙОНЕ АВАРИИ ФУКУСИМСКОЙ И ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС
Е.С. Макаренко, С.А. Гераськин, М.А. Лыченкова **488**

ВЛИЯНИЕ ЛАТРУНКУЛИНА Б НА ДИНАМИКУ ЭНДОГЕННЫХ ИУК И АБК
А.С. Воронков, Ю.В. Минкина, Н.В. Авдеева **492**

ПОИСК НОВЫХ ПРОДУКТИВНЫХ ШТАММОВ, СПОСОБНЫХ ОСАЖДАТЬ КАРБОНАТ КАЛЬЦИЯ
Е.В. Журишкина, Д.А. Головкина, А.А. Кульминская **493**

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОГОЛОЛЕДНОГО РЕАГЕНТА НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИИ ХКНТВ НА ФИТОТОКСИЧНОСТЬ РАСТЕНИЙ
К.В. Пищаева, А.С. Макарова, А.В. Матасов, В.В. Челноков **496**

РЕКУЛЬТИВАЦИЯ СВАЛОК И ПОЛИГОНОВ ТВЕРДЫХ КОММУНАЛЬНЫХ ОТХОДОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОПРЕПАРАТОВ
К.В. Пищаева, Е.А. Никулина, А.С. Макарова, А.В. Матасов, В.В. Челноков **498**

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ НИЗКИХ ДОЗ НЕОНИКОТИНОИДОВ И КРИТЕРИЙ ИХ ТОКСИЧНОСТИ ДЛЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ
Е.С. Салтыкова, Л.Р. Гайфуллина, М.Д. Каскинова, А.В. Поскряков, А.Г. Николенко **500**

ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ РАЗНЫХ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ, В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ МЕТАНООБРАЗОВАНИЯ
Н.А. Степанов, О.В. Сенько, Е.Н. Ефременко **503**

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ПРИРОДНОГО ОРНАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ИЗ ПОТОКА РАССЕЯНИЯ ВЫСКОКСУЛЬФИДНОГО ХВОСТОХРАНИЛИЩА
А.С. Розанов, И.Н. Мягкая, Н.И. Ершов, Б.Ю. Сарыг-оол, М.А. Густайтис, А.А. Шипова, В.С. Ушаков, Е.В. Лазарева, С.Е. Пельтек **504**

БАКТЕРИИ *PARACOCCUS YEEI*, ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МЕТОДОМ, КАК ОСНОВАБПК-БИОСЕНСОРА
О.А. Каманина, Е.А. Ланцова, П.В. Рыбочкин **506**

ИЗУЧЕНИЕ ДЕСТРУКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ АКТИВНЫХ КОНСОРЦИУМОВ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ
С.А. Айткельдиева, Э.Р. Файзулина, О.Н. Ауэзова, Л.Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова **508**

АНАЛИЗ ГОРМОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ЯПОНСКОЙ КРАСНОЙ СОСНЫ ПОСЛЕ АВАРИИ НА АЭС ФУКУСИМА
С.В. Битаришвили, С.А. Гераськин, А.А. Празян **509**

ЭКОЛОГИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ОМЕЛЫ БЕЛОЙ (*VISCUM ALBUM* L.) НА ТЕРРИТОРИИ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ
Л.Н. Скрыпник, П.В. Масленников, П.В. Федураев, А.В. Пунгин, Н.С. Белов **513**

ДЕСТРУКЦИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ АКТИВНЫМИ КОНСОРЦИУМАМИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ
Э.Р. Файзулина, С.А. Айткельдиева, Л.Г. Татаркина **517**

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК, ИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ И МАГНИТНЫЕ ПОЛЯ
Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев **518**

ОБ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССОВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕФОСФАТАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД
А.Р. Хабибуллина, А.А. Хасанова, Р.Ш. Бикулов, Т.В. Вдовина, А.С. Сироткин **522**

НАКОПЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ПЕРВОГО КЛАССА ОПАСНОСТИ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ИМПАКТНОЙ ЗОНЫ НОВОЧЕРКАССКОЙ ГРЭС
В.А. Чаплыгин, Т.М. Минкина, С.С. Манджиева, Д.Г. Невидомская, Н.П. Черникова **525**

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ АГАРОФИТОВ
Т.А. Игнатова, Н.Г. Строкова **528**

СЕКЦИЯ 4. БИОИНФОРМАТИКА И IT

ЭКДИЗОНОВЫЙ РЕЦЕПТОР НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ФАРМАКОФОРНОГО ПОИСКА НОВЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ
М.С. Кондратьев, А.А. Самченко, В.М. Комаров, Н.Н. Хечинашвили **533**

АНАЛИЗ РЕПИТОМА В СЕМЕЙСТВЕ CANNABACEAE – ПОИСК КЛЮЧА К ВОЗНИКНОВЕНИЮ ПОЛА
О.В. Разумова, Ю.В. Бочаркина, К.Д. Боне, Д.В. Романов, Г.И. Карлов. **534**

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ТРАНСКРИПТОМА РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ПРЯМОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РНК НА ПЛАТФОРМЕ OXFORD NANOPORE
А.И. Глушкевич, А.Н. Князев, И.А. Фесенко **536**

РЕТРОТРАНСКРИПТОМ РАСТЕНИЙ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ И МАСШТАБЫ
М.Р. Омаров, П.Ю. Меркулов, С.А. Гварамия, Е.И. Колганова, И.В. Киров **539**

АНАЛИЗ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ И РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ SHEPHERDIA ARGENTEA (PURSH) NUTT
К.Д. Боне, О.В. Разумова, И.В. Киров, Г.И. Карлов **540**

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ МОДЕЛЕЙ ФЕРМЕНТОВ ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КАК МИШЕНЕЙ ДЛЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ
Н.В. Гроза, В.Н. Егорычева, А.В. Веселовский, И.В. Иванов **541**

СБОРКА DE-NOVO И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ШТАММОВ BACILLUS PUMILUS – ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
Д.С. Пудова, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова **542**

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА
С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова **543**

NANOTRF: ПРОГРАММА ДЛЯ DE NOVO ПОИСКА ВЫСОКОКОПИЙНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ В ДАННЫХ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК РАСТЕНИЙ
Е.И. Колганова, И.В. Киров **547**

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ PASTEURELLA MULTOCIDA
А.О. Амиргазин, К.К. Муканов, М.А. Куйбагаров, Т.Б. Карибаев, Е.М. Раманкулов, А.Б. Шевцов **548**

СЕКЦИЯ 5. КЛЕТОЧНАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ КАК ФИДЕРНЫЕ СЛОИ ДЛЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ
Ю.А. Осипова, Д.Г. Коровина, Е.А. Савченкова **550**

НОВЫЙ ФЕРМЕНТ CYP74 ЛАНЦЕТНИКА *BRANCHIOSTOMA BELCHERI*
Е.О. Смирнова, Н.В. Ланцова, Я.Ю. Топоркова, А.С. Гречкин **550**

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ И ПРЕЖДЕВРЕМЕННАЯ ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ
П.Ю. Меркулов, М.Р. Омаров, И.В. Киров **551**

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БАЦИЛЛЯРНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ДРОЖЖАМИ *PICHIA PASTORIS*
Ю.А. Васильева, Д.С. Пудова, М.Р. Шарипова **552**

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ПРОКАРИОТ
А.Н. Антипов, Н.Н. Мордкович, Н.А. Окорокова, Т.Н. Сафонова, К.М. Поляков, В.П. Вейко **553**

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИК СОЗДАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.), УСТОЙЧИВЫХ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ
А.А. Вербицкая, М. Мувинги, А.К. Гапоненко **554**

ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ И ПРАВОВОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ПРОМЫШЛЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
Т.А. Воейкова, А.Ю. Скороходова, О.А. Журавлева, А.Д. Новиков, В.С. Кулигин, В.Г. Дебабов **555**

НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ РНК МУТАНТА АРАБИДОПСИСА (DDM1) С АКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ
С.А. Гварамия, П.Ю. Меркулов, М.Р. Омаров, И.В. Киров **556**

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ – КРИТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ БИОТЕХНОЛОГИИ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ
Н.А. Давидович **557**

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЙ БИОЧИП С «УМНЫМИ» ГИДРОГЕЛЕВЫМИ ЯЧЕЙКАМИ
А.М. Золотов, А.Ю. Иконникова, В.Е. Кузнецова, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов **558**

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА И ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА
А.В. Зубков, Н.С. Кузьмина, М.А. Андреева, А.В. Сидоров, Л.Г. Бутова **559**

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ МЕХАНОСЕНСОРНОЙ РОЛИ ПОЛЯРНОГО ЖГУТИКА БАКТЕРИИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SP245
Е.И. Кацы, А.В. Шелудько, Л.П. Петрова, С.С. Евстигнеева, Ю.А. Филипьечева, Д.И. Мокеев, Е.М. Телешева, И.В. Борисов **562**

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ В КЛЕТКАХ HEK293
А.В. Колосов, А.С. Волынкина, Л.Д. Тимченко **563**

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА Л5 НА БИОГЕНЕЗ ВНЕШНЕМЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ LYSOBACTER SP. XL1
И.В. Кудрякова, А.С. Афошин, Т.В. Ивашина, Н.Е. Сузина, Н.В. Васильева **564**

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ, ВОССТАНОВЛЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ЛЮДЕЙ СТАРШЕ 40 ЛЕТ
А.В. Печерский, В.И. Печерский, А.Б. Смолянинов, В.Н. Вильянинов, Ш.Ф. Адылов, А.Ю. Шмелёв, О.В. Печерская, В.Ф. Семиглазов **565**

АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МОДЕЛЬНОГО ГЕНА GFP У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЛАВОНОИДОВ
О.В. Чубукова, З.Р. Вершинина, Р.Т. Матниязов, Ал. Х. Баймиев **566**

ДЕТЕКЦИЯ ПРОМУТАГЕННЫХ ДЕЗАМИНАЗ СЕМЕЙСТВА AID/APOBEC В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ
Е.С. Шилов, А.А. Власова, О.Н. Шилова **567**

ВЕДУЩАЯ РОЛЬ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ POLQB CRISPR/CAS9-В ИНДУЦИРОВАННОМ ГЕННОМ ТАРГЕТИНГЕ У ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕНОЙ ВОДОРОСЛИ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII
И.А. Сизова, В.И. Шалгуев, S. Kelterborn, P. Hegemann, В.Н. Вербенко **568**

ДЕЗАМИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА AID/APOBEC И СЕЛЕКЦИЯ НОНСЕНС-ТРАНЗИЦИЙ У РНК-ВИРУСОВ
Е.С. Шилов, Л.Г. Данилов, А.А. Власова, В.С. Вьюшков **569**

ПОИСК ГЕНОВ *CLE*, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ ФЛОЭМЫ У КАРТОФЕЛЯ
М.С. Ганчева, И.Е. Додуева, Л.А. Лутова **570**

ВЛИЯНИЕ СВЕТОДИОДНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА ФОРМИРОВАНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ СИРЕНИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO
Т.В. Никонович, А.В. Константинов, И.Е. Баева, Т.В. Кардис, Н.Г. Брель, А.В. Зубарев **571**

ГЕНЫ *CEP* У КАРТОФЕЛЯ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ
Е.А. Рутковская, М.С. Ганчева, Л.О. Полюшкевич, М.А. Лебедева, И.Е. Додуева, Л.А. Лутова **572**

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РИСА С ГЕНАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ПИРИКУЛЯРИОЗА
Е.Г. Савенко, Ж.М. Мухина, Т.Л. Коротенко **575**

CRISPR/CAS9 КАК АЛЬТЕРНАТИВА КОНТРСЕЛЕКЦИИ ПО *URA3* ДЛЯ ПРИЦЕЛЬНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ДНК В ГЕНОМ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
Д.С. Спасская, А.И. Давлетшин, Д.С. Карпов **576**

СИСТЕМЫ WOX-CLAVATA В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЗАПАСАЮЩЕГО КОРНЯ У РЕДИСА ПОСЕВНОГО RAPHANUS SATIVUS
К.А. Кузнецова, И.Е. Додуева, Л.А. Лутова **578**

ТРАНСДУКЦИЯ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО КОНСТРУКТА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГАМ BDNF АКТИВИРУЕТ ЗАЩИТНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ НЕЙРОНОВ ПРИ ГИПОКСИИ И ИШЕМИИ
Е.А. Туровский, А.А. Бабаев, М.В. Туровская **579**

СЕКЦИЯ 6. ИНЖЕНЕРНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО ОРГАНИЧЕСКОГО СЫРЬЯ И ЕГО ОБОГАЩЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ
В.П. Молчанов, Н.В. Фомичева, Ю.Ю. Косивцов, М.Г. Сульман **584**

ПРИМЕНЕНИЕ КАРБОКСИЛАТРЕДУКТАЗ И АМИНОТРАНСФЕРАЗ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА 6-АМИНОКАПРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ГЕКСАМЕТИЛЕНДИАМИНА ИЗ АДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ
Т.П. Федорчук **588**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДРОЖЖЕЙ КЛЕТОК SACCHAROMYCES CEREVISIAE. Т-985
Пхйьо Мьинт У, В.И. Панфилов, И.Г. Антропова, А.Е. Кузнецов **592**

ДВУХСТАДИЙНАЯ ОЧИСТКА БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА LbCAS12A
В.И. Шалгуев, Т. Нгуен, И.А. Сизова, Н.Г. Соболева, П. Хегеманн, В.Н. Вербенко **594**

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ BACILLUS SUBTILIS
Е.С. Яценко, Б.П. Шипунов **595**

СЕКЦИЯ 7. ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ И ПРОИЗВОДСТВО БАВ

НОВАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ФИТАЗА ИЗ CITROBACTER GILLENII – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КОРМОВОЙ ФЕРМЕНТ
А.А. Ткаченко, С.П. Синеокий, Т.Л. Гордеева **597**

ВЫБОР ХИМИКО-БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО ПУТИ СИНТЕЗА ЦЕФАЛОСПОРИНОВОГО АНТИБИОТИКА
А.В. Скляренко, И.А. Грошкова, С.В. Яроцкий **598**

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ GLNR ИЗ LACTOBACILLUS HILGARDII
Д.Э. Журавлева, З.И. Исхакова, А.Р. Каюмов **602**

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ БАД «ЭРАКОНД» МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА
А.Н. Крячко, Е.Е. Пономарев, В.Н. Козлов, Л.Ф. Пономарева, Г.М. Муллагулова **604**

МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ
Е.Е. Пономарев, А.Н. Крячко, Е.В. Кузнецова, Н.В. Байматов, Р.Р. Максютов **605**

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ КАТАБОЛИЗМА СТЕРОИДОВ У NOCARDIOIDES SIMPLEX ВКМ АС-2033Д ПРИ ИНДУКЦИИ АЦЕТАТОМ КОРТИЗОНА
В.В. Фокина, Е.Ю. Брагин, В.Ю. Штратникова, М.В. Донова **608**

БИОТЕХНОЛОГИИ ГРИБНЫХ АРОМАПРОДУКТОВ
Е.Ф. Семенова **609**

ГИАЛУРОНИДАЗЫ ДЕСЯТИНОГИХ РАКООБРАЗНЫХ: ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ
Т.И. Пономарёва, М.А. Тимченко, К.А. Бочарова, Е.А. Согорин **614**

ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА THYMUS VULGARIS, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ТАДЖИКИСТАНЕ, ЭМУЛЬСИОННЫМ СПОСОБОМ
С.Р. Усманова, З.У. Шерова, А.С. Джонмуродов, З.К. Мухидинов **618**

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НОВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ PII БЕЛКОВ POTN ИЗ LACTOBACILLLUS HILGARDII С АТФАЗОЙ ABC-ТРАНСПОРТЕРА POTA
И.З. Исхакова, Д.Э. Журавлева, А.Р. Каюмов **622**

ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УСТРИЧНОГО ЦИТРАТА КАЛЬЦИЯ
Е.А. Дубинец **625**

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННОЙ ХИМИКО-БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ НЕФТЕПРОДУКТОВ ОТ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ
Е.Н. Ефременко, О.В. Маслова, О.В. Сенько, Н.А. Степанов, С.Н. Гайдамака, М.А. Гладченко, А.В. Акопян, П.Д. Поликарпова, С.В. Лысенко, А.В. Анисимов **627**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МУЛЬТИЭНЗИМНОЙ КОМПОЗИЦИИ В ТЕХНОЛОГИИ БИОФЛАВОНОИДОВ ОБЛЕПИХОВОГО ШРОТА
Е.В. Аверьянова, Е.Д. Рожнов, М.Н. Школьникова, М.В. Обрезкова **628**

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БЕТА-ГЛЮКАНОВ
О.Н. Айрапетян, В.А. Иванова², Т.В. Меледина², А.А. Кульминская **631**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРАХ
Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, В.Г. Матвеева, М.Г. Сульман **633**

МИКРОВОДОРОСЛИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫХ ВЕЩЕСТВ
Д.Д. Белова, В.Ф. Долганюк, О.О. Бабич, С.А. Сухих, Д.С. Кацеров **637**

МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ОБОГАЩЕННЫХ АНТИОКСИДАНТАМИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЯБЛОК НА ОСНОВЕ НЕИОНОГЕННЫХ ЭМУЛЬГАТОРОВ
Л.Н. Скрыпник, А.Е. Новикова **638**

АППАРАТУРНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК IN VITRO PHLOJODICARPUS SIBIRICUS (STEPH. EX SPRENG.) K. – POL.
М.Т. Ханды, А.Г. Клюшин, С.В. Томилова, А.М. Носов **642**

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАЦИЛЛ: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ И ИХ ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ
Е.А. Анисимова, И.В. Горохова, Г.Р. Каримуллина, Д.Р. Яруллина **645**

МЕТОДОЛОГИЯ ИММУНОХИМИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ ЦЕЛЫХ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ И РАСТВОРИМЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ НУЖД БИОТЕХНОЛОГИИ
Е.П. Киселева , К.И. Михайлопуло , Г.И. Новик **648**

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

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИСЦИПЛИН ВАРИАТИВНОЙ ЧАСТИ БЛОКА 1 ДЛЯ РАЗВИТИЯ НАВЫКОВ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ МАГИСТРАНТОВ
М.Г. Сульман, Г.Н. Демиденко, О.В. Манаенков **652**

РЕАЛИЗАЦИЯ ОСНОВНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»
Р.Р. Биглов, В.А. Соломонов **654**

БИОТЕХНОЛОГИЯ НА СЛУЖБЕ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ
Д.А. Девришов, А.А. Олешкевич, С.Н. Марзанова **655**

НАПРАВЛЕНИЕ ПОДГОТОВКИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ» 19.03.01 (БАКАЛАВРИАТ) 19.04.01 (МАГИСТРАТУРА) В МОСКОВСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ АКАДЕМИИ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ
А.А. Олешкевич, Д.А. Девришов, С.Н. Марзанова **657**

Секция 1. Пищевая, сельскохозяйственная и лесная биотехнология

УДК 664.61:577.15.02

НОВЫЕ РЕЦЕПТУРЫ ПРЯНИКОВ ДИАБЕТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Т.Н. Тертычная[1], И.В. Мажулина[1], С.Ф. Яковлева[2]

[1] Воронежский государственный аграрный университет им. императора Петра I, Воронеж, Россия
[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

С целью максимального удовлетворения потребности населения в хлебобулочных и мучных кондитерских изделиях необходимо осуществить ряд научно-технических мероприятий в таком направлении, как широкое применение местных и нетрадиционных видов сырья, комплексное исследование сельскохозяйственного сырья, существенное сбережение ресурсов. Это позволит повысить пищевую и биологическую ценность готовых изделий. С целью повышения белковой ценности готовой продукции и для снижения ее себестоимости в мучных кондитерских изделиях целесообразно заменить муку пшеничную хлебопекарную на муку тритикалевую обдирную [1–2].

При разработке пищевых продуктов диабетического назначения большой интерес представляет такая культура как топинамбур, прежде всего по причине содержания в нем инулина [3]. Топинамбур в силу богатого химического состава представляет собой эффективное лечебное средство и может рассматриваться как уникальный продукт диабетического питания [4].

В качестве контроля рассматривалась рецептура пряников «Воронежские» (ГОСТ 15810–2014). Использовалась тритикалевая мука обдирная (ТУ 9293–001–00492894–2002), полученная из зерна тритикале сорта Тальва-100, который обладает хорошими технологическими и хлебопекарными свойствами [5–6].

В готовых изделиях определяли комплексную оценку качества по вкусовым характеристикам и внешнему виду. Щелочность кексов определяли по ГОСТ 5898–87. Анализ содержания белков осуществляли методом Къельдаля. Для определения содержания пищевых волокон использовали метод, основанный на удалении из продукта кислото-, щелочерастворимых веществ и определении массы остатка, условно принимаемого за клетчатку (ГОСТ 13496.2). Определение общих и моносахаров в изделиях определяли методом Бертрана.

Одним из перспективных видов сырья для производства мучных кондитерских изделий является тритикале. Кроме таких достоинств, как высокая урожайность, устойчивость к заморозкам и болезням, тритикале характеризуется широким варьированием по содержанию белков (в пределах 10–22 %), в том числе лизина (1,6–6,5 %). Белок по содержанию незаменимых аминокислот более полноценен и лучше усвояем по сравнению с белком пшеницы. Этим определяется более высокая пищевая ценность данной культуры [7].

Топинамбур положительно влияет на сердечнососудистую систему. Он полезен при атеросклерозе, ишемической болезни сердца, тахикардии, гипертонии. 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. Такой антитоксический эффект обусловлен совместными действиями инулина и клетчатки, входящих в его состав [8]. По химическому составу клубни топинамбура содержат до 3 % белков, все незаменимые аминокислоты, клетчатку, пектин, инулин (15–18 %), органические кислоты, жиры, фруктозу, 2–4 % азотистых соединений. Инулин является стимулятором роста бифидо- и лактобактерий [9]. Клубни топинамбура богаты микроэлементами (Ca, K, Mg, Na, F, Cr), в особенности селеном. По содержанию железа топинамбур значительно превосходит другие корнеплоды. В топинамбуре отмечается большое количество витаминов: B_1, B_2, B_6, C, PP, каротиноиды.

В современной концепции питания населения важное место занимает развитие направления сбалансированного и рационального питания, разработка рецептур хлебобулочных и кондитерских изделий лечебно-профилактического и диабетического назначения. Особая роль при этом отводится хлебобулочным и мучным кондитерским изделиям как продуктам ежедневного и повсеместного спроса [1]. Большой процент населения после 50 лет приобретают такое заболевание как сахарный диабет. В этой связи большое внимание уделяется поиску новых заменителей белого сахара (ГОСТ 33222–2015). Актуальность данной проблемы связана с необходимостью удовлетворения потребности населения в низкокалорийных подсластителях и разработки продуктов питания диабетической направленности.

Замену сахара можно осуществлять различными путями: использованием сахаросодержащего сырья (пюре из фруктов и овощей, порошки, глюкозо-фруктозные сиропы (ГФС) и др.), с применением натуральных и синтетических заменителей сахарозы и подслащивающих веществ [9]. В сравнении с сахарозой фруктоза считается наиболее безопасным подсластителем, так как сахароза при избыточном потреблении способна приводить к возникновению атеросклероза и диабета, к избыточному весу, склонности к злокачественным образованиям [10].

Рассмотрена возможность применения гидролизованного порошка топинамбура, содержащего фруктозу, в рецептуре пряников, рекомендованных для диабетического питания. Основное преимущество состоит в том, что фруктоза не требует при усвоении инсулина в организме человека.

Муку тритикалевую хлебопекарную обдирную вносили в количестве 25, 50, 75 и 100 % к массе пшеничной муки в рецептуру пряников «Воронежские». Дозировка 50 % тритикалевой муки была самой лучшей для получения теста с характерной структурой. Пробные лабораторные выпечки показали, что мука из зерна тритикале практически не влияет на органолептические показатели пряников (вкус, цвет, запах, форму и состояние поверхности). Однако при 75- и 100 %-ной замене пшеничной муки форма была более расплывчатая и поверхность сильно шероховатая. Благодаря высокой автолитической активности (содержание водорастворимых веществ 85–90 %) тритикалевая мука увеличивает намокаемость пряников – один из важных показателей, характеризующий потребительские свойства готовых изделий.

Использование инулиназ открывает широкую перспективу получения чистых фруктозных сиропов непосредственно из растительного сырья, из инулина, а не из крахмала [9–12]. Интерес к инулиназам вызван также тем, что образующиеся в результате их каталитического действия фруктоолигосахариды обладают пребиотическими свойствами.

Предварительный эксперимент показал целесообразность внесения 8,0 % полуфабриката из топинамбура в виде гидролизованного порошка топинамбура (гидромодуль 1:3). Гидролиз инулина производили ферментным препаратом инулиназой в виде инулополимексина, полученного с помощью вакуум-сублимационной сушки на основе продуцента *Bacillus polymyxa 29* [11].

В зависимости от вида сушки и формы конечного продукта, топинамбур является сырьем для производства инулина, основой биологически активных добавок к пище и вспомогательным компонентом пищевых продуктов. Концентрат топинамбура имеет в своем составе большое количество углеводов, витаминов, макро- и микроэлементов, что позволяет использовать его в пищевой, биотехнологической и косметической промышленности. Порошок топинамбура сохраняет все полезные свойства исходного топинамбура. Он легко хранится достаточно продолжительное время.

Технология переработки порошка топинамбура позволяет в полной мере сохранить его уникальный химический состав. Вначале смешивали порошок с водой с температурой 95–96 ℃ и выдерживали 35–45 мин. Затем охлаждали полуфабрикат до 40° С и осуществляли ферментативный гидролиз инулина топинамбура. Применяли ферментный препарат инулополимексин на основе *Bacillus polymyxa 29* (Патент РФ № 2480520). Оптимальные параметры гидролиза: pH 7,0, температура 40° С, продолжительность 8 ч, дозировка инулополимексина 8 ед./г инулина [12].

При разработке рецептуры пряников для оптимизации соотношений компонентов было принято симплекс-решетчатое планирование эксперимента. В данном случае за единицу условно принималась сумма мучных компонентов: X_1 – дозировка муки пшеничной хлебопекарной 1-го сорта, %; X_2 – количество муки пшеничной тритикалевой обдирной, %; X_3 – дозировка крахмала, %. Выходным параметром являлась намокаемость пряников (Y, %). С помощью программы «STATISTICA» проведена обработка экспериментальных данных. В результате математической обработки эксперимента получено уравнение регрессии, адекватно описывающее зависимость между намокаемостью пряников и содержанием исследуемых компонентов в изделиях.

С учетом постановки эксперимента показано, что 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 прияников составляет 180–185 %.

Увеличение массовой доли муки из зерна тритикале по сравнению с контролем, уменьшение пшеничной муки первого сорта, а также внесение 4,5–5,0 % картофельного крахмала к массе муки в тесте обеспечивает высокие органолептические и физико-химические показатели готовых изделий. Так, комплексная оценка качества пряников составляет 95–100 баллов (таблица 1).

Пряники, выпеченные по рекомендуемым рецептурам, имеют характерный светло-коричневый цвет, ровную поверхность, обладают высокими физико-химическими показателями (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика пряников

Наименование показателей	Показатели качества пряников	
	«Воронежские»	«Ажурные»
Органолептические:		
форма	Соответствующая данному виду пряников	
поверхность	Неподгорелая, без трещин и вздутий	
цвет	Светло-коричневый, свойственный данному наименованию изделий	
вкус и запах	Свойственный данному наименованию пряников, без постороннего запаха и привкуса	Сладкий вкус без постороннего запаха и привкуса
Физико-химические:		
массовая доля влаги, %	12,7	12,5
МД общих сахаров, %:	17,77	17,34
моносахаров	5,10	16,35
белковых веществ	6,50	9,30
Щелочность, град	0,50	0,45
Намокаемость, %	135,5	184,0

На основании проведенных исследований и данных оптимизации для использования в производственных условиях можно рекомендовать рецептуру пряников «Ажурные». В целом качество готовых изделий удовлетворяет требованиям нормативно-технической документации. Выпеченные образцы пряников характеризуются повышенным содержанием белков (9,3 %), сахаров (17,34 %), в том числе моносахаров (16,35 %), витаминов.

Это свидетельствует о высокой усвояемости предлагаемых образцов мучных кондитерских изделий. Пряники обладают высокими показателями качества, содержат фруктозу, пищевые волокна, витамины, минеральные вещества тритикалевой муки и топинамбура, что позволяет рекомендовать продукт для лечебно-профилактического и диабетического питания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shishkina A.N. et al. Use of secondary raw material of animal products in the technology of production of bakery products based on wheat-amaranth mixture // Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry. 2019. – T.20. – № 2. – P. 303–311.
2. Grain Bread with Buckwheat Bran Flour for a Healthy Diet / N.N. Alekhina, E.I. Ponomareva, S.I. Lukina [et al.] // Journal of Engineering and Applied Sciences 11 (12). – 2016. – P. 2623–2627.
3. Топинамбур – нетрадиционное сельскохозяйственное сырье / О.С. Корнеева, Н.А. Жеребцов, Т.Н. Тертычная и [др.] // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1994. – № 4. – С. 67–68.
4. Магомедов Г.О. Фруктово-овощные порошки из выжимок сокового производства – источник функциональных ингредиентов в хлебопечении / Г.О. Магомедов, О.В. Перфилова // Хлебопродукты. – 2019. – № 3. – С. 60–61.
5. Мука тритикалевая хлебопекарная / Т.Н. Тертычная, Л.П. Бессонова, В.И. Манжесов, С.В. Гончаров, Н.А. Яковлева // Хлебопродукты. – 2003. – № 5. – С. 23.
6. Корячкина С. Использование зерна тритикале в технологии зернового хлеба / С. Корячкина, Е. Кузнецова, П. Черепнина // Хлебопродукты. – 2007. – № 5. – С. 38–40.
7. Тертычная Т.Н. Сдобное печенье высокой пищевой ценности из муки тритикале / Т.Н. Тертычная // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2009. – № 2. – С. 40–43.
8. Инулаза микромицета Aspergillus awamori 808. Препаративное получение и некоторые физико-химические свойства / О.С. Корнеева, Н.А. Жеребцов, Г.П. Шуваева и [др.] // Биотехнология. – 1993. – № 7. – С. 31 – 35.
9. Мажулина И.В. и др. Исследование оптимальных условий ферментативного гидролиза инулина инулиназой Bacillus polymyxa 29 // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 5. – С. 26–36.
10. Zherebtsov N.A. On the mechanism of cleavage of β-2,1 – fructoside bonds in inulin with inulase Aspergillus awamori-2250 / N.A. Zherebtsov, O.S. Korneeva, T.N. Tertychnaya // Biochemistry. – 1995. – Vol. 60. – № 10. – pp. 1205–1211.
11. Holyavka M.G. et al. Inulinases from various producers: the features of their permolecular organization // Applied biochemistry and microbiology. 2014. Vol. 50. pp. 10–16.
12. Рутковская Т.Р. и др. Инулиназа дрожжей Sacharomyces cerevisiae ВГШ-2. Препаративное получение и некоторые физико-химические свойства // Фундаментальные исследования. 2010. № 10. С. 17–25.
13. Патент № 2480520. Способ управления процессами получения и сушки ферментных препаратов / А.А. Шевцов, и др.; заяв. ВГУИТ. – № 2011140150/06; заявл. 03.10.2011; опублик. 27.04.2013. Бюл. № 12.

УДК 573.6.086.83+577.2

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВ

И.А. Дегтярева, Е.А. Прищепенко

ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

Биотехнология рассматривает почву в качестве главного природного банка при поиске культур микроорганизмов с любыми необходимыми свойствами. Для этого имеется много оснований. Мировым приоритетом является производств экологически чистой продукции. Благодаря неисчерпаемому метаболическому потенциалу микроорганизмы используются человеком в самых различных целях, в том числе для решения экологических проблем. Микроорганизмы активно участвуют в почвообразовании и поддержании почвенного плодородия. Их количество в определенном типе почвы зависит от конкретного региона, его климатических условий, времени года и может достигать нескольких миллиардов в 1 г. Качественный состав микроорганизмов почвы разнообразен и представлен бактериями, актинобактериями, вирусами, микроскопическими грибами, простейшими. Значимым показателем помимо численности микроорганизмов, обитающих в почве, является их активность, определяющая результаты их жизнедеятельности. Поэтому изучение функционирования микробного сообщества почв представляется актуальной научной проблемой. Биологические подходы и приемы, основанные на использовании потенциала почвенных микроорганизмов и растений, являются актуальными для сельского хозяйства. В отделе агроэкологии и микробиологии Татарского НИИАХП ФИЦ КазНЦ РАН проводятся фундаментальные и прикладные исследования по нескольким научным направлениям: микробиологический мониторинг и оценка качественного состояния различных типов почв; биологическая безопасность наноструктурных минералов в тестах на микроорганизмах и растениях; создание и внедрение биопрепаратов на основе автохтонных агрономически ценных микроорганизмов и биобезопасных наноминералов; биологическая ремедиация нарушенных почв с использованием микроорганизмов-деструкторов широкого спектра действия и др. Микроорганизмы являются одним из важнейших компонентов, которые оказывают влияние на плодородие. Для почв Республики Татарстан проводится комплексная микробиологическая диагностика, осуществляется разработка методов микробиологической устойчивости почвы к антропогенным факторам. Так, при комплексном исследовании различных способов основной обработки выщелоченного чернозема отмечено стимулирующее воздействие на численность и активность диазотрофов, актинобактерий, фосфатмобилизующих, клетчаткоразрушающих микроорганизмов при комбинированной ярусной и чизельной обработке в сочетании с мелкой обработкой. Наибольшая активность различных физиологических групп микроорганизмов почвы отмечена в тех же вариантах, где наблюдается высокая урожайность. Для биологической характеристики последействия минеральных и органических удобрений наиболее значимыми являются численность микромицетов, фосфатмобилизующих микроорганизмов, азотфиксаторов, биологическая активность почвы.

Известкование выщелоченного чернозема является надежным средством увеличения биогенности почвы. В полевых опытах по известкованию отмечена корреляция между дозой извести, pH, численностью микромицетов и фитотоксичностью исследуемой почвы. Доза извести 1,0 г.к. не только оказывает активизирующее влияние на численность почвенных микроорганизмов, но и на получение наибольшего урожая. Разработанные критерии свидетельствуют, что почвенные микроорганизмы являются своеобразными биомаркерами антропогенного влияния на почву.

Важной составляющей биотехнологических исследований отдела агроэкологии и микробиологии является создание комплексных биопрепаратов на основе автохтонных микроорганизмов различных физиологических групп (азотфиксирующих, фосфатмобилизующих, углеводородокисляющих). Ассоциативные диазотрофы представляют наибольший интерес, так как служат переходными формами к созданию азотфиксирующих симбионтов важнейших сельскохозяйственных растений. Фосфатмобилизующие микроорганизмы способны переводить малодоступные для растений формы фосфатов из органических и неорганических источников в подвижные и легкоусвояемые соединения, которые определяют условия минерального питания растений тем самым, способствуя их активному росту, развитию и устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды. Штаммы диазотрофных и фосфатмобилизирующих микроорганизмов, синтезируя регуляторы роста, приводят к увеличению скорости роста растений, повышению их урожайности [1]. Помимо этого отличительной чертой создаваемых экологически безопасных биопрепаратов является комплексность их действия – они не только улучшают питание растений; подавляют развитие ряда болезней, но и способствуют повышению плодородия почвы.

Наиболее эффективные диазотрофные и фосфатмобилизующие микроорганизмы с высокой нитрогеназной и антагонистической активностью идентифицированы методом установления нуклеотидной последовательности 16S рРНК и депонированы в коллекции ФГУП ГосНИИгенетика: *Azotobacter chroococcum* 5 V(e) (ВКПМ: B-10387); *Pseudomonas brassicacearum* 26W(в) (ВКПМ: B-10388); *Sphingobacterium multivorum* 6 F(б) (ВКПМ: B-10385); *Achromobacter xylosoxidans* 5 F(б) (ВКПМ: B-10386).

Получены патенты Российской Федерации: «Штамм *Pseudomonas brassicacearum*, используемый для получения бактериального удобрения под зерновые, овощные и кормовые культуры» № 2453596; «Штамм *Sphingobacterium multivorum*, используемый для получения бактериального удобрения под томаты и огурцы» № 2458119; «Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum* 5 V(e) для получения бактериального удобрения под зерновые и кормовые культуры» № 2464308 [2–4].

Инокуляция созданными комплексными биопрепаратами на основе автохтонной микрофлоры и биобезопасных наноминералов способствует существенному снижению доз используемых азотных, фосфорных удобрений и себестоимости получаемой продукции, а также значительному повышению урожайности и устойчивости различных сельскохозяйственных культур к вредителям и болезням.

Еще одно направление исследований отдела агроэкологии и микробиологии связано с экологией. Загрязнение земель нефтью и нефтепродуктами является одной из значимых проблем для Татарстана в связи с тем, что значительные территории выводятся из активного землепользования из-за прорывов и утечек нефти. Как наиболее экономичный и эффективный следует выделить способ рекультивации почв с применением специализированной углеводородокисляющей микрофлоры [5]. Мы устанавливаем потенциал нефтезагрязненной почвы к самоочищению, то есть определяем, имеется ли в данной почве специфическая микрофлора; если имеется, то в каком количестве; изучаем, какую нагрузку эта почва может вынести, а именно порог устойчивости данной почвы к углеводородам; в соответствии с полученными данными проводим мониторинг нарушенной почвы. Сформированы эффективные солеустойчивые консорциумы углеводородокисляющих микроорганизмов. Они активно растут в присутствии нефтепродуктов до 10–12 % массы почвы, способны утилизировать различные нефтепродукты. Итак, из почв Татарстана выделены, изучены, идентифицированы и депонированы в Ведомственных коллекциях Российской Федерации (ВКПМ и RCAM) семь эффективных штаммов, а именно *Pseudomonas stutzeri* Р-1026; *Achromobacter insolitus* А-102; *Achromobacter xylosoxidans* А-10; *Micrococcus luteus* М-171; *Staphylococcus pasteuri* S1–717; *Staphylococcus pasteuri* S2–717 и *Staphylococcus warneri* S1. Получен патент № RU 2720199 C1 «Штамм микроорганизмов *Staphylococcus warneri* S1 в качестве деструктора углеводородов, содержащихся в почвах, загрязненных нефтью и нефтепродуктами» [6].

В Татарском НИИАХП ФИЦ КазНЦ РАН разработана технология биологической рекультивации нефтезагрязненных земель, которая внедрена в нефтедобывающих районах Татарстана. Эффективность этой технологии основана на использовании природных биологических процессов и позволяет более чем в три раза сократить сроки восстановления нефтезагрязненых территорий. Эффективность инновационной технологии основана на использовании природных процессов и позволяет значительно ускорить возврат нарушенных почв в сельскохозяйственный оборот. Сотрудники отдела проводят широкий спектр анализов, а именно определение численности агрономически значимых групп микроорганизмов, их суммарной биомассы и респираторной активности; морфо- и биометрических показателей проростков (фитотоксичность), энергии прорастания и всхожести семян, содержания углеводородов в почве и многое другое. Практически все сотрудники отдела агроэкологии и микробиологии являются выпускниками Казанского федерального университета. Мы находимся в постоянном творческом сотрудничестве и с учеными нашей родной кафедры микробиологии, и со специалистами ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии. Научный и кадровый потенциал и материально-технические возможности отдела агроэкологии и микробиологии позволяют развивать как прикладные, так и фундаментальные исследования в сфере биотехнологии, реализовывать новые направления на практике и тем самым расширить свою деятельность в регионе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мотина Т.Ю., et al. Биоудобрения комплексного действия на основе консорциума микроорганизмов и наноструктурных агроминералов для получения экологически безопасной продукции растениеводства // Вестник КТУ. – 2017; 20, 12: 119–122.
2. Патент № 2453596 РФ, МПК C12N1/20, A01N63/00, C12R1/38. Штамм *Pseudomonas brassicacearum*, используемый для получения бактериального удобрения под зерновые, овощные и кормовые культуры / И.А. Дегтярева et al.
3. Патент № 2458119 РФ, МПК C12N1/20, C05F11/08. Штамм *Sphingobacterium multivorum*, используемый для получения бактериального удобрения под томаты и огурцы / И.А. Дегтярева, et al..
4. Патент № 2464308 РФ, МПК C12N1/20, C05F11/08, C12R1/065. Штамм бактерий *Azotobacter chroococcum* 5 V(e) для получения бактериального удобрения под зерновые и кормовые культуры. / И.А. Дегтярева, et al.
5. Дегтярева И.А., et al. Создание и применение биоудобрения на основе эффективного консорциума микроорганизмов-деструкторов углеводородов для рекультивации нефтезагрязненных почв Республики Татарстан // Нефтяное хозяйство. 2017; 5: 100–103.
6. Патент № 2720199 РФ, опубликовано 27.04.2020. Штамм микроорганизмов *Staphylococcus warneri* S1 в качестве деструктора углеводородов, содержащихся в почвах, загрязненных нефтью и нефтепродуктами / Е.А. Прищепенко, et al.

УДК 57.085.23

ОСОБЕННОСТИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КЛЕЩЕВИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ СОРТОВ ЗАНЗИБАР ГРИН И ИМПАЛА БРОНЗОВАЯ

Н.Р. Петров, О.С. Александров

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

Клещевина обыкновенная (*Ricinus Communis* L.) является распространённой технической культурой. В процессе переработки из неё получают касторовое масло, а также рицинолевую кислоту, которые имеют широкое применение в народном хозяйстве (da Silva et al., 2006; Ogunniyi, 2006). При производстве касторового масла побочным продуктом производства является жмых, который в последствии могут применяться в качестве высокобелковых биодобавок в животноводстве (Кононенко, 2006). Проблемой применения жмыха клещевины является наличие фитотоксинов: белка рицина и алкалоида рицинина. Данные токсины оказывают негативное действие на организм, вызывая расстройства ЦНС, свертывание крови и необратимое разрушение тканей (de Souza L.C.M. et al, 2018). В связи с этим весьма актуальным является вопрос детоксификации клещевины.

При детоксификации данных токсинов жмыхи подвергают термическим и химическим обработкам, что в дальнейшем отрицательно влияет на качество получаемого белка. Перспективным является поиск новых путей детоксификации. Одним из самых вариантов решения проблемы является геномное редактирование с помощью технологиеи CRISPR/Cas9. В данной работе представлены результаты агробактериальной трансформации клещевины как необходимая часть данной технологии.

Работа проводилась на донорных асептические растениях, полученных из семян отечественного сорта клещевины обыкновенной Импала Бронзовая. Перед проращиванием семена подвергали стерилизации в 96 % этаноле и хлорсодержащем дезинфекторе, после чего проращивали на безгормональной среде MS в течение 2–3 недель. В качестве доноров приоритет отдавался молодым субтильным растениям, из которых в дальнейшем получали экспланты. В качестве экспланов использовались различные сегменты растения: гипокотили, черешки и пластинки семядольных листьев, а также пластинки настоящих листьев.

Для инокуляции около 150 экспланов помещали в неагаризованую среду MS с добавлением бактериальной суспензии, после чего их переносили на безгормональную твёрдую среду MS для сокультивации. На третьи сутки экспланты переносили для отмывки от остатков бактериальной смеси в жидкую среду MS с добавлением антибиотика (400 мг/л амоксиклава). Дальнейшую культивацию проводили на питательной среде MS с добавлением 1 мг/л зеатина, 0,1 мг/л ИУК, 1 г/л амоксиклава, 10 мг/л гигромицина.

Исследование показало, что на 6–7 сутки на эксплантах проходят активные процессы каллусогенеза. В вариантах из гипокотилей и черешков каллус образовывался на местах срезов. В вариантах с семядольными листьями каллусообразование наблюдалось на прилегающей к среде поверхности. На 11–13 сутки у черешков и гипокотилей образовывались меристематические очаги, развивающиеся в дальнейшем по пути геммогенеза.

Из растительного материала полученных образований выделяли ДНК методом CTAB (Doyle and Doyle, 1990), полученные образцы подвергали ПЦР-анализу, который показал трансгенную природу полученных регенерантов клещевины обыкновенной.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 19–76–00040 «Создание перспективного материала для селекции клещевины на отсутствие рицина».

ЛИТЕРАТУРА

1. da Silva, N.L., Maciel, M.R.W., Batistella, C.B. and Filho, R.M. (2006). Optimization of biodiesel production from castor oil. Appl. Biochem. Biotechnol. 130: 405–14
2. Ogunniyi D.S. Castor oil: a vital industrial raw material //Bioresource technology. – 2006. – Т. 97. – №. 9. – С. 1086–1091.
3. Кононенко С.И. Влияние режимов влаготепловой обработки клещевины на продуктивность свиней // Сборник научных трудов Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства. 2006. Т. 1. – №. 1.
4. de Souza L.C.M. et al. Cell toxicity by ricin and elucidation of mechanism of Ricin inactivation //International journal of biological macromolecules. – 2018. – Т. 113. – С. 821–828.
5. Doyl J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue //Focus. – 1990. – Т. 12. – С. 13–15.

УДК 577.151.4

ХАРАКТЕРИСТИКА СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЫСОКОСТАБИЛЬНОЙ В-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ИЗ *DESULFUROCOCCUS AMYLOLITICUS*

В.Р. Сергеев[1,2], Ю.В. Киль[1,3], Ибатуллин Ф.М.[1], Г.Н. Рычков[1,2,3]

[1] Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия
[2] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
[3] Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Гатчина, Россия

Термофильные микроорганизмы являются важными источниками ферментов, обладающих высокой температурной стабильностью и потенциалом промышленного применения. Одним из таких ферментов является бета-галактозидаза, которая применяется, например, для получения глюкозо-галактозной патоки из лактозы, производства безлактозной молочной продукции, синтеза пребиотиков-галактоолигосахаридов. Основным недостатком многих термостабильных ферментов является низкая каталитическая активность. В настоящее время развиваются подходы, позволяющие оптимизировать соотношение активность / стабильность фермента и корректировать субстратную специфичность и механизм реакции, ориентируясь на конкретные биотехнологические процессы (1–2).

Мы клонировали, секвенировали и экспрессировали в клетках *E. coli* ген β-галактозидазы из гипертермофильной археи *Desulfurococcus amyloliticus*. Очищенный до практической гомогенности фермент обладает следующими ферментативными активностями: расщепляет лактозу, орто- и пара-нитрофенил-β-галактозиды, и с меньшей эффективностью β-D-паранитрофенил-глюкозид. Пара-нитрофенил-маннозид, пара-нитрофенил-тиогалактозид и β-N-фенил-галактозид не расщеплялись ферментом. Анализ влияния различных ионов на ферментативную активность показал, что основные «пищевые» ионы (K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^- и др.) не оказывают заметного влияния на активность. В то же время катионы Cu^{+2} в миллимолярных концентрациях сильно инактивируют фермент. Активаторы фермента обнаружены не были. Обработка фермента пара-хлор-меркурий-бензоатом приводила лишь к 30 % потере активности. Фермент характеризуется высокой термостабильностью: для реакции гидролиза лактозы при pH=5 температурный оптимум составляет примерно 100ºC.

Методом ТСХ на силикагеле установили, что при концентрациях субстратов $\leq K_M$ основной реакцией является гидролиз. При повышении концентрации исходных субстратов и при введении в реакционную смесь альтернативных воде низкомолекулярных акцепторов галактозильной группы, таких как спирты, полиолы и углеводы, наблюдали дополнительные продукты реакции трансгликозилирования. Качественный анализ методом ТСХ показал, что предпочтительными акцепторами являются низкомолекулярные спирты (метанол, этанол, изопрапанол, бутанол), тогда как сами углеводы и альдиты являются значительно худшими акцепторами галактозильной группы при расщеплении субстрата. К хорошим акцепторам также можно отнести субстраты пара-β-нитрофенил и орто-β-нитрофенил галактозиды: их расщепление при концентрациях порядка $5K_M$ сопровождается значительным образованием димеров и триммеров, являющихся продуктами, которые, в конечном итоге, расщепляются до галактозы и нитрофенола. Показали, что метил- и глицерол-галактозиды, образующиеся в результате трансгликозилирования в присутствие альтернативных акцепторов галактозильной группы также расщепляются ферментом. Поэтому реакция гидролиза будет основной при умеренных начальных концентрациях субстратов и продолжительных временах инкубации. При высоких концентрациях субстратов реакция ингибируется увеличивающимися концентрациями галактозы, которая являются сильным конкурентым ингибитором.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li, Y., & Cirino, P.C. (2014). Recent advances in engineering proteins for biocatalysis. *Biotechnology and Bioengineering, 111*(7), 1273–1287.
2. Rigoldi, F., Donini, S., Redaelli, A., Parisini, E., & Gautieri, A. (2018). Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. *APL bioengineering, 2*(1), 011501.

УДК 637.056

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИНГЕРОЛА ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ВАРЕНЫХ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ

А.А. Валишев, С.В. Мурашев

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

Гингерол – химическое соединение растительного происхождения, которое содержится в корне и в надземной части растения имбирь (*Zingiber officinale*). Содержание гингерола в корневище составляет 10–15 % от сухого вещества, а в пищевых продуктах 1–5 % от их массы. Он входит в группу растительных алкалоидов. Являясь биоактивным компонентом, оказывает широкое воздействие на организм человека. Он устраняет воспалительные процессы, обладает обезболивающим действием, а также ускоряет обменные процессы [1]. В мышечной и жировой тканях он ингибирует образование малонового диальдегида (МДА), образующегося в результате перекисного окисления липидов, повышает активность супероксиддисмутазы (СОД) и эффективно влияет на активность каталазы. Кроме того, он активизирует Na±K±АТФазу и снижает проницаемость клеточной мембраны. К числу его достоинств относится способность улучшать метаболизм ишемических органов, уменьшать содержание молочной кислоты и, следовательно, предупреждать метаболический ацидоз, его суточная норма рассчитывается исходя из веса человека – на 1 кг достаточно 0,2 г гингерола [2].

Необходим отметить, что гингерол оказывает ингибирующее влияние на жизнеспособность микроорганизмов, он замедляет синтез ДНК в клетках *Helicobacter pylori, Escherichia coli, Bacillus cereus*, подавляет рост грамположительной и грамотрицательной микрофлоры. Гингерол является активным фитонутриентом, оказывая бактерицидное действие путем апоптоза и аутофагоцитоза; ингибирует клеточную адгезию, инвазию, подвижность и активность клеток. Добавление гингерола снижает pH среды, что способствует снижению обсемененности продукции патогенной микрофлорой и является важным для мясной промышленности [3]. Следует подчеркнуть, что термическая обработка не влияет на антибактериальную способность гингерола.

Гингерол применяется в различных формах: экстракта; капсул; эфирного масла; порошка.

Гингерол придает имбирю специфический мятно-горьковатый привкус. Именно поэтому мы ограничили содержание гингерола в готовых колбасных изделиях величиной 2,0 %, предотвратив этим ухудшение органолептических показателей, что подтверждается проведенными исследованиями.

Гингерол улучшает функционально-технологические характеристики фарша, прежде всего такие важнейшие из них, как влагосвязывающая, влагоудерживающая и жироудерживающая способности, что обусловлено особенностями структуры его молекулы. Влагосвязывающая способность увеличивается во всех модельных фаршах при добавлении гингерола более 1,0 %, что связано с его эмульгирующим действием на фарш [4].

Применение наноэмульсий и наночастиц усиливает антабактериальный эффект. Эфирное масло на основе гингерола использовалось для получения наноэмульсионного покрытия, что значительно увеличивало антибактериальный потенциал активной защиты. Такие съедобные содержащие гингерол наноэмульсионные покрытия значительно снижали общее количество аэробных психрофильных бактерий в охлажденном курином филе в течение 12 дней [5].

Установлен синергетический антимикробный эффект от действия гингерола и наночастиц серебра. Показано, что экстракт имбиря может использоваться в биоразлагаемых нанокомпозитных упаковочных пленках, которые обладают антимикробной активностью в отношении таких распространенных пищевых патогенов как *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus*, при наличии превосходных механических свойств, водо- и светонепроницаемости по сравнению с контрольными пленками [6].

Целью исследования было изучить влияние гингерола на микробиологические, антиоксидантные и физико-химические показатели вареных колбасных изделий и рассмотреть возможность его использования в качестве регулятора стабильности мясных продуктов.

Объектами исследований являлись вареные колбасные изделия, изготовленные из куриного фарша, согласно разработанной рецептуре в соответствии с ГОСТ Р 52196–2011 «Изделия колбасные вареные. Технические условия» [7]. В качестве сырья использовали мясо цыплят-бройлеров. Гингерол перед использованием смешивали с водой в соотношении 1:10 (вода: гингерол).

В куриный фарш раствор добавляли небольшими порциями, постоянно перемешивая. Фарш наполняли в коллагеновую оболочку при помощи шприцовочного аппарата. Затем получившиеся изделия подвергали осадке и термической обработке, согласно технологической инструкции. После термической обработки следовало охлаждение. Контрольный образец не содержал гингерола, а в опытные образцы добавляли гингерол в количестве 1,0, 1,5 и 2,0 % к массе фарша. Готовые образцы хранили в холодильной камере в течение 14 суток при температуре +2…+4 °С.

Микробиологическое исследование осуществляли методом десятикратных разведений, с посевом на жидкие и плотные селективные агаризированные и на биохимические среды. Антиоксидантное действие гингерола проверяли определяя перекисное и тиобарбитуровое числа, согласно стандартным методикам [8, 9], а также феррициадным способом [10].

Для проведения микробиологического исследования делали десятикратные разведения продукта, которые потом сеяли на селективные жидкие питательные среды. Первое разведение высевали на ГМФ-агар для выявления КМАФАнМ и агар Сабуро для выявления дрожжей. Посевы делали через контрольные промежутки времени на протяжении всей продолжительности хранения. Все посевы выдерживали в термостате при 37 °С 24 часа.

Поскольку главным органолептическими показателями для потребителей вареных колбасных изделий являются цвет и вкус, то в нашей исследовательской работе мы проверили при какой концентрации гингерола происходит изменение вкуса и цвета вареных колбасных изделий. Выяснилось, что при превышении концентрации гингерола 2,0 % к массе мясного сырья появляется специфический жгучий мятно-горьковатый привкус, а цвет приобретает желтоватый оттенок. Именно по данной причине было решено ограничить концентрацию гингерола 2,0 %.

Органолептическая оценка всех образцов вареных колбасных изделий проводилась согласно методикам по ГОСТ 9959–2015 [11] и в соответствии с нормативными данными по ГОСТ Р 52196–2011 [7].

В течение всего времени хранения осуществлялись органолептическое и микробиологическое исследования, а также исследование антиоксидантной активности, на основании которых выявлялась оптимальная концентрация гингерола с наибольшей эффективностью действия.

Органолептические исследования позволяют рекомендовать к использованию концентрацию гингрола 1,5…2,0 % к массе фарша. Превышение этой концентрации приводит к ухудшению прежде всего вкусо-ароматических показателей.

После обработки результатов органолептических исследований были построены профилограммы, отражающие среднее значение наиболее важных показателей, которые представлены на рисунке 1.

Параллельно с органолептическими проводились микробиологические исследования. Сразу после изготовления вареных колбасных изделий было проведено исследование с целью проверки качества термической обработки. Результаты дальнейших микробиологических исследований, полученных в ходе хранения продукции, считаются достоверными, поскольку исследования, проведенные сразу же после термической обработки, не показали рост микроорганизмов.

Микробиологическое исследование на третьи сутки хранения доказало, что добавление гингерола способствует ингибированию роста бактерий группы кишечной палочки и *Bacillus cereus*. Так при посеве контрольного образца обнаружены колонии, характерные для роста БГКП в количестве 50 КОЕ/г и *Bacillus cereus* в количестве 10 КОЕ/г. Это свидетельствует о начале микробиологической порчи. При пересеве образца с 1,0 % гингерола обнаружены колонии лактозонегативных энтеробактерий в количестве 20 КОЕ/г и 7 КОЕ/г *Bacillus cereus*. Это свидетельствует о том, что при незначительной концентрации гингерола ингибируется рост *Bacillus cereus* и БГКП. При посеве образцов с 1,5 % гингерола обнаружились только колонии *Bacillus cereus* в количестве 4 КОЕ/г, что показывает полное ингибирование роста бактерий группы кишечной палочки в мясных изделиях. При пересеве разведений образцов с 2,0 % гингерола не обнаружилось признаков роста колоний. Роста колоний, характерных для дрожжей, кокковой микрофлоры и бактерий рода *Salmonella* не было обнаружено ни в одном исследуемом образце. Эти данные позволяют сделать вывод, что с увеличением концентрации гингерола снижается количество колоний микроорганизмов, т. е. ингибируется их рост и развитие, что отражается на качестве и сроках хранения продукта.

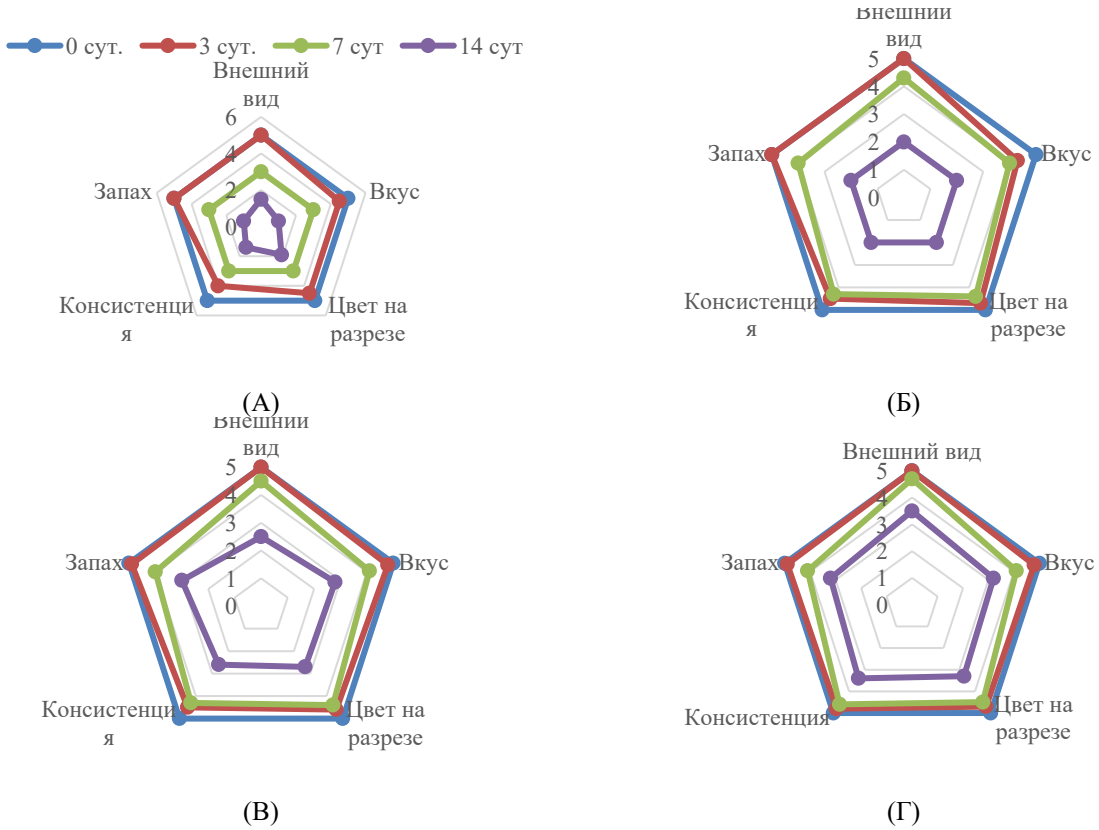


Рис. 1. Профилограммы изменений органолептических показателей образцов вареных колбасных изделий: А) контрорль; Б) с добавлением 1,0 % гингерола; В) с добавлением 1,5 % гингерола Г) с добавлением 2,0 % гингерола на протяжении 14 суток хранения

Микробиологическое исследование показало, что при посеве разведений с образцов вареных колбасных изделий с гингеролом выросло меньшее число колоний, а также что это были колонии микроорганизмов, не относящихся к исследованным группам микроорганизмов. В контрольном образце после 7 суток хранения были обнаружены колонии *Bacillus cereus* и *Bac. subtilis* в количестве 160 КОЕ/г, колонии бактерий группы кишечной палочки в количестве 100 КОЕ/г, колонии энтеробактерий, подобным бактериям рода *Salmonella* в количестве 30 КОЕ/г, колонии атипичной кокковой микрофлоры в количестве 30 КОЕ/г и колонии дрожжей в количестве 21 КОЕ/г. При посеве образцов с 1,0 % гингерола колоний выросло в 1,5–3 раза меньше, чем при посеве контрольного образца. При посевах образцов вареных колбасных изделий с 1,5 % гингерола выросли колонии бактерий рода *Yersinia*. При посевах образцов с 2,0 % гингерола выросла только колония *Bac. subtilis*. Это является ярким свидетельством того, что с увеличением содержания гингерола уменьшается количество колоний или же они не растут вовсе.

Микробиологическое исследование на 14 сутки показало, что ингибирующее действие гингерола на микроорганизмы стало снижаться. Контрольный образец был обсеменен наибольшим количеством микроорганизмов. При посеве образцов с 1,0 и 1,5 % гингерола колоний в 10 раз меньше, чем в контрольном образце. Однако у образцов с 2,0 % количество колоний было более чем в 100 раз меньше в сравнении с контрольным образцом и в 1,5–2 раза меньше чем у образцов с 1,5 и 1,0 %, соответственно. Т.е. образцы вареных колбасных изделий с содержанием гингерола 2,0 % были стабильными с микробиологической точки зрения и могли храниться дольше образцов с меньшим содержанием гингерола и гораздо дольше контрольного образца.

Количество колоний микроорганизмов измеряли путем прямого подсчета.

Антиоксидантные свойства проявились во всех образцах вареных колбасных изделий с добавлением гингерола, что было показано в ходе исследования антикосидантных свойств изделий с его добавлением. Процесс окисления липидов в вареных колбасных изделиях начинается с образования перекисей.

Окислительные и гидролитические превращения липидов неизбежны при хранении любого продукта питания. Они приводят к значительному ухудшению органолептических свойств вареных колбас, снижают их пищевую ценность. В условиях длительного хранения термически обработанных продуктов появляются прогорклый вкус или запах и вкус осаливания. Окислительные изменения продукта происходят за счет изменения химического состава липидов [12].

В вареных колбасных изделиях без гингерола в процессе хранения перекисное число возросло в 3,56 раза, а в образцах с содержанием гингерола 1,0 %, 1,5 % и 2,0 % оно выросло соответственно в 2,23 раза, в 1,8 и в 1,63 раза по сравнению с начальным этапом хранения каждого из образцов (0 суток). Через 7 суток хранения в опытных образцах вареных колбасных изделий перекисное число было во всех случаях меньше, чем в контрольном образце, причем с увеличением содержания гингерола его величина уменьшалась по сравнению с контрольным образцом. Так при 1,0 % гингерола перекисное число было в 1,14 раза меньше, при 1,5 % гингерола оно было уже в 1,48 раза меньше, а в образце вареных колбасных изделий с 2,0 % гингерола оно оказалось наименьшим, а именно оно было в 2 раза меньше, чем в контрольном образце.

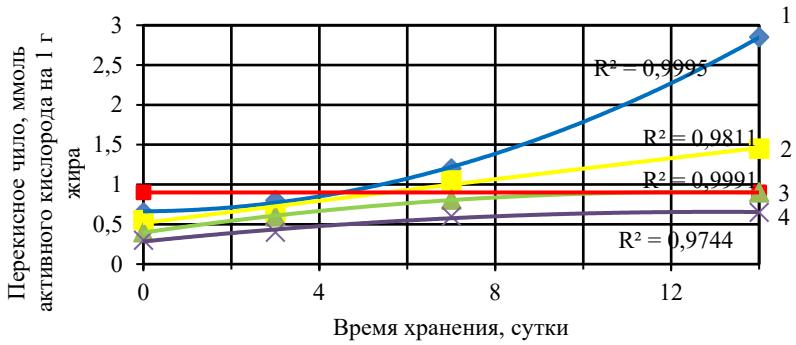


Рис. 2. Зависимость изменения перекисного числа от длительности хранения: 1 – контроль; 2 – образец с 1,0 % гингерола; 3 – образец с 1,5 % гингерола; 4 – образец с 2,0 % гингерола. Красная линия – ПДК для несвежего жира

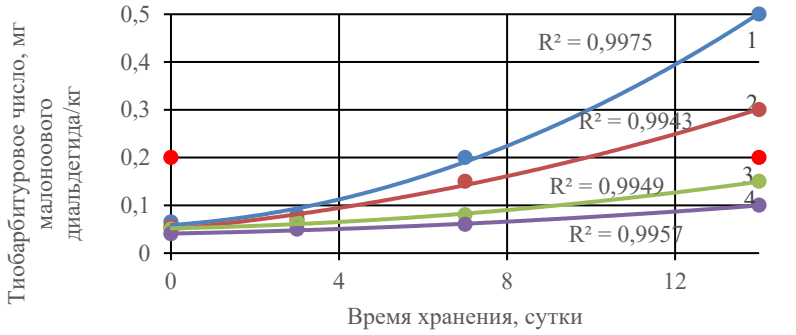


Рис. 3. Зависимость изменения тиобарбитурового числа от длительности хранения: 1 – контроль; 2 – образец с 1,0 % гингерола; 3 – образец с 1,5 % гингерола; 4 – образец с 2,0 % гингерола. Красная линия ПДК для несвежего жира

Результаты исследования тиобарбитурового числа – миллиграмм малонового диальдегида (МДА) на килограмм продукта – оказались следующими. В контрольном образце в начале хранения уровень тиобарбитурового числа составлял 0,065 мг МДА/кг, а в конце хранения 0,5 мг МДА/кг. Таким образом, за время хранения тиобарбитуровое число в контрольном образце увеличилось в 7,7 раз. В образце вареных колбасных изделий с содержанием гингерола 1,0 % начальный уровень тиобарбитурового числа составлял 0,055 мг МДА/кг, а на 14-е сутки хранения 0,3 мг МДА/кг, т. е. тиобарбитуровое число увеличилось за время хранения в 5,45 раз. В образце вареных колбасных изделий с содержанием гингерола 1,5 % начальный уровень тиобарбитурового числа составлял 0,05 мг МДА/кг, а на 14-е сутки хранения 0,15 мг МДА/кг, т. е. тиобарбитуровое число увеличилось за время хранения в 3 раза. В образце вареных колбасных изделий с содержанием гингерола 2,0 % начальный уровень тиобарбитурового числа составлял 0,04 мг МДА/кг, а на 14-е сутки хранения 0,1 мг МДА/кг, т. е. тиобарбитуровое число увеличилось за время хранения в 2,5 раза.

Показатели антиоксидантной активности, определенные на основании измерения перекисного и тиобарбитурового чисел в вареных колбасных изделиях с гингеролом в процессе хранения при +2…+4 °С были меньше значений, установленных в соответствии с Правилами в области ветеринарии по проведению ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и других продуктов убоя (Минсельхоз от 22.03.2017) [13].

Полученные результаты подтвердили, что как водные, так и спиртовые экстракты гингерола обладают антиоксидантными свойствами. Их антиоксидантная активность обусловлена тем, что молекулы гингерола могут служить донорами электронов, что способствует инактивации свободных радикалов, предотвращая тем самым их разрушающее действие. Более ярко выраженную антиоксидантную активность показал водный экстракт. Действие экстракта гингерола происходит по следующему механизму [14]: **H ➔ H+ + e- R++ e- ➔ R**

В результате этого процесса происходит понижение pH, что ингибирует рост и развитию микрофлоры, и генерируются электроны, препятствующие окислению липидов и возникновению свободных радикалов. Т.е. происходит микробиологическая и антиоксидантная стабилизация вареных колбасных изделий и увеличение срока хранения.

Результаты наших экспериментов по влиянию гингерола на качественные показатели мяса и мясных продуктов, подтверждаются результатами других исследований [15–17], в ходе которых в мясные полуфабрикаты добавлялся гингерол в порошкообразной форме.

Проведенные исследования позволили выявить следующее. Гингерол обладает положительным влиянием на микробиологическую стабильность вареных колбасных изделий, он позволяет увеличить сроки хранения вареных колбасных изделий до 2х раз по сравнению с контрольным образцом при концентрации гингерола 2,0 % с сохранением органолептических показателей. Гингерол ингибирует рост широкого спектра микроорганизмов. Таким образом, образец вареных колбасных изделий с 2,0 % гингерола показал максимальную микробиологическую стабильность при хранении с наличием приятной органолептики.

Гингерол обладает антиоксидантным действием, что показали измерения перекисного и тиобарбитурового чисел. Степень окисления жиров была наименьшей в образцах вареных колбас с содержанием гингерола 2,0 %.

Таким образом, гингерол можно использовать в качестве многофункциональной добавки для улучшения микробиологических, антиоксидантных, физико-химических и органолептических показателей вареных колбасных изделий и продления их срока годности.

ЛИТЕРАТУРА

1. http://biohimik.net/aktivnye-soedineniya-imbirya-i-ikh-terapevticheskoe-primenenie-v-kachestve-dopolnitelnogo-lekarstva
2. : https://www.kleo.ru/items/zdorovie/poleznie-svoistva-imdirya.shtml
3. http://www.rusnauka.com/6_PNI_2018/Agricole/4_234042.doc.htm
4. Soheila Noori, Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (Zingiber officinale) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets // Food Control, Volume 84, February 2018, P. 312–320
5. Shiji Mathew, Biodegradable and active nanocomposite pouches reinforced with silver nanoparticles for improved packaging of chicken sausages // Food Packaging and Shelf Life, Vol. 19, 2019, P. 155–166
6. Yumin Cao, Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage //Food Chemistry, Vol. 141, Issue 3, 2013, P. 1655–1660
7. ГОСТ Р 52196–2011. Изделия колбасные вареные. Технические условия
8. ГОСТ 34118–2017. Мясо и мясные продукты. Метод определения и измерения перекисного числа
9. ГОСТ Р 55810–2013 Мясо и мясные продукты. Метод определения тиобарбитурового числа
10. ГОСТ 9959–2015 Мясо и мясные продукты. Общие условия проведения органолептической оценки
11. Артемьева В.А и др.. Исследование антиоксидантных свойств пряностей, зира, имбирь и кардамон // Пищевые инновации и биотехнологии материалы IV Международной научной конференции, 2016, с. 18–19
12. Гоноцкий В.А., Гоноцкая В.А., Красюков Ю.Н., Филиппова Г.В. Обеспечение химической стабильности рубленных полуфабрикатов из мяса индейки // Птица и птицепродукты, выпуск № 3, 2016, с. 22–24
13. Правила в области ветеринарии по проведению ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и других продуктов убоя (Минсельхоз от 22.03.2017)
14. Мурашев С.В., Воробьев С.А., Жемчужникова М.Е. Влияние обработки охлажденного мяса на корреляцию между pH и красным цветом // Все о мясе – теория и практика переработки мяса № 3, июнь 2012, с. 38–41
15. Simone Mancini, Gisella Paci, Filippo Fratini and others Improving pork burgers quality using Zingiber officinale Roscoe powder (ginger) // Meat Science, Vol. 129, 2017, Pages 161–168
16. Wenhui Si, Yan Ping Chen, Jianhao Zhang, Zhen-Yu Chen, Hau Yin Chung Antioxidant activities of ginger extract and its constituents toward lipids // Food Chemistry Vol. 239, 2018, Pages 1117–1125
17. Blessing OM. Oyedemi E.M. Kotsia, Paul D. Stapleton Simon Gibbons Capsaicin and gingerol analogues inhibit the growth of efflux-multidrug resistant bacteria and R-plasmids conjugal transfer // Journal of Ethnopharmacology, Vol. 245, 2019.

УДК. 631.147.636.3

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ СЕЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Н.А. Волкова, Б.С. Иолчиев, В.А. Багиров, Н.А. Зиновьева

ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, п. Дубровицы, Московская область, Россия

Совершенствование существующих и создание новых пород сельскохозяйственных животных невозможно без достаточного разнообразия генетических ресурсов. Многочисленные породы сельскохозяйственных животных являются результатом длительной целенаправленной селекции. Вместе с тем, под воздействием экономических факторов в последнее время наблюдается сужение генетического разнообразия: коммерческие породы вытесняют локальные, характеризующиеся, как правило, более низкими показателями продуктивности. Однако локальные породы хорошо адаптированы к определенным природно-климатическим условиям, что делает их ценным генетическим материалом для использования в селекционных программах, т. к. разведение одной и той же 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. С развитием вспомогательных репродуктивных технологий значительно возросла эффективность использования отдаленной гибридизации для создания новых селекционных форм.

Нами были получены и изучены межвидовые гибриды от скрещивания самок овец романовской породы с самцом архаром. Первоначально были получены межвидовые гибриды F1, которые в последующем были использованы для осеменения самок романовской породы. От 43 овцематок было получено 89 гибридных ягненка: 42 самца и 47 самок. Количество молодняка в приплоде варьировало от 1 до 4 ягнят. От 11 овцематок было получено по одному ягненку, от 21 матки – двойни, от 8 овцематок – тройни, и от 3 овцематок – по 4 ягненка. 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 40,0 %, что было на 37 % ниже по сравнению с данным показателем, установленным для молодняка романовской породы.

Живая масса гибридных ягнят при рождении варьировала от 1,80 до 6,30 кг и составила в среднем 2,98±0,25 кг. Среднесуточный прирост у данных гибридных животных до 3 месячного возраста был на уровне 113 г., до 6-ти месячного возраста – 90 г. У чистопородных ягнят романовской породы (исходная материнская форма) данный показатель был выше на 46,9 и 68,9 %, соответственно. Гибридные животные также уступали своим чистопородным аналогам по ряду промеров отдельных статей тела. Значительные различия были установлены по косой длине туловища и составили в возрасте 42 дней, 3 и 6 месяцев 19,6 %, 27,9 % и 42,1 %, соответственно. В ранний период онтогенеза гибриды также имели более высокий индекс костистости, отражающий развитие костной ткани (+12,9 %). В последующие периоды онтогенеза данные различия с чистопородными животными нивелировались и не превышали 0,1–0,5 %.

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 и в рамках государственного задания, рег. № АААА-А18–118021590132–9.

УДК 575.113 + 581.131

ОЦЕНКА СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ГЕН-НОКАУТНЫХ СОРТОВ ХЛОПЧАТНИКА

В.С. Камбурова, Ш.Э. Шерматов, И.Б. Салахутдинов, О.С. Чарышникова, Г.Ф. Маматкулова, Ф.С. Раджабов, Ш.Х. Маматкулова

Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

Доля сельскохозяйственных земель, на которые негативно влияет высокая засоленность, увеличивается во всем мире из-за естественных причин и методов ведения сельского хозяйства (Zhang et al., 2014). Эта проблема усугубляется развитием более современных методов ведения сельского хозяйства, таких как ирригация. Приблизительно 20 % обрабатываемых земель в мире и более половины всех орошаемых земель подвержены засолению (Arzani, 2008). В связи с этим проблема создания солеустойчивых сортов и линий сельскохозяйственных культур, включая хлопчатник, является одной из актуальных задач современной селекции.

РНК интерференция (RNAi) позволяет создавать «биотехнологические» сорта сельскохозяйственных культур, включая хлопчатник, путем подавления экспрессии нежелательных генов (Abdurakhmonov et al., 2016). Одним из наиболее успешных примеров коммерциализированных RNAi сортов хлопчатника является создание узбекскими учеными на основе технологии нокаута гена фитохрома А1 (*PHYA1*) биотехнологических сортов хлопчатника серии «Порлок», у которых одновременно улучшено качество волокна, урожайность, раннеспелость, устойчивость к абиотическим стрессам, включая засухо- и солеустойчивость (Abdurakhmonov et al., 2014).

Вместе с тем, необходимо отметить, что в настоящее время все большее внимание уделяется роли активных форм кислорода и антиоксидантной системы в развитии физиологических реакций растений на различные стрессовые воздействия, включая солевой стресс (Колупаев, Карпец, Ястреб, 2017; Lamaoui et al., 2018). При этом многими исследователями установлено наличие взаимной связи между активностью ферментов антиоксидантной системы и степенью устойчивости растений к засолению (Nouman et al., 2018; Saini et al., 2018). Кроме того, известно, что при абиотических стрессах изменяется ряд биохимических параметров листьев хлопчатника, таких как жирнокислотный состав (Zhang et al., 2013), содержание пролина (Zhang et al., 2014), водорастворимых сахаров и крахмала (Peng et al., 2016), и данные параметры также могут быть использованы для отбора стрессоустойчивых сортов при селекции хлопчатника. Вместе с тем, имеются данные о том, что фитохромы могут принимать участие в развитии стрессоустойчивости через систему фитогормонов (Ullah et al., 2018).

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось оценка солеустойчивости ген-нокаутных сортов хлопчатника серии Порлок, полученных путем RNAi гена фитохрома А1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили ген-нокаутные и немодифицированные сорта и линии хлопчатника, выращенные в условиях фитотрона.

Для экстракции ферментов навеску замороженных листьев (0,3 г) измельчали в мелкий порошок, используя ступку, помещенную в ледяную баню, и пестик, который предварительно охлаждали жидким азотом, и гомогенизировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 1 мМ аскорбата и 2 % (в/об) поливинилполипирролидона. Затем гомогенаты центрифугировали при 20 000 g в течение 30 минут при 4° С. Активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли по методу Foster и Hess (1980). Общая активность каталазы (CAT) измерялась в соответствии с методом, описанным Beers и Sizer (1952), с небольшими изменениями. Активность аскорбат пероксидазы (APX) определяли согласно Nakano и Asada (1981). Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по накоплению малонового диальдегида (МДА) (Heath, Packer, 1968).

Содержание растворимых сахаров и крахмала в собранных экстрактах определяли антроновым методом (Seifter et al., 1950). Содержание сахарозы анализировали в ресуспендированном супернатанте в соответствии с ранее описанными протоколами (Hendrix, 1993). Содержание пролина в тканях корня и листьев измеряли по реакции с нингидрином (Bates et al., 1973).

Липиды были метил-этерифицированы 0,4 М раствором KOH, содержащем метанол и смесь равных объемов бензена и петролейного эфира (1:1, об/об), согласно методу Yu, Su (1996). Метиловые эфиры жирных кислот (ЖК) разделялись методом газовой хроматографии на газовом хроматографе (Shimadzu GC-17A или аналогичный), оснащенном водородным пламенным детектором и капиллярной колонкой SP-2330 (15 м × 0.32 мм). Температура колонки изотермическая 165^0 С, температура детектора – 250^0 С.

Для определения уровня салициловой кислоты 200 мг навески порошка растертых в жидком азоте листьев хлопчатника дважды экстрагировали 0,75 мл MeOH/H_2 O/HOAc=90:9:1 (об.) в течение 1 мин на вибромешалке “Vortex”, центрифугировали при 10000 об/мин в течение 1 мин. Экстракты объединяли и упаривали на роторном испарителе, досушивали на лиофильной сушке. Остаток диспергировали в 0,2 мл 0,05 % растворе уксусной кислоты в 15 % водном ацетонитриле на вибромешалке “Vortex”. После центрифугирования супернатант анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu Prominence LC20, включающей 4-х градиентный насос с дегазатором, диодно-матричный детектор и ручной инжектор с петлей на 20 мкл. Колонка – Supelco Discovery HS C18 (4,6×75 мм, 3 мкм), режим элюирования – изократический, подвижная фаза – 25 % водный ацетонитрил, содержащий 0,1 % ортофосфорной кислоты, скорость потока 0,7 мл/мин, детекция – 235 нм/щель 4 нм. Объем пробы 20 мкл.

Все данные были подвергнуты дисперсионному анализу (ANOVA). Данные представлены как средняя ± стандартная ошибка. Значимость различий между средними значениями определяли с помощью теста Туки. Различия в $P \leq 0,05$ считались значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в большинстве сельхозкультур, включая хлопчатник, повышенные уровни активности антиоксидантных ферментов рассматриваются как один из возможных механизмов устойчивости к абиотическим стрессам и могут являться маркерами устойчивых сортов (Hasan et al., 2018). Кроме того, анализ литературы показал, что солевой стресс вызывает активацию ПОЛ, которое часто используется в качестве индикатора вызванного солевым стрессом окислительного повреждения в мембранах (Hernandez et al., 2002). При этом у солеустойчивых растений уровень накопления МДА – конечного продукта окисления мембранных липидов снижен по сравнению с неустойчивыми сортами.

Учитывая эти данные, а также основываясь на данных об устойчивости ген-нокаутных сортов серии Порлок к абиотическим стрессам (Abdurakhmonov et al., 2014), было проведено сравнительное исследование накопления продуктов ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной системы (рис. 1).

Результаты экспериментов показали, что накопление МДА было выше у немодифицированных сортов по сравнению с модифицированными линиями сортами, имеющими в геноме конструкцию с вектором к гену *PHYA1* (рис. 1, A). При этом наибольшее накопление продуктов ПОЛ наблюдалось у линий Кокер-312, а наименьшее у ген-нокаутной линии T_{1-7}.

Далее была исследована сравнительная активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и аскорбатпероксидаза (APX) у RNAi сортов хлопчатника (рис. 1, B-D). При этом активность всех антиоксидантных ферментов (SOD, CAT и APX) значительно различалась между разными генотипами и коррелировала с наличием векторной конструкции в генотипе (активность ферментов в листьях ген-нокаутных линий и сортов была достоверно выше по сравнению с контрольным генотипом Кокер-312). При этом способность поддерживать более высокую активность этих антиоксидантных ферментов приводило к более низкому уровню ПОЛ, более высокой стабильности мембран и, следовательно, более высокой засухо- и солеустойчивости сортов серии Порлок. Эти результаты хорошо коррелируют с литературными данными об активности ферментов системы антиоксидантной защиты хлопчатника при солевом стрессе (Abdurakhmonov et al., 2014).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что система антиоксидантной защиты ген-нокаутных линий и сортов хлопчатника с векторной конструкцией к гену фитохрома A1 имеет большую активность по сравнению с исходными и родительскими сортами и позволяют заключить о большей устойчивости модифицированных сортов к абиотическим стрессам.

Из литературных данных известно, что при абиотических стрессах изменяется ряд биохимических параметров листьев хлопчатника, таких как жирнокислотный состав (Zhang et al., 2013), содержание пролина (Zhang et al., 2014), водорастворимых сахаров и крахмала (Peng et al., 2016), содержания салициловой кислоты (Rajeshwari, Bhuvaneshwari, 2017) и данные параметры также могут быть использованы для отбора стрессоустойчивых сортов при селекции хлопчатника. В связи с этим, было проведено сравнительное исследование биохимического состава листьев ген-нокаутных и немодифицированных линий и сортов хлопчатника (рис. 2).

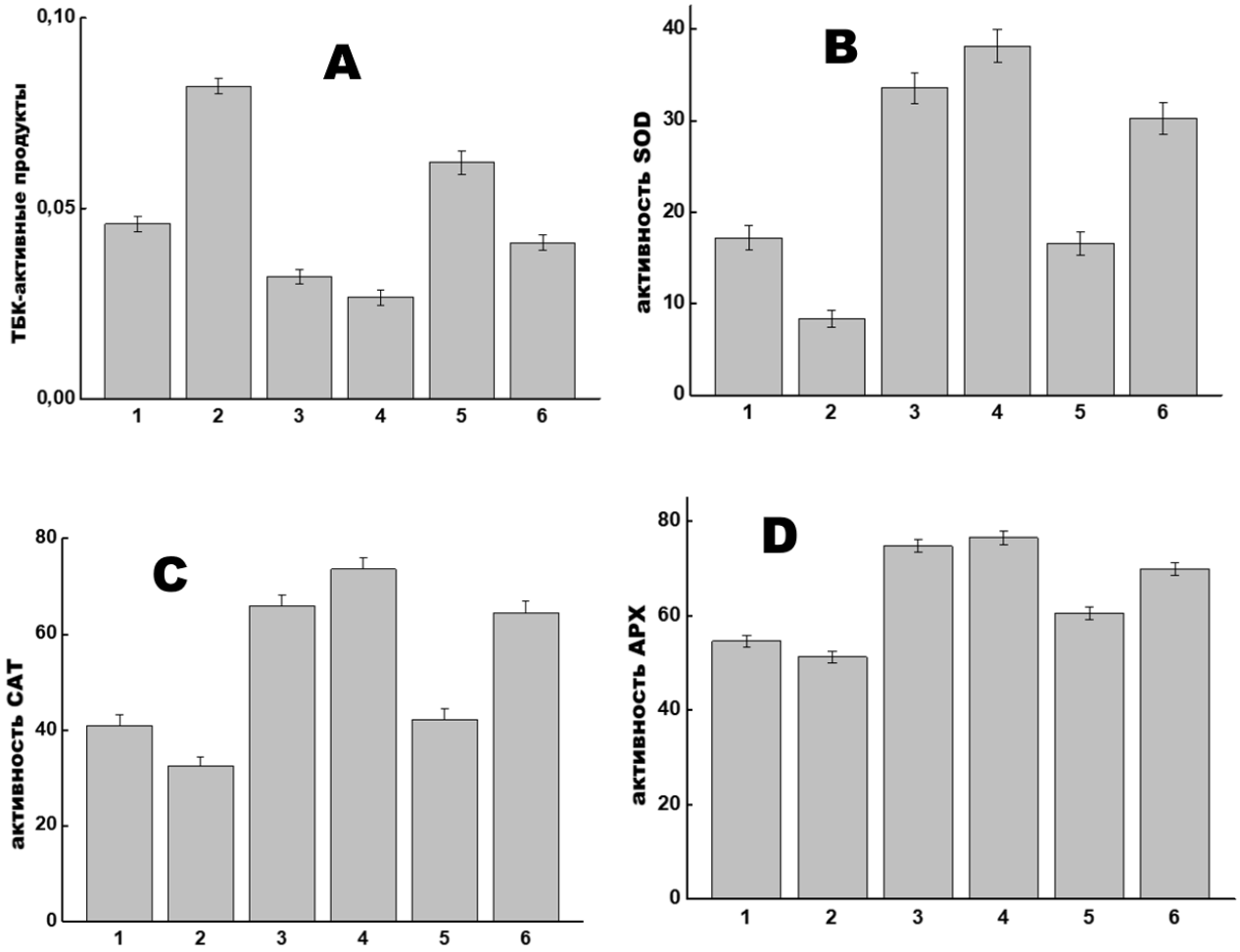


Рис. 1. Оценка активности антиоксидантной системы у модифицированных и немодифицированных сортов и линий хлопчатника. A – содержание МДА, B – активность супероксиддисмутазы, C – активность каталазы, D – активность аскорбатпероксидазы. По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – T 31–10, 4 – T 1–7, 5 – Наманган-77, 6 – Порлок-4); по оси ординат – накопление ТБК-активных продуктов, в мкмоль МДА/мг сырого веса (A) или активность ферментов, в единицах активности /мг белка (B). $p \leq 0,01$

Первоначально было исследовано содержание и состав фосфолипидов, с которым тесно связана стабильность мембран как в нормальных условиях, так и при стрессе. Согласно полученным результатам, жирнокислотный (ЖК) состав разных генотипов хлопчатника различается (рис. 2, A). Основными ЖК во всех исследованных образцах были пальмитиновая кислота (16: 0), стеариновая (18: 0), олеиновая (18: 1), линолевая (18: 2) и линоленовая (18: 3). На эти пять ЖК приходится более 95 % общего содержания ЖК в функциональных листьях хлопчатника. При этом ЖК состав у ген-нокаутных линий и сортов содержал более высокую долю ненасыщенных ЖК (UFA) и более низкую долю насыщенных ЖК (SFA) по сравнению с таковой у контрольного немодифицированного генотипа Кокер-312.

Далее было изучено влияние инсерции векторной конструкции на содержание свободного пролина в листьях различных сортов хлопчатника. Как видно из рис. 2, B, содержание пролина в разных сортах хлопчатника достоверно различалось и коррелировало с их устойчивостью к водному дефициту и засолению. При этом наименьшее количество пролина наблюдалось у немодифицированной исходной линии Кокер-312, а наибольшее – у RNAi линии $T_{1\text{-}7}$.

Наряду с этим, было исследовано содержание углеводов у различных генотипов хлопчатника. Как видно из рис. 2, C, содержание растворимых сахаров, сахарозы, крахмала и отношение сахароза / крахмал в стеблевых листьях различается в зависимости от исследуемого генотипа и зависит от наличия векторной конструкции.

При этом у RNAi линий и сортов хлопчатника отмечается более высокое содержание растворимых сахаров и сахарозы и, соответственно, более высокое значение отношения сахароза / крахмал по сравнению с немодифицированным контрольным линий Кокер-312 (рис. 2, C). Эти результаты хорошо коррелируют с имеющимися литературными данными о содержании сахаров у различных генотипов хлопчатника в условиях солевого стресса.

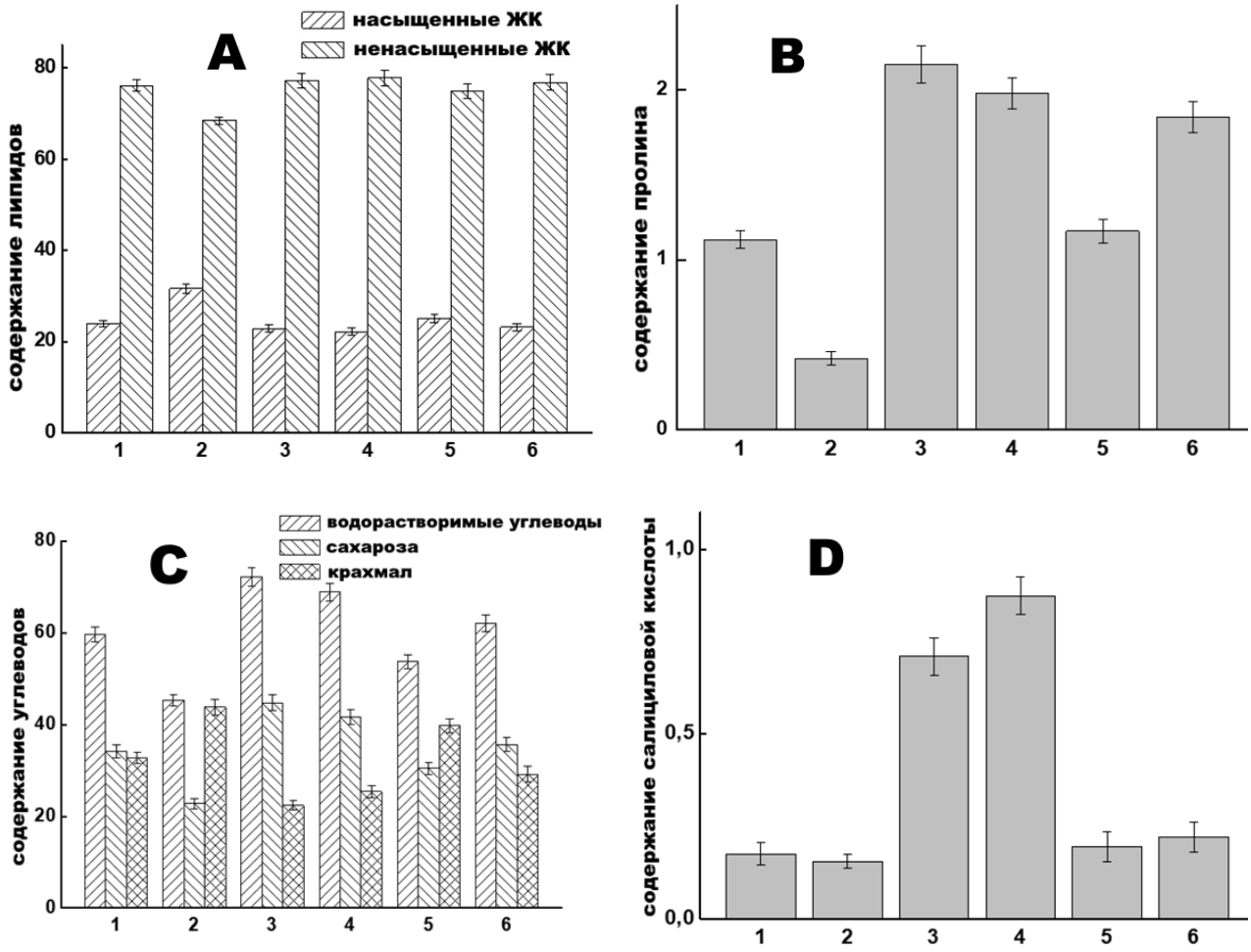


Рис. 2. Влияние инсерции RNAi конструкции к гену фитохрома A1 на биохимические параметры листьев хлопчатника. A – содержание липидов, B – содержание пролина, C – содержание углеводов, D – содержание салициловой кислоты. По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – T 31–10, 4 – T 1–7, 5 – Наманган-77, 6 – Порлок-4); по оси ординат – содержание липидов (A), в процентах, содержание пролина, в мкг /г сухого веса (B), содержание углеводов, в мг /г сухого веса (C), содержание салициловой кислоты, в мкг /г веса (D). $p \leq 0,01$

Также нами было изучено влияние инсерции RNAi конструкции к гену фитохрома A1 на содержание салициловой кислоты, которая является важной сигнальной молекулой для модуляции реакции растений на стресс (Rajeshwari, Bhuvaneshwari, 2017). Результаты исследования показали, что содержание салицилата в разных сортах хлопчатника достоверно различалось и коррелировало с их устойчивостью к водному дефициту и засолению (рис. 2, D). При этом наименьшее количество салициловой кислоты наблюдалось у немодифицированной исходной линии Кокер-312, а наибольшее – у RNAi линии $T_{1\text{-}7}$.

Фенотипическая устойчивость ген-нокаутных линий и сортов хлопчатника серии Порлок к абиотическим стрессам подтверждена молекулярными исследованиями. У данных линий и сортов наблюдалась более высокая активность антиоксидантных ферментов, более высокое содержание свободного пролина и салициловой кислоты, более высокое содержание растворимых сахаров и сахарозы и, соответственно, более высокое значение отношения сахароза / крахмал по сравнению с немодифицированной контрольной линией Кокер-312.

ЛИТЕРАТУРА

Abdurakhmonov I.Y., et al. 2014. Phytochrome RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of the cotton Gossypium hirsutum L. Nat Comm. 5: 3062.
Abdurakhmonov I. Yu., et al. 2016. RNA interference for functional genomics and improvement of cotton (*Gossypium* spp.). Frontiers in Plant Science. 7: 202.
Arzani A. 2008. Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. In Vitro Cell Dev Biol Anim 44: 373–383.
Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205–207.
Beers R.F., Sizer I.W. 1952. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem 195: 133–140.
Foster J.G., Hess J.L. 1980. Responses of superoxide dismutase and glutathione reductase activities in cotton leaf tissue exposed to an atmosphere enriched in oxygen. Plant Physiol 66: 482–487.
Hasan M.M., et al. 2018. Molecular and Physio-Biochemical Characterization of Cotton Species for Assessing Drought Stress Tolerance. Int. J. Mol. Sci. 19: 2636.
Heath R.L., Packer L. 1968. Photoperoxidation in Isolate Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125: 189–198.
Hendrix D.L. 1993. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. Crop Sci 33(6): 1306–1311.
Hernandez J.A., Jimenez A., Mullineaux P., Sevilla F. Tolerance of pea (Pisum sativum L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses // Plant Cell Environ., V. 23, 2002, P. 853–862.
Lamaoui M. et al. 2018. Heat and Drought Stresses in Crops and Approaches for Their Mitigation. Frontiers in Chemistry. 6: 26.
Nakano Y., Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbatespecific peroxidase in spinach chloroplasts. PCPhy 22(5): 867–880.
Nouman W., et al. 2018. Variation in Plant Bioactive Compounds and Antioxidant Activities Under Salt Stress. In Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants, ed. Vats Sh.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 77–102.
Peng J., et al. 2016. Effects of Soil Salinity on Sucrose Metabolism in Cotton Leaves. PLoS ONE. 11 (5): e0156241.
Rajeshwari V., Bhuvaneshwari V. 2017. Salicylic Acid Induced Salt Stress Tolerance in Plants. Int J Plant Biol Res 5(3): 1067.
Saini P., et al. 2018. Reactive Oxygen Species (ROS): A Way to Stress Survival in Plants. In Abiotic Stress-Mediated Sensing and Signaling in Plants: An Omics Perspective, eds. Zargar S.M., Zargar M.Y.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 127–154.
Seifter S., et al. 1950. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. Arch. Biochem 25(1): 191–200.
Ullah A., et al. 2017. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. Plant Biotechnology Journal. 15: 271–284.
Yu H.G., Su W.A. 1996. Studies on relationship between fatty acids desaturation of PSII membrane and low temperature photoinhibation of cucumber. Acta Biochimica Biophysica Sinica 12: 227–233.
Zhang L., et al. 2013. Effect of soil salinity on physiological characteristics of functional leaves of cotton plants. J Plant Res. 126: 293–304.
Zhang X., et al. 2014. Genome-wide identification of mitogen-activated protein kinase gene family in *Gossypium raimondii* and the function of their corresponding orthologs in tetraploid cultivated cotton. BMC Plant Biol. 14: 345.
Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О. 2017. Функционирование антиоксидантной системы растений при солевом стрессе. Вісник Харківського Національного Аграрного Університету Серія Біологія. 42: 23–45.

УДК 579.65

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ГИАЛУРОНИДАЗЫ

О.Ю. Мальцева, Е.И. Гребенюк

Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

Положительные свойства гиалуронидазы послужили отправной точкой для создания целого ряда препаратов. Некоторые на основе гиалуронидазы используют в косметологии, другие – в медицине и ветеринарии. Гиалуронидаза используется как компонент лекарственных средств для лечения отеков, местных воспалительных процессов, геморроя и озноба. Применяется для облегчения подкожного введения препаратов за счет уменьшения проницаемости ткани. Самый распространенный лекарственный препарат – чистый фермент с международным наименованием Hyaluronidase.

Известно, что к образованию гиалуронидазы способны как патогенные, так и непатогенные бактерии: из 167 штаммов 15 видов аэробных спорообразующих бактерий, которые были выделены из разных источников, 75 % образцов обладали гиалуронидазной активностью. Физико-химические и биологические свойства полученных ферментов имели значительные различия.

Часто используемым продуцентом гиалуронидазы являются бактерии *Streptomyces*: штамм *Streptomyces koganeiensis ATCC 31394 способен* синтезировать высокоактивную гиалуронидазу (40000 – 50000 МЕ/мг), почвенный штамм *Streptomyces sp. 81–10*, который по морфологическим, культуральным и физико-химическим свойствам был выделен в классификации как новый вид *Streptomyces hyalurolyticus*, штамм *Streptomyces actinocidus* интересен тем, что деполимеризирует гиалуроновую кислоту с образованием тетрасахаридов и гексасахаридов с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце молекулы.

Вид *Staphylococcus albus* или стафилококк белый объединяет штаммы стафиллококков, в которых отсутствует пигмент из группы каротиноидов и не обладают цветом, но так же как и «цветные» штаммы, обладает способностью к синтезу гиалуронидазы. Стоит отметить, что синтезируемый фермент обладает низкой активностью.

Штамм *Pseudomonas putida* представляет собой палочковидную, почвенную бактерию, которая имеет два важных преимущества: непатогенна, и растёт на универсальных питательных средах. По выходу и активности фермента *P. putida* не уступает *Staphylococcus aureus*. Следовательно, *P. putida* также можно рассматривать в качестве продуцента гиалуронидазы.

Streptococcus pneumoniae – грамположительные диплококки, но в мокроте и можно их увидеть в виде единичных клеток или коротких цепочек. Стенки клеток повернуты друг к другу, уплощены, а противоположные – вытянуты. Так создается уникальная ланцетовидная форма, похожая на огонь свечи. Пневмококки в размерах варьируются 0,75–0,5 х 0,5–1 мкм, способны к созданию полисахаридную капсулу. Культивируется на универсальных средах с содержанием белков при pH 7,6. При воздействии химических или физических факторов, (соли желчи (лизис), оптохин, NaCl) угнетается рост колоний.

Штамм мицеллиального гриба *Aspergillus awamori 22/12* так же обладает гиалуронидазной активностью. Но для штамма характерна низкая активность продуцируемого фермента.

Фермент получен и из многих патогенных штаммов, таких, как *Staphylococcus aureus, Streptococcus haemolyticus, Clostridium perfringens, Corynebacterium diphtheriae* и многих других, но вследствие высокой патогенности штаммов они не рассматриваются в качестве источника гиалуронидазы в промышленном масштабе.

Стоит отметить, что получение в промышленном масштабе очищенной бактериальной или текстикулярной гиалуронидазы являются трудоемким процессом из-за нестабильности фермента в водном растворе и снижения активности после очистки.

УДК 575.113 + 581.131

ВЛИЯНИЕ НОКАУТА ГЕНА ФИТОХРОМА A1 НА АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ ХЛОПЧАТНИКА

В.С. Камбурова, Ш.Э. Шерматов, Г.Ф. Маматкулова, Ш.Х. Маматкулова

Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

Известно, что аминокислоты являются основными исходными веществами, обеспечивающими синтез белка растущих органов и частей растений. На концентрацию и качественный состав аминокислот влияют как внутренние процессы, определяющие течение азотного обмена в широком смысле слова (обмен белков, нуклеиновых кислот, пигментов, ростовых веществ и т. д.), так и внешние факторы. Казалось бы, что свободные аминокислоты, не входящие в состав белков, не влияют непосредственно на рост растений. Тем не менее, они необходимы для жизнедеятельности организмов и играют важную роль во многих обменных процессах, в том числе в процессах обмена с белковыми аминокислотами, с органическими кислотами, с синтезом физиологически активных веществ. Например, ростовые вещества типа гетероауксина и фенилпропионовой кислоты образуются из триптофана путем его дезаминирования, бета-аланин (входящий в состав витамина B_5) образуется при декарбоксилировании аспарагиновой кислоты, со свободным пролином связывают такие важнейшие функции, как осмопротекторная, шаперонная, антиоксидантная, сигнально-регуляторная и другие активности (Kolukisaoglu, Suarez, 2017; Nouman et al., 2018). Иначе говоря, непосредственно или опосредовано все свободные аминокислоты и продукты их окислительно-восстановительных превращений участвуют в метаболизме ростовых процессов.

Состав аминокислот, конечно, тесно связан с процессами роста и развития, поскольку последние вызывают изменения в оттоке аминокислот из листа и их использование в синтезе белка. Изменения в составе свободных и белковых аминокислот могут быть связаны с процессом фотосинтеза, но могут явиться и результатом передвижения по растению, когда, например, аминокислоты поступают в листья из корней, где они образуются в значительных количествах и в большом разнообразии.

Ранее сообщалось, что нами с помощью технологии РНК-интерференции гена фитохрома A1 (*PHYA1*) были получены генотипы хлопчатника, выделяющиеся такими характеристиками, как развитая и длинная корневая система растений, повышенная продуктивность и более качественное волокно (Abdurakhmonov et al., 2014). В последующем было установлено, что генотипы этих ген-нокаутных растений имеют высокие (по сравнению с исходными формами) показатели нитратредуктазной активности (Убайдуллаева и др., 2016a), положительно коррелирующие с более повышенной фотосинтетической, т. е. ассимиляционной активностью этих растений (Убайдуллаева и др., 2016b).

С учетом роли свободных аминокислот в обменных и ростовых процессах, а также позитивном действии нокаута гена фитохрома A1 на азотный и углеродный метаболизм, было интересно посмотреть как супрессия гена фитохрома A1 отражается на качественном и количественном составе небелковых свободных аминокислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основными объектами исследования были ген-нокаутные сорта хлопчатника, полученные путем трансформации линии Кокер-312 конструкцией, вызывающей супрессию гена фитохрома A1. Изменения свойств этих растений мы анализировали по отношению к исходному (дикому) генотипу Кокер-312, а также родительским формам, использованным для получения коммерческих сортов хлопчатника серии Порлок (Abdurakhmonov et al., 2014).

Для эксперимента использовали 4-ый (от апекса) лист проростков хлопчатника, в возрасте 4–5 листьев. К срезам листовой пластинки приливали дистиллированную воду в соотношении 1 : 1 (в/об), гомогенизировали и оставляли на 2–3 часа на холоду для лучшей экстракции. К супернатанту после центрифугирования приливали равный объем 20 % ТХУК до конечной концентрации 10 %, оставляли на 10 мин для формирования осадка. Осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 8000 об/мин, а надосадочную жидкость, содержащую свободные аминокислоты, высушивали лиофильно.

Состав аминокислот анализировали с помощью высокоэффективой жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и предколоночной модификации с использованием PITC (фенилизотиоцианата) по методу Cohen и Strydom (1988). Условия ВЭЖХ: хроматограф Agilent Technologies 1200 с DAD детектором, колонка 75×4,6 мм Discovery HS C_{18}, 3µm. Раствор А – 0,14М CH_3 COONa + 0,05 % ТЭА pH 6,4; раствор В – ацетонитрил. Скорость потока 1,2 мл/мин, детекция – при 269 нм.

Все данные были подвергнуты дисперсионному анализу (ANOVA). Данные представлены как средняя ± стандартная ошибка. Значимость различий между средними значениями определяли с помощью теста Туки. Различия в $P \leq 0,05$ считались значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аминокислоты традиционно считаются предшественниками и составляющими белков. Многие аминокислоты также действуют как предшественники других азотсодержащих соединений, например нуклеиновых кислот. Кроме того, многие эксперименты показали, что аминокислоты могут играть широкую роль в растениях, в том числе выступать в качестве регуляторных и сигнальных молекул (Rai, 2002). Так, ростовые вещества типа гетероауксина и фенилпропионовой кислоты образуются из триптофана путем его дезаминирования, бета-аланин (входящий в состав витамина B_5) образуется при декарбоксилировании аспарагиновой кислоты, со свободным пролином связывают такие важнейшие функции, как осмопротекторная, шапероннная, антиоксидантная, сигнально-регуляторная и другие активности (Kolukisaoglu, Suarez, 2017; Nouman et al., 2018).

Вместе с тем, из предварительных исследований известно, что ген-нокаутные сорта хлопчатника серии Порлок обладают развитая и длинная корневая система растений, повышенная продуктивность и более качественное волокно (Abdurakhmonov et al., 2014). В последующем было установлено, что генотипы этих ген-нокаутных растений имеют высокие (по сравнению с исходными формами) показатели нитратредуктазной активности (Убайдуллаева и др., 2016а), положительно коррелирующие с более повышенной фотосинтетической, т. е. ассимиляционной активностью этих растений (Убайдуллаева и др., 2016b). В связи с этим было проведено сравнительное исследование качественного и количественного состава аминокислот у ген-нокаутных и немодифицированных линий и сортов хлопчатника.

Как видно из рис. 1 и 2, все формы хлопчатника различаются между собой как по качественному, так и количественному составу свободных аминокислот, причем суммарное содержание аминокислот у ген-нокаутных линий и сортов было на 33,7 % выше, чем у исходного нетрансформированного генотипа Кокер-312. У ген-нокаутного хлопчатника на долю аланина, глютаминовой и аспарагиновой кислоты, а также их соответствующих амидов – глютамина и аспарагина приходится более половины (53,385 %) от суммы всех аминокислот (рис. 2).

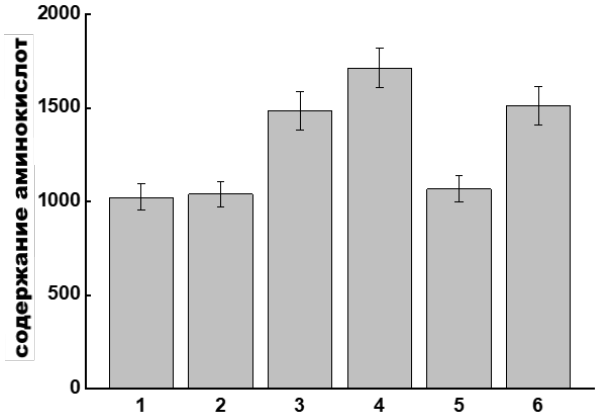


Рис. 1. Общее содержание аминокислот у ген-нокаутных и нетрансформированных сортов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 31–10, 4 – Т 1–7, 5 – Наманган-77, 6 – Порлок-4), оси ординат – количество свободных аминокислот, мкг/г сырого веса листа.

Известно, что хлопчатник, как и многие технические культуры, аккумулирует избыток минерального азота, который утилизируется растением по мере запроса (Radin, Mauney, 1981). Проведенный нами сравнительный анализ активности основного фермента азотистого обмена – нитратредуктазы показал, что листья генотипов хлопчатника с *PHYA1* RNAi вставкой имеют лучшие показатели нитратредуктазной активности, по сравнению с исходными формами (Убайдуллаева и др., 2016а).

Это, с нашей точки зрения, было следствием как развитой и длинной корневой системы, способной транспортировать большее количество нутриентов из почвы, так и следствием повышения у ген-нокаутных форм активности самого фермента. Поэтому наблюдаемое возрастание у ген-нокаутных линий T_{31-10} и T_{1-7} (по сравнению с Кокер-312) содержания таких аминокислот, как аспарагиновая кислота (на 78 %), глютаминовая кислота (на 8 %), аспарагин (на 26 %), глютамин (на 128,8 %) и аланин (на 57,4 %) были вполне ожидаемые.

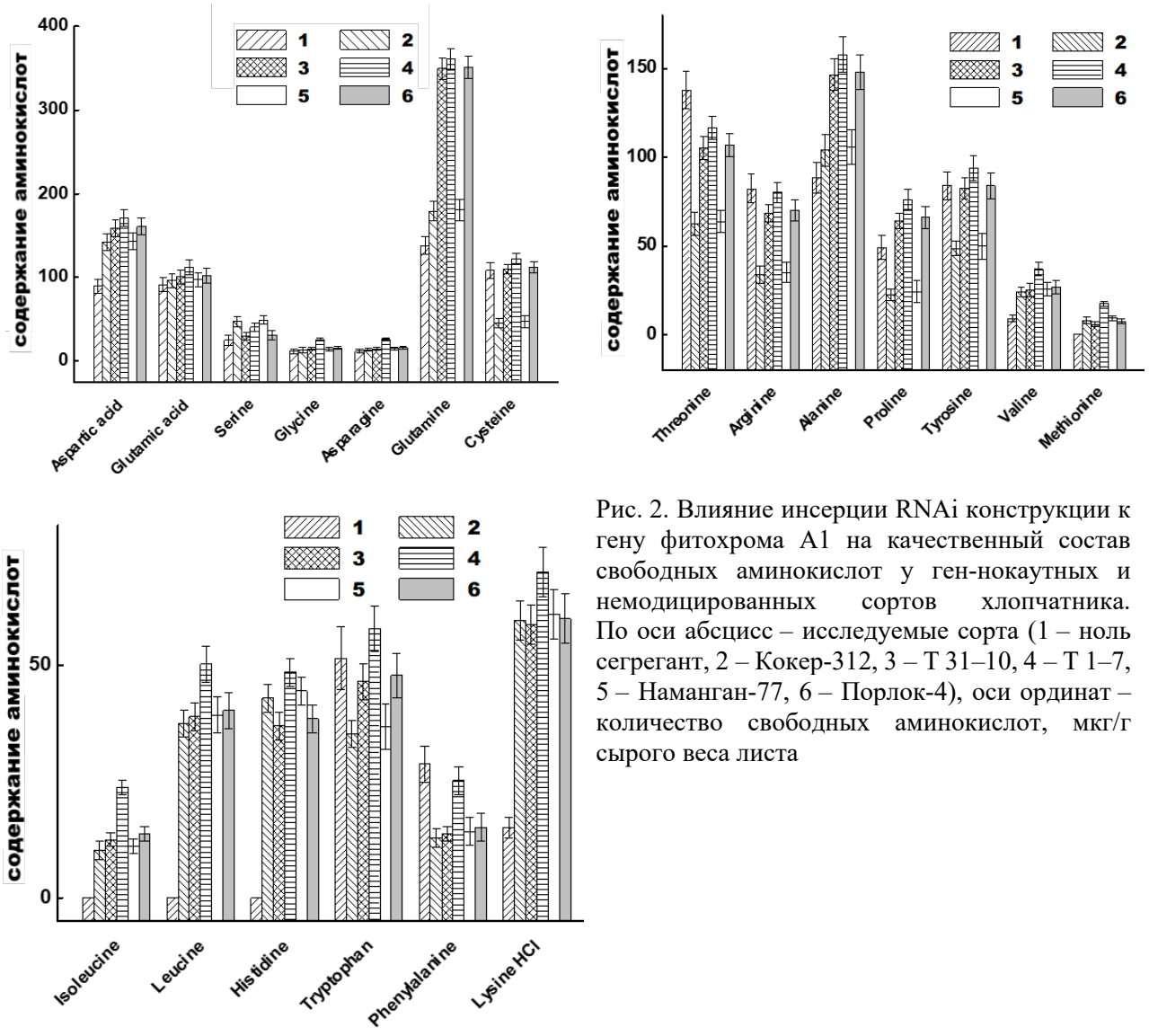


Рис. 2. Влияние инсерции RNAi конструкции к гену фитохрома А1 на качественный состав свободных аминокислот у ген-нокаутных и немодицированных сортов хлопчатника. По оси абсцисс – исследуемые сорта (1 – ноль сегрегант, 2 – Кокер-312, 3 – Т 31–10, 4 – Т 1–7, 5 – Наманган-77, 6 – Порлок-4), оси ординат – количество свободных аминокислот, мкг/г сырого веса листа

Касаясь физиологической роли такого повышения можно отметить, что, например, одна только аспарагиновая кислота выполняет множество необходимых для жизнедеятельности клетки функций: 1) она позволяет держать оптимальную концентрацию органического азота и предохранять ее от интоксикации аммиаком; 2) присоединяя токсичный аммиак, превращается в нетоксичный аспарагин; 3) способствует превращению аммиака в нетоксическую мочевину; 4) путем декарбоксилирования аспарагиновой кислоты образуется бета-аланин, входящий в состав витамина B_5, который, в свою очередь, входит в состав коэнзима А (Алехина и др., 2005).

Таким образом, повышение у ген-нокаутных сортов содержания перечисленных аминокислот может быть позитивным вкладом в общую продуктивность ген-нокаутных форм хлопчатника, которую мы наблюдаем на практике (Алехина и др., 2005).

Наряду с этим у трансгенных форм наблюдается почти трех кратное (в 2,78 раза) повышение содержания валина и почти 4 кратное (в 3,88 раза) повышение содержания лизина HCl. Сопоставимое увеличение, а в случае фенилаланина уменьшение уровня этих аминокислот обнаруживается и у родительской формы Наманган-77, что дает основание предполагать, что наблюдаемые изменения в концентрации лизина, валина, пролина и фенилаланина, скорее всего, не являются непосредственным эффектом введенной *PHYA1* RNAi конструкции, а спровоцированы другими процессами.

Вместе с тем известно, что связующим звеном в обмене углеводов и белков при переходе первых во вторые является пировиноградная кислота. Являясь конечным продуктом распада углеводов (образующихся у растений при фотосинтезе), пировиноградная кислота служит исходным веществом для биосинтеза аланина, валина, лейцина и изолейцина. Увеличение содержания этих аминокислот у ген-нокаутных сортов (не только при сравнении с Кокер-312, но и с родительскими формами) коррелирует с выявленным нами ранее повышением фотосинтетического потенциала ген-нокаутных форм, несущих *PHYA1* RNAi конструкцию (Убайдуллаева и др., 2016b).

Эффектом инсерции шпилечной конструкции может быть появление в листьях ген-нокаутного хлопчатника помимо изолейцина и лейцина таких аминокислот, как метионин и гистидин, которые выявляются приблизительно в таких же концентрациях и в листьях родительских сортов, но отсутствуют (либо присутствуют в не выявляемых количествах) в листьях исходного Кокер-312. Особо хочется отметить скачкообразное появление у трансформантов аминокислоты гистидина – суперкатализатора, входящего с состав активных центров многих ферментов (Алехина и др., 2005).

Что касается аминокислот – цистеина, треонина, аргенина, тирозина и триптофана, то у ген-нокаутных сортов их содержание ниже, чем у Кокера-312, однако намного больше, чем у родительских сортов. Убыль цистеина у Порлок-4 сократилась до 7,12 % против существенного (на 61,4 %) снижения этой аминокислоты у Наманган-77. Падение содержания треонина у Порлок-4 составило 31,1 % (против 59,2 % – у Наманган-77), аргинина – 16,8 % (против 61,9 % – у Наманган-77) и, наконец, содержание триптофана у Порлок-1 уменьшилось на 9,77 % вместо 31,4 %, имеющее место у Наманган-77.

Таким образом, суммируя вышеизложенное необходимо отметить, присутствие RNAi конструкции у гену фитохрома A1 в геноме ген-нокаутных растений, по-видимому, нивелирует эффекты, спровоцированные, возможно, соматическим эмбриогенезом, поднимая содержание аминокислот до их уровня в нетрансформированном генотипе Кокер-312. Надо заметить, что содержание свободных аминокислот в листьях растущих растений является интегральным выражением образования, притока, передвижения, взаимопревращения и использования аминокислот в биосинтезе белков. Поэтому не всегда удается обнаружить прямую связь между воздействием какого-то фактора роста и наблюдаемыми изменениями в уровне свободных аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

Abdurakhmonov I.Y., et al. 2014. Phytochrome RNAi enhances major fibre quality and agronomic traits of the cotton Gossypium hirsutum L. Nat Comm. 5: 3062.

Cohen S.A., Strydom D.J. 1988. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives. Anal. Biochem. 174: 1–16.

Kolukisaoglu Ü., Suarez J. 2017. D-Amino Acids in Plants: New Insights and Aspects, but also More Open Questions. In Amino Acid: New Insights and Roles in Plant and Animal, ed. T. Asao. p. 155–169.

Nouman W., et al. 2018. Variation in Plant Bioactive Compounds and Antioxidant Activities Under Salt Stress. In Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants, ed. Vats Sh.: Springer Nature Singapore Pte Ltd (Singapore). 77–102.

Radin J.W., Mauney J.R. 1981. The nitrogen stress syndrome. Cotton Physiology. 91–105. USDA-ARS Phoenix, Arizona.

Rai V.K. 2002. Role of amino acids in plant responses to stresses. Biologia Plantarum. 45: 481–487.

Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В., Мейчик Н.Р., Носов А.М., Полесская О.Г., Харитонашвили Е.В., Чуб В.В. Физиология растений: Учебник для студ. Вузов, под ред. И.П. Ермакова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. 640 с.

Убайдуллаева Х.А., Адылова А.Т., Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю. 2016a. Нитратредуктазная активность ряда ген-нокаутных форм хлопчатника с измененной экспрессией фитохромных генов. Узбекский биологический журнал. Спец. выпуск: 67–70.

Убайдуллаева Х.А., Адылова А.Т., Захидов Э.А, Нематов Ш.К., Кувондиков В.О., Аюбов М., Имамходжаева А.С., Буриев З.Т., Абдурахмонов И.Ю, акад. Абдукаримов А.А. 2016b. Фотосинтетическая активность генотипов хлопчатника, полученных путем РНК-интерференции гена PHYA1. Доклады АН РУз. 1: 74–77.

УДК 632.95:57.044:57.084.1

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПЕСТИЦИДОВ НА КЛЕТОЧНЫХ И ОРГАНИЗМЕННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

Н.Е. Шувалова, М.Г. Сульман, Е.А. Прутенская

Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время сложно представить сельское хозяйство без средств химической защиты культурных растений, которые применяются для борьбы с насекомыми, болезнями и сорной растительностью [1]. Наибольшую опасность представляет применение гербицидов в качестве десиканта в предуборочный период [2,3]. Как результат, пестициды обнаруживаются в объектах окружающей среды, кормах, продуктах питания, в тканях животных и биоматериале людей [2]. Остаточные количества глифосата идентифицированы в сельскохозяйственных культурах на уровне от 0,7 до 33 мг/кг [3]. С целью оценки токсичности загрязняющих веществ применяют биотестирование. Достоинство биологических тест-систем – возможность в короткие сроки дать представление об опасности загрязняющих веществ для организмов и окружающей среды [4, 5].

Развитие биотестирования привело к изучению многих тест-систем на клеточном и организменном уровне и их тест-функций [5]. К основным тест-функциям относят интегральные параметры тест-объектов: выживаемость, плодовитость, рост, изменение морфологических параметров и др. Требованиями к тест-объектам являются генетическая однородность, распространенность в окружающей среде и значимость для развития экосистемы, чувствительность к загрязняющим веществам, безвредность, возможность культивирования в лабораторных условиях, отсутствие мутагенных свойств, возможность микробиотестирования [6], чувствительность к начальным экологическим изменениям и экономичность [5].

При выборе тест-объектов следует учитывать естественную среду обитания организма. Дождевые черви являются почвенными организмами, характеризующие почву как среду обитания, поэтому их активно применяют при биотестировании почв, загрязненных пестицидами при выращивании сельскохозяйственных культур, муниципальными и промышленными отходами, хозяйственно-бытовыми сточными водами. Биотестирование на червях основано на контактном и кишечном воздействии ксенобиотиков [7]. Ответная реакция определяется по выживаемости, репродуктивности и поведенческим реакциям червей на воздействие загрязняющих веществ [7 – 9]. В работе [8] показано воздействие гербицида ДНОК на дождевых червей при концентрациях от 4 до 16 г./л. Пестицид при концентрациях 4, 8 г/л воздействовал на поведенческие реакции животных, угнетая двигательную активность, повышение содержания ДНОК до 16 г./л вызывало смертность животных до 75 %. В работе [9] описаны опыты по определению токсичности гербицидов с использованием модельного вида компостного червя и энхитрейд. Так, для глифосата максимально безвредная концентрация составляет 400 мг/кг почвы, минимально вредная концентрация – 500 мг/кг.

Биотестирование с использованием рыб, дафний D. magna широко применяется в мировой практике с целью определения токсичности водных объектов. В работе [10] изучено хроническое воздействие гербицида Раундап в ряду поколений D. magna при концентрации действующего вещества от 0,02 до 2,0 мг/л. При содержании глифосата 0,2 и 2,0 мг/л отмечено угнетение репродуктивной системы, уменьшение размеров рачков и негативное воздействие на формирование пигментного комплекса, выраженное в потере интенсивности окраса особей. В ряде работ [11 – 13] исследовано воздействие пестицидов на пищеварительные ферменты рыб. Автором работы [12] показано, при увеличении содержания глифосата от 0,1 до 100 мкг/мл наблюдалось снижении активности пептидаз.

С целью определения воздействия токсикантов на отдельные органы и организм в целом широкое применение в биотестировании получили млекопитающие, как тест-объекты. При использовании экспериментальных животных возможно оценить характер поражения ткани печени при токсическом воздействии [14], влияние ксенобиотиков на показатели иммунной системы [15] и изменение биохимических и морфологических параметров крови [16, 17].

Цель работы – исследование влияния токсического действия гербицидов (клопиралида, глифосата, 2,4 – Д) на клетки простейших и на организм млекопитающих.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали простейшие Stylonychiamytilus в качестве тест-объектов. Культивирование стилонихий и подготовка тест-объектов описаны в статье [18].

Экспериментальные исследования проведили по определению уровня токсичности следующих химических веществ: клопиралида, глифосата, 2,4–Д. В качестве источников пестицидов были использованы государственные стандартные образцы.

В эксперименте использовали модельные водные растворы гербицидов в диапазоне от 2 до 200 мг/л, которые готовили методом последовательного разведения из основного раствора. Для проведения биотестирования использовали блок луночныхмикроаквариумов, изготовленного из органического стекла. Суточную культуру при помощи микродозатора помещали в лунки блока. Вносимый объем питательной среды с инфузориями составлял 100 мкл. После учета количества стилонихий под микроскопом, в каждую лунку добавляли по 100 мкл гербицида определенной концентрации, в контрольную лунку добавляли 100 мкл дистиллированной воды. Для предотвращения испарения блок с лунками накрывали стеклом. Подсчет клеток простейших осуществлялся под световым микроскопом через 2, 6, 24, 72 часа, параметрами токсичности приняли изменения численности инфузорий в опыте со временем экспозиции 24 часа относительно численности клеток в начале опыта (0 часов).

В исследовании по изучению хронической токсичностибыли использованы лабораторные мыши. Опыт выполнен на 48 белых лабораторных мышах, 12 самцах и 36 самках в возрасте 2-х месяцев средней стандартной массой 25–30 г. Все животные были здоровы, состояние оценивали визуально. Вода подавалась из стационарных поилок круглосуточно, кормление осуществлялось раз в сутки без ограничения. Содержание животных осуществлялось в соответствии с требованиями ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», Приказа Министерства Здравоохранения СССР от 12 августа 1977 года № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Лабораторные животные содержались по схеме № 1, 2. Кормление животных осуществляли зерном овса, обработанным водными растворами глифосата с содержанием 7, 14, 28 мг/кг. Эксперимент выполняли в два этапа.

На первом этапе животные были распределены на 16 групп, и помещены в индивидуальные клетки следующим образом: четыре клетки по 3 самца, двенадцать клеток по 3 самки. Продолжительность скармливания мышей обработанным зерном при раздельном содержании составлял 1 месяц. Схема № 1 кормления и содержания животных представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема № 1 кормления и содержания животных в первый период исследования

№ клетки	Схема содержания животного	Схема кормления
1	Самцы	Зерно овса, необработанное препаратом
2	Самцы	Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)
3	Самцы	Зерно овса, обработанное препаратом (14 мг/кг)
4	Самцы	Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)
5–7	Самки	Зерно овса, необработанное препаратом
8–10	Самки	Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)
11–13	Самки	Зерно овса, обработанное препаратом (14 мг/кг)
14–16	Самки	Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)

На втором этапе исследования проводили формирование семей из половозрелых мышей. В индивидуальные клетки помещали 3 самки и 1 самца. Животные были распределены на 12 групп (семей), схема № 2 кормления и содержания животных представлена в таблице 2.

Для наблюдения динамики воздействия гербицида на животных по истечении 3 месяцев ½ часть лабораторных животных умерщвлялась методом декапитации, другая часть – через 5 месяцев после содержания по схеме № 2.

После завершения исследования проводили отбор крови для морфологического анализа, визуальный осмотр внутренних органов при патологоанатомическом вскрытии, взятие патологического материала для приготовления гистологических препаратов.

Таблица 2 – Схема № 2 кормления и содержания животных второго этапа

№ клетки	Схема содержания животного	Схема кормления
Х(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, необработанное глифосатом
Х(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, необработанное глифосатом
Х(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, необработанное глифосатом
7(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 7 мг/кг
7(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 7 мг/кг
7(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 7 мг/кг
14(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 14 мг/кг
14(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 14 мг/кг
14(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 14 мг/кг
28(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 28 мг/кг
28(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 28 мг/кг
28(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 28 мг/кг

В ходе эксперимента осуществлялся ежедневный визуальный осмотр состояния животных. Критериями хронической токсичности служили изменение поведенческих реакций, воспроизводство и жизнеспособность потомства, число павших животных и сроки их гибели, патологические изменения в тканях и органах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения необходимых концентраций гербицидов при биотестировании, произвели анализ наиболее часто используемых гербицидов в сельском хозяйстве, и рассчитали фактически возможное содержание действующих веществ в почве.

Гербициды могут применяться двумя способами, путем опрыскивания вегетирующих растений или применяться, как почвенные гербициды. В первом случае до 30 % гербицида попадает на вегетативную часть растения, все остальное проникает в почву. Во втором случае химическое вещество используют для обработки непосредственно почвы [19]. Расчет проводили с учетом рекомендаций к применению на основании данных регламента применения гербицидов, указанных в «Справочнике пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации 2017». Содержание действующих веществ коммерческих препаратов в почве принимали для глифосата от 219 до 292 мг/кг, 2,4 – Д от 174 до 280 мг/кг, клопиралидот 14 до 58 мг/кг.

Использование простейших при биотестировании объясняется наличием стандартных методик культивирования, возможность проверки чувствительности к токсичным веществам, генетическая однородность.

Первым этапом исследований стало изучение токсичности пестицидов на простейших и разработка метода биотестирования. Опытным путем выбрали оптимальные условия пробоподготовки гербицидов. Полное растворение стандарта происходит на водяной бане при температуре (60±0,1) ^{0} С в течении часа, или при температуре (60±0,1) ^{0} С в течении 45 минут с использованием ультразвука с рабочей частотой 35 кГц. Установлено, что ультразвуковая обработка стандартных растворов пестицидов не оказывает влияния на развитие простейших. Экспериментальным путем определили оптимальное количество клеток простейших при биотестировании. Исследование проводили при численности инфузорий в лунке от 6 до 9 шт.

В ходе проведения биотестирования установлены токсичные концентрации гербицидов, при которых происходит полная гибель клеток. Глифосат показывает высокую токсичность приконцентрациях 90, 100 мг/л, 2,4 – Д и клопиралид в диапазоне от 60 до 100 мг/л. Кроме того, гербициды при различных концентрациях оказывали влияние на морфологические параметры клетки, наблюдалось большое количество особей стилонихий в 10 – 15 раз меньше, чем материнские.

Следующим этапом работы было определение хронической токсичности глифосата при биотестировании на белых мышах. Присутствие глифосата в остаточных количествах в продуктах питания и кормах для животных объясняет актуальность изучения воздействия остаточного количества гербицида на млекопитающих.

При наблюдении за лабораторными животными зарегистрированы следующие данные. Воспроизводство потомства в контрольных и опытных подгруппах животных существенно отличались. В опытных подгруппах лабораторных животных, кормление которых осуществлялось зерном овса, содержащего гербицид 7, 14 мг/кг, потомство воспроизвела одна самка в каждой подгруппе, продолжительность жизни потомства составляло от 1 до 4 дней, период до воспроизводства потомства 68 и 80 дней, с задержкой в среднем от 47 до 59 дней по сравнению с контрольной подгруппой лабораторных животных соответственно. В опытной подгруппе лабораторных животных, кормление которых осуществлялось зерном овса с содержанием гербицида 28 мг/кг, в ходе эксперимента потомство отсутствовало.

Результаты опыта показали количественное изменение форменных клеток периферической крови у опытных животных по сравнению с контрольными. Среднее уменьшение количества лейкоцитов в крови в опытных подгруппах у животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 7, 14 мг/кг, составило в среднем 30 % через 4 месяца, 60 % через 6 месяцев. У животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 28 мг/кг, составило 38 % и 73 % через 4 и 6 месяцев соответственно.

Качественные и количественные изменения эритроцитов, также наблюдались в ходе всего опыта. Увеличение концентрации гербицида в зерне приводило к уменьшению количества эритроцитов от 23 до 43 % через 4 месяца, и от 38 до 59 % через 6 месяцев. Кроме того, в крови всех опытных животных наблюдались анизоцитоз и пойкилоцитоз, которые выражались в изменениях величины и формы эритроцитов.

При патологоанатомическом исследовании лабораторных животных наибольшие изменения обнаружены в печени, тонком и толстом отделе кишечника. У всех опытных животных печень увеличена в размерах, дряблой консистенции, светло коричневого цвета. Стенки тонкого и толстого отделов кишечника серого цвета, дряблой консистенции, слизистая оболочка светло коричневого цвета, местами слущивается. Увеличение концентрации гербицида в зерне способствует более тяжелым повреждениям, в виде точечных кровоизлияний под слизистой оболочкой тонкого кишечника. Исследования гистологических препаратов печени показали расширение синусоидных капилляров, изменение размеров и формы гепатоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно сделать вывод, что пестициды негативно воздействуют на тест-объекты на клеточном и организменном уровнях. Разработана методика по биотестированию пестицидов с помощью стилонихий. Выявлено, что пестициды показывают высокую токсичность по отношению к инфузориям в диапазоне от 60 до 100 мг/л. Установлено, что глифосат в остаточных количествах (7, 14, 28 мг/кг) оказывает негативное воздействие на организм млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов А.И., Гринько А.В. Влияние гербицидов на засорённость и урожайность ярового ячменя // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 2014, № 6(50), с. 35–37.
2. Meriel Watts, et al.. Glyphosate, JournalofPAN, 2016.
3. Кузнецова Е.М., Чмиль В.Д., Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков. // Современные проблемы токсикологии, 2010, № 1, с. 87–94.
4. Цаценко Л.В. Оценка фитотоксичности почвы на посевах подсолнечника с помощью биотеста ряски малой (LemnaminorL.) // Научный журнал КубГАУ, 2010, № 59(05), с. 1–9.
5. Олькова А.С., Фокина А.И. DaphniamagnaStraus в биотестировании природных и техногенных сред // Успехи современной биологии, 2015, Т. 135, № 4, с. 380–389.
6. Захаров И.С, Алешин И.В. Методы и средства микробиотестирования токсичности водных сред // Фундаментальная и прикладная гидрофизика, 2015, Т. 8, № 2, с. 75–95.
7. Терещенко П.В. Действие гербицидов на дождевых червей // Известия ТСХА, 1997, № 3, с. 99–107.

8. Эмирова Д.Э., Баличиева Д.В. Биотестирование острой токсичности препарата ДНОК с использованием дождевых червей // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского, 2011, Т. 24, № 1(63), с. 159–163.
9. Ганин Г.Н. Биотестирование некоторых ксенобиотиков почвенными олигохетами. // Агрохимия, 2008, № т11, с. 79–85.
10. Панченкова Г.А. Исследование хронической токсичности гербицида Раундап в ряду поколений Daphniamagna // Токсикологический вестник, 2007, № 5, с. 14–17.
11. Голованова И.Л., Аминов А.И. Влияние некоторых экологических факторов на чувствительность гликозидаз рыб к действию гербицида Раундапinvitro // Труды Карельского научного центра РАН, 2016, № 12, с. 96–105.
12. Кузьмина В.В., Тарлева А.Ф., Шептицкий В.А. Влияние гербицида Раундап на активность пептидаз в кишечнике у рыб разных видов // Вопросы ихтиологии, 2017, Т. 57, № 5, с. 607–613.
13. Голованова И.Л., et al.. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в кишечнике молоди теплолюбивых видов рыб в зависимости от температуры акклимации // Вестник АГТУ, 2015, № 2, с. 90–97.
14. Муфазалова Н.А., et al.. Эффективность применения тактивина, миелопида и токоферола для коррекции иммунотоксических эффектов гербицида 2,4 – ДА // Башкирский экологический вестник, 2010, № 1, 14–15.
15. Чеснокова Л.А., Михайлова И.В., Карманова Д.С. Влияние органических и неорганических экотоксикантов не некоторые показатели иммунной системы крыс // Известия Оренбургского шосударственного университета, 2015, № 6(56), с. 252–254.
16. Плотникова О.М., Матвеев Н.Н., Корепин А.М., Дуплякина И.В. Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом // Терретическая и прикладная экология, 2010, № 1, с. 81–86.
17. Максимовских С.Ю., et al.Изменение морфологических и биохимических параметров крови мелких млекопитающих под влиянием глифосата // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 2015, № 54, с. 93–95.
18. Шувалова Н.Е., et al. Оценка безопасности гербицидов с помощью стилонихий // Актуальная биотехнология, 2018, № 3(26), с. 221–224.
19. Куликова Н.А., Лебедева Г.Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения: Учебное пособие. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010, 152 с.

УДК 63.631

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

Г.П. Шуваева, Т.В. Свиридова, О.Л. Мещерякова, В.Э. Дробных

Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

В настоящий момент получение новых антибиотиков практически приостановлено по ряду причин: мишень большинства антибиотиков – это один из трех ключевых прокариотических метаболических путей или процессов, а именно: биосинтез белка; репликация ДНК; биосинтез клеточной стенки бактерий; спонтанные мутации бактерий могут за несколько дней уничтожить труд нескольких лет и, наконец, примерно один миллион новых продуцентов необходимо проанализировать, чтобы найти всего лишь один новый антибиотик. В связи с этим, целесообразно использование вторичных метаболитов микробных культур, обладающих бактерицидными и бактериостатическими свойствами (бактерицинов). Исследование и выбор продуцента проводили на тест культуре, которая по мнению ВОЗ, является одной из наиболее устойчивых к воздействию уже известных антибиотиков – Escherichia coli. В ходе эксперимента был отобран штамм Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides 122, пригодный для промышленного синтеза антибиотического препарата. Опытным путем установлен оптимальный состав питательной среды и время культивирования, способствующие максимальному накоплению целевого продукта – лейкоцидина. Исследования свидетельствуют о наличии в супернатанте культуральной жидкости антибиотического компонента. Диаметр зон задержки роста тест-культур достигал 26–28 (мм). Это позволяет говорить о продуценте как о перспективной альтернативе использованию уже известных антибиотиков, вызывающих резистентность бактерий.

УДК 631.871

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ХВОИ *PICEA ABIES* НА РАННИЕ ЭТАПЫ ОНТОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Е.М. Короткова[1], Е.В. Ожимкова[2], М.Г. Сульман[2]

[1] Университет Åbo Akademi, Турку, Финляндия
[2] Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

На сегодняшний день Россия вырабатывает существенно меньше продукции переработки лесных ресурсов по сравнению с рядом других стран, гораздо менее богатых лесами. Полезное потребление древесной биомассы ограничивается, в основном, лишь стволовой древесиной. Вместе с тем известно, что до 20 % лесосечных отходов составляет древесную зелень, богатую уникальными биологически активными компонентами [1–2]. Для Тверской области экономический интерес представляет рациональная переработка древесной зелени ели европейской, которая преобладает в хвойных лесах региона (ареал около 1050,3 тыс. га). Хвоя является доступным возобновляемым ресурсом для получения уникальных веществ, обладающих высокой биологической активностью [3].

В представленной работе исследована биологическая активность водных экстрактов хвои *Picea abies* в опытах по проращиванию семян сельскохозяйственных культур *Linum usitatissimum, Secale cereal, Triticum vulgare, Avena sativa*.

При анализе результатов поисковых экспериментов, установлено, что проведение экстракции при температуре 23±0,5 °С и при гидромодуле 1:20 в темноте обеспечивает максимальный выход в раствор компонентов хвои, обеспечивающих ростостимулирующий эффект.

Для изучения влияния полученных экстрактов хвои на ранние этапы онтогенеза тест-объектов 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 КС-200 СПУ при температуре 22±1^0 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 растений в опытах служили энергия прорастания и всхожесть семян, общая длина и сырая биомасса проростков.

В опытах с использованием экстрактов хвои отмечено увеличение всхожести семян на 13–19 % (в зависимости от используемой тест-культуры), прироста средней длины ростков на 28–36 %, прироста биомассы на 25–35 % по отношению к контрольным экспериментам при проращивании семян и в чашках Петри, и в песчаной культуре.

Следовательно, водные хвойные экстракты можно рассматривать как эффективные стимуляторы роста различных сельскохозяйственных культур. Кроме того, проведены эксперименты по исследованию хранения получаемых экстрактов и установлено, что они полностью сохраняют свою биологическую активность в течение 19 дней (при температуре хранения 4±1 °С) без внесения каких-либо дополнительных консервантов или стабилизаторов. На методику получения стимуляторов роста растений из хвои получен патент РФ № 2704455 [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Корпачев, В.П. Экология лесопользования [Текст] / В.П. Корпачев, Г.С. Миронов // Красноярск: Изд-во СибГТУ, 2007. – 212 с.
2. Переработка древесных отходов предприятий лесопромышленного комплекса, как фактор устойчивого природопользования /А.П. Мохирев, Ю.А. Безруких, С.О. Медведев // Инженерный вестник Дона. -2015. – № 2.
3. Sahin, H.T. Chemical composition and utilization of conifer needles. A Review / H.T. Sahin, O.U. Yalcin // Journal of Applied Life Sciences International. – 2017. – № 14(3). – p. 1–11
4. Патент 2704455 Российская Федерация, МПК A01N 65/06(2009.01) / Способ получения стимулятора роста растений из растительного сырья / Сульман М.Г., Ожимкова Е.В., Орлов В.В., Сульман Э.М. Заявка № 2018146127, 2018.12.25, опубл. 2019.10.28

УДК 663, 577.15, 577.112.083

РАЗРАБОТКА РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩЕЙ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ БОБОВ ФАСОЛИ

Е.А. Прутенская, В.А. Сильченко

Тверской государственный технический университет, г. Тверь, Россия

В последнее время наибольшее внимание в пищевой промышленности уделяется сое, нуту и другим менее привычным для нашей страны культурам. К перспективному источнику пищевого белка, можно отнести семена фасоли, гороха, нута [1]. Ежегодно создаются и включаются в Реестр селекционных достижений новые селекционные сорта фасоли. Современные селекционные сорта фасоли обладают высоким фитохимическим потенциалом и характеризуются существенными сортовыми различиями. Сорта имеют высокое содержание белка, пищевых волокон, золы и крахмала [2]. Белки фасоли могут полностью покрывать потребность организма в незаменимых аминокислотах.

В последнее время обыкновенная фасоль и ее химические вещества приобретают все большее внимание в качестве функциональной или нутрицевтической пищи из-за ее богатого разнообразия фитохимических веществ с потенциальной пользой для здоровья.

Цель исследования направлена на решение задач по совершенствованию ресурсосберегающей технологии переработки зерновой фасоли с получением белковой и крахмалсодержащей продукции различного функционального назначения.

Исследования проводились на сорте Кидни (красная фасоль) и Бланш (белая фасоль). Результаты экспериментов выявили сортовые различия в химическом составе фасоли. В составе Кидни преобладает крахмал до 46,5 %, а в Бланше выше содержание белка до 26, 2 %. Основные этапы получения белковых веществ из фасоли включают в себя: измельчение сырья, ультразвуковая экстракция, отделение крахмалсодержащего сырья, осаждение белков, выделение белковых веществ, сушка, упаковка. Полученное крахмалсодержащее сырье либо сушат, либо подвергают гидролизу (кислотному, ферментативному).

Под действием ультразвука происходит разрушение липидно-белкового комплекса. Уменьшается размер белковых молекул и увеличивается ингибирующая активность по отношению к грибной амилазе с 10.89 ед./г до 17.05 ед./г. Ультразвуковое воздействие изменяет и физико-химические свойства крахмала: уменьшается вязкость при клейстеризации и происходит частичная деструкция зерна крахмала. Все это позволит сократить время и энергозатраты при гидролизе крахмалсодержащего сырья в производстве биотоплива.

Таким образом, разрабатываемый научный подход обладает новизной и способствует увеличению степени чистоты конечного продукта и его биологической активности. Использование доступного сырья (фасоли) приводит к снижению материальных затрат и ресурсосбережению.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ (грант 19–08–00185\19).

ЛИТЕРАТУРА

1. Романова Х.С. Разработка технологии фасолевого матрикса и функциональных продуктов на его основе/ Х.С. Романова. Дисс.на соискание к.т.н. – Саратов. – 2019. – 166 с.
2. Вебер А.Л. Фитохимический потенциал и ингибиторная активность новых сортов зернобобовых культур /А.Л. Вебер, С.А. Леонова, Ф.А. Давлетов // Техника и технология пищевых производств. – 2019. – Т.49. – № 2.-с. 281–288.
3. Reynoso-Camacho Bioactive components in common beans (Phaseolus vulgaris L.)/ Reynoso-Camacho, R, Ramos-Gomez, M and Loarca-Pina, G //Agricultural and Food Biotechnology. – 2006. – P. 217–236

УДК 664.22/27

КОМПЛЕКСНАЯ ПЕРЕРАБОТКА СЕМЯН БОБОВЫХ КУЛЬТУР

Е.В. Ожимкова, М.Г. Сульман

Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

Разработка технологий комплексной переработки семян бобовых культур может обеспечить получение новых добавок для повышения качества и биологической полноценности продуктов питания. Именно ресурсосберегающие технологии согласуются с инвестиционной политикой развития агропромышленного комплекса России и обеспечивают глубокую переработку сельскохозяйственной продукции. При объеме мирового производства бобовых в 75 млн тонн в год в России производят с среднем 2,3 млн тонн в год.

Бобовые имеют огромное продовольственное значение, их употребление в пищу обеспечивает людей необходимыми для жизни биохимическими компонентами, в первую очередь – белками, «медленными» углеводами с низким гликемическим индексом, а также солями фосфора, магния, калия, кальция. Кроме того, в сельскохозяйственном производстве бобовые культуры являются обязательным звеном при севообороте в интенсивных системах земледелия, благодаря чему, в свою очередь, обеспечивается постоянное возобновление данного вида сырья [1–4].

Целью представленной работы являлась разработка научных основ комплексной ресурсосбергающей технологии переработки биомассы семян бобовых культур.

В качестве растительного материала для проведения исследований использовались образцы коммерчески торговых марок зеленого и желтого гороха, белой и красной фасоли, красные бобы и зеленая чечевица. Предложенная в работе ультразвуковая экстракция позволяет увеличить выход белковых компонентов из растительного материала при существенном сокращении длительности процесса. Кроме того, предлагаемые условия проведения процесса с использованием ультразвукового воздействия, но без необходимости нагрева реакционной среды и внесения дополнительных растворителей для экстракции целевых компонентов обеспечивает сохранение биологической активности белков, что в свою очередь позволяет использовать их в качестве добавок для повышения биологической ценности пищевых продуктов. Например, белковые пасты, получаемые из бобовых культур, могут быть использованыв составе мясных продуктов паштетного и / или эмульсионного типа (колбасы, сосиски и т. д.), различных соусов и др.

Полученные крахмалы из бобовых культур могут быть использованы в качестве добавки к картофельному и кукурузному крахмалам для улучшения качества и физико-химических свойств, таких как устойчивость к ретроградации, увеличение водосвязывающей способности и т. д.

Использование ультразвуковой экстракции для получения белковых комплексов и крахмалов из семян бобовых культур не только обеспечивает более высокий выход целевых компонентов и сокращает время процесса, но кроме того, после обработки ультразвуком в растительной биомассе, остающейся после извлечения целевых компонентов, появляются четко выраженные изменения в структуре биоматериала, что позволит использовать данные отходы для получения биотоплив.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Nutritive quality and protein production from grain legumes in a boreal climate / C.I. Lizarazo [etc] //Journal of the Science of Food and Agriculture. -2015. – Vol.95, Is.10. – P. 2053–2064.
2. Sweetie R., Arjun K., Sharma A. Antioxidant and antimicrobial activity of legume hulls // Food Research International. -2011. – Vol.44. – P. 3182–3187.
3. Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate / M. Joshi [etc] //Food Chemistry/ – 2012. Vol. 134 (3). – pp. 1343–1353.
4. Protein-rich legume and pseudo-cereal crop suitability under present and future European climates / R. Manners [etc] //European Journal of Agronomy – 2020. Vol.113. – pp. 125974

УДК 615.074:614.7

ОРИЕНТАЦИЯ ГАПТЕНА И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИММУНОАНАЛИЗА МАЛЫХ МОЛЕКУЛ

М.А. Буркин, И.А. Гальвидис

НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Возможности конъюгационной химии не всегда позволяют необходимым образом ориентировать гаптен на молекуле иммуногена, чтобы обеспечить презентацию целевых (групповых или индивидуальных) детерминант, для индукции специфических антител. В настоящем исследовании, было исследовано влияние ориентации гликопептидных антибиотиков конъюгированных с белковым носителем, взятых в качестве модельных иммуногенов, на специфический репертуар иммунного ответа и создание систем их иммунохимического распознавания.

Антибиотики ристомицин А (РСТ), тейкопланин (ТПЛ), ванкомицин (ВКМ) и эремомицин (ЭРМ), несмотря на индивидуальные особенности, являются структурно-родственными гликопептидами (ГП) с единым механизмом антимикробной активности, связанным с подавлением полимеризации пептидогликана клеточной стенки грамположительных микроганизмов за счет связывания с D-Ala-D-Ala фрагментом (**Рисунок 1**).

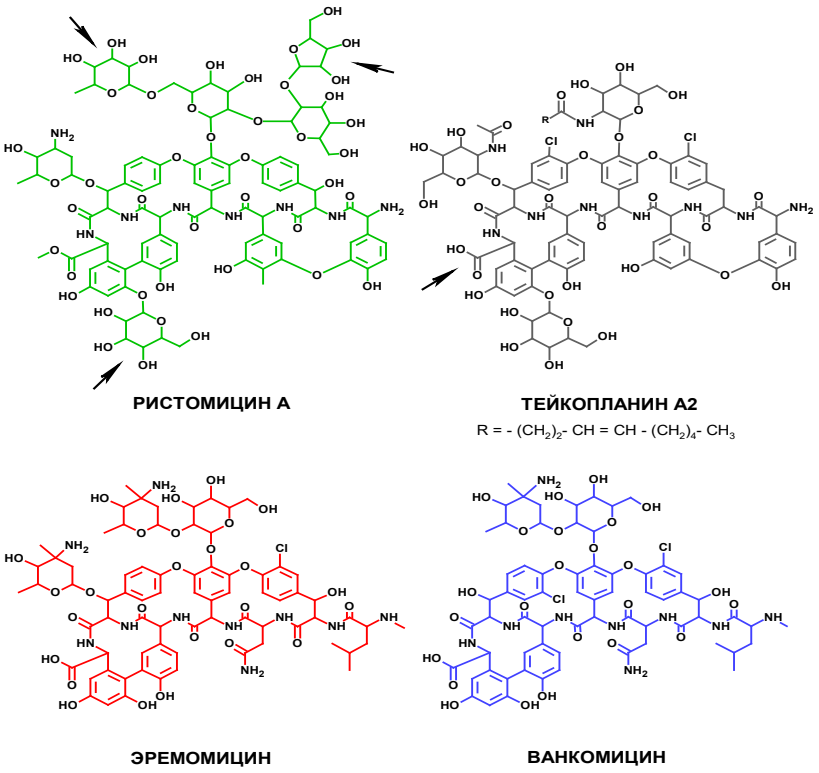


Рисунок 1. Структурные формулы гликопептидных антибиотиков. Сайты вероятного конъюгирования между антибиотиками и белками в иммуногенах обозначены стрелками.

Единый тип рецепции данных соединений подразумевает наличие у них идентичных структур, которые могут служить мишенью для их группового выявления. Среди иммунохимических методов описаны разные варианты определения ВКМ, ЭРМ и ТПЛ [**1–3**], однако отсутствуют сообщения о РСМ- и групповом иммуноанализе гликопептидов. В связи с этим, в настоящем исследовании предпринята попытка использования РСМ, в качестве нового гаптена, и ТПЛ для получения групп-специфических антител и создания единого метода для определения ГП антибиотиков. Эффект строго определенной и смешанной ориентации гаптена в составе иммуногена на спектр специфичности полученных иммунореагентов также являлись предметом изучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление конъюгатов. Для приготовления конъюгированных антигенов использовали методы конъюгационной химии, вовлекающие разные функциональные группы ГП. Конъюгаты на основе желатины (ЖЕЛ) в дальнейшем использовались в качестве твердофазных антигенов в иммуноферментном анализе (ИФА), а БСА-конъюгаты – для иммунизации.

ЖЕЛ-РСМ(га) и ЖЕЛ-ТПЛ(га) были приготовлены глутаральдегидным методом, использующим для конъюгирования с белком аминогруппы гаптенов [**4**].

ЖЕЛ(пи) – РСМ и ЖЕЛ(пи) – ТПЛ были образованы в ходе восстановительного аминирования между аминогруппами гаптенов и перйодат-окисленным гликопротеином [**5**].

ЖЕЛ-РСМ(эдк), ЖЕЛ-ТПЛ(эдк), а также ЖЕЛ-РСМ(аэ), ЖЕЛ-ТПЛ(аэ) и БСА-ТПЛ(аэ) конъюгаты были получены в результате конденсации с 1-этил-3- (3-диметиламинопропил) карбодиимидом (эдк) и в реакции активированных эфиров (аэ) с N-гидроксисукцинимидом между карбоксильными группами ГП и аминами белков [**4**]. Хотя ЭДК воздействует преимущественно на карбоксильные группы, в их отсутствие, как у РСМ, возможной мишенью карбодиимидной активации и потенциальным сайтом конъюгирования может стать фенольная группа [6].

ЖЕЛ-РСМ(ф) и ЖЕЛ-ТПЛ(ф) были приготовлены в реакции Манниха при использовании формальдегида в качестве сшивающего агента. Наиболее вероятным сайтом конъюгирования были фенил-резорциловые группировки гаптенов [**2**].

ЖЕЛ-РСМ(пи), ЖЕЛ-ТПЛ(пи) и БСА-РСМ(пи) Углеводные заместители гликопептидов окисляли периодатом натрия при его 1–3-кратном мольном избытке и подвергали восстановительному аминированию с белковыми аминогруппами [**7**].

При синтезе твердофазных антигенов соблюдали молярные соотношения ЖЕЛ/антибиотик – 1/25, а для синтеза иммуногенов соотношение между БСА и гаптенами составило 1/50. Все полученные конъюгаты очищали от избыточных реагентов в ходе диализа против фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7.2) в течение 2 сут при 10 °C при порозности диализной мембраны 14 кДа. Препараты конъюгатов (1 мг/мл) хранили при –15 °C в 50 % глицерине. Образование конъюгатов подтверждали на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония).

Иммунизация и подготовка антител. Схема иммунизации животных БСА-РСМ(пи) и БСА-ТПЛ(аэ) была одинаковой. Кроликам (2.0–2.5 кг) подкожно вводили по 100 мкг конъюгатов, эмульгированных в полном адъюванте Фрейнда. Последующие инъекции осуществляли ежемесячно, той же дозой иммуногенов в физрастворе. Спустя неделю после иммунизации брали кровь, а сыворотку анализировали в ИФА.

Процедура ИФА. Конъюгаты ГП на основе ЖЕЛ адсорбировали в 96-луночных планшетах Costar в карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9.6) течение ночи при 4° С. Планшеты трижды отмывали с использованием ФСБ с 0,05 % Твин-20 (ФСБ-Т). Затем в лунки вносили по 0.1 мл стандартных растворов ГП (0.1 -10000 нг/мл, (В) и 0 нг/мл, (B_0)) в ФСБ-Т и по 0,1 мл рабочего раствора антител и инкубировали 1 ч при 25 °C. После отмывки, связанные антитела проявляли с помощью антител к IgG кролика, меченных пероксидазой (1 ч, 37 °C). Ферментативную реакцию проводили с ТМБ-субстратной смесью, которую останавливали спустя 30 мин 1М H_2 SO_4, а оптическую плотность реакции учитывали при 450 нм с помощью StatFax 2100 (США). Относительное связывание антител (B/B_0) было обратно пропорционально концентрации аналита. По дозозависимым кривым для каждого антибиотика определяли его концентрацию 50 %-ного ингибирования связывания антител (IC_{50}). О специфичности судили по перекрестной активности антител в отношении структурных аналогов и рассчитывали как отношение концентраций $IC_{50\ ГЛАВНЫЙ\ АНАЛИТ}$ /$IC_{50\ АНАЛОГ}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез конъюгированных антигенов. Молекулы гликопептидов имеют целый ряд функциональных групп, которые позволяют использовать различные методы их конъюгирования с белками и, таким образом, по-разному ориентировать гаптен на носителе (**Рисунок 1**). В работе для получения конъюгатов использовали 6 различных методов конъюгирования, которые приводили к формированию 5 вариантов ковалентной связи (эдк = аэ) между гаптеном и носителем, как минимум по 4 функциональным группам гаптена (**Таблица 1**). Разнообразие достигнутого таким образом пространственного положения гаптена на носителе позволяло презентировать на антигене различные эпитопы гаптена. Этот прием обеспечил возможность избирательного связывания с антителами различной эпитопной специфичности и управления специфичностью анализа.

Таблица 1. Типы твердофазных антигенов, использованные в работе

Функциональные группы гаптена	Твердофазные антигены, приготовленные на основе ГП		Тип связи между белком (PR) и ГП в конъюгате
	РСМ	ТПЛ	
Амин	ЖЕЛ-РСМ(га)	ЖЕЛ-ТПЛ(га)	[PR-NH]-$(CH_2)_5$-[NH-ГП]
	ЖЕЛ(пи) – РСМ	ЖЕЛ(пи) – ТПЛ	[PR=CH]-[NH-ГП]
Карбоксил		ЖЕЛ-ТПЛ(эдк)	[PR-NH]-[CO-ГП]
		ЖЕЛ-ТПЛ(аэ)	[PR-NH]-[CO-ГП]
Фенил, Резорцил	ЖЕЛ-РСМ(ф)	ЖЕЛ-ТПЛ(ф)	[PR-NH] – CH_2-[CH=ГП]
	ЖЕЛ-РСМ(эдк)		
	ЖЕЛ-РСМ(аэ)		
Углеводные гидроксилы	ЖЕЛ-РСМ(пи)	ЖЕЛ-ТПЛ(пи)	[PR-NH]-[CH=ГП]

Получение антител и исследование специфичности анализа. При выборе иммуногена мы преследовали две цели 1) оценить специфичность иммунного ответа при экспозиции на иммуногене общих или индивидуальных детерминант гликопептидов, а также 2) исследовать эффект разнообразия презентации иммуногаптена на репертуар индуцируемых антител.

Несмотря на общее структурное сходство между РСМ и ТПЛ, индивидуальные различия особенно выражены в верхней части их формул (**Рисунок 1**) – длинный алифатический заместитель у ТПЛ и тетрасахаридный фрагмент у РСМ. Чтобы скрыть эти отличительные структурные черты, конъюгирование РСМ с БСА проводили с преимущественным вовлечением тетрасахаридного фрагмента, тем самым экранируя его от иммунного ответа белковым носителем.

При получении антител к ТПЛ, напротив, использовали иммуноген, в котором индивидуальные детерминанты ТПЛ не участвовали в конъюгировании с носителем и были наилучшим образом презентированы на иммуногене. С этой целью конъюгирование проводили по удаленной от этого сайта карбоксильной группе ТПЛ, используя метод активированных эфиров.

Оба антигена, БСА-РСМ(пи) и БСА-ТПЛ(аэ), выбранных для иммунизации, служили одновременно примерами конъюгатов со смешанной и однозначной ориентацией гаптена на носителе. Сайты наиболее вероятного конъюгирования указаны на **Рисунке 1** стрелками. Под контролем иммунного ответа было проведена серия иммунизаций, которая после пятого введения иммуногенов позволила получить антитела, обеспечивающие наилучшую чувствительность ИФА. Специфичность взаимодействия полученных антител, анти-БСА-РСМ(пи) и анти-БСА-ТПЛ(аэ), в дальнейшем изучали на панели конъюгированных твердофазных антигенов (**Таблица 1**) в конкурентном ИФА и оценивали профиль перекрестного взаимодействия с гликопептидами РСМ, ТПЛ, ЭРМ и ВКМ. Благодаря различному дизайну и ориентации гаптенов, эти конъюгаты, иммобилизованные на полистироловых планшетах, могли взаимодействовать с различными субпопуляциями анти-гаптенных антител сыворотки. Такой подход позволял переформатировать анализ индивидуальных соединений на распознавание целой группы аналитов, что было показано на примере 16-членных макролидов, амфениколов [**8**] и фторхинолонов [**9**]. В настоящей работе на модеди ГП антибиотиков мы исследовали роль экспозиции иммуногаптена на репертуар индуцируемых антител и эффективность антиген-опосредованной коррекции специфичности.

Анти-БСА-РСМ(пи). Взаимодействие анти-БСА-РСМ(пи) с конъюгатами гомологичного (РСМ) и гетерологичного (ТПЛ) гаптенов кардинально отличалось. Независимо от дизайна твердофазных антигенов, специфичность ИФА вариантов на основе РСМ-конъюгатов (Таблица 2А) оставалась исключительно РСМ-селективной. ТПЛ, ВКМ и ЭРМ не проявляли заметной ингибирующей активности (B/B_0 > 85 %) даже в концентрациях 1000 нг/мл, а их перекрестная активность не превышала 0.3 %. Метод конъюгации ЖЕЛ-РСМ привносил изменения в презентацию РСМ на антигенах и его распознавание антителами, что изменяло чувствительность анализа в диапазоне от 4.2 до 35 нг/мл.

Критическое изменение специфичности анализа происходило при замене иммобилизованного гаптена на гетерологичный ТПЛ (Таблица 2В). Иммобилизация ТПЛ на твердой фазе позволяла антителам к РСМ связываться со структурами общими как для РСМ, так и ТПЛ и других представителей этой группы соединений.

Благодаря разнообразному дизайну ТПЛ-конъюгатов, вариант с наиболее оптимальной ориентацией ТПЛ был выявлен, который обеспечивал связывание антител к групповым эпитопам. Так, ИФА на основе иммобилизованного ЖЕЛ-ТПЛ(пи) характеризовался наиболее выраженным групповым определением ГП с перекрестно активностью в отношении РСМ, ВКМ, ТПЛ и ЭРМ в диапазоне 37–100 %. Рабочий диапазон данного анализа 10–10000 нг/мл оказался приемлем для определения терапевтических концентраций данных антибиотиков в плазме крови [10].

Таблица 2. Перекрестное взаимодействие (%) анти-БСА-РСМ(пи) (А, В) и анти-ТПЛ(аэ) (С) антител с ГП в ИФА при иммобилизации на твердой фазе конъюгатов разного дизайна

А.						
ГП	Иммобилизованные антигены на основе РСМ					
	ЖЕЛ-РСМ(га)	ЖЕЛ(пи) – РСМ	ЖЕЛ-РСМ(ф)	ЖЕЛ-РСМ(эдк)	ЖЕЛ-РСМ(аэ)	ЖЕЛ-РСМ(пи)
РСМ	100 (35)*	100 (4.2)	100 (35)	100 (18)	100 (5.2)	100 (12)
ТПЛ	< 0.3	< 0.04	< 0.3	< 0.2	< 0.05	< 0.1
ЭРМ	<0.3	< 0.04	<0.3	< 0.2	< 0.05	< 0.1
ВКМ	<0.3	< 0.04	<0.3	< 0.2	< 0.05	< 0.1
В.						
ГП	Иммобилизованные антигены на основе ТПЛ					
	ЖЕЛ-ТПЛ(га)	ЖЕЛ(пи) – ТПЛ	ЖЕЛ-ТПЛ(ф)	ЖЕЛ-ТПЛ(эдк)	ЖЕЛ-ТПЛ(аэ)	ЖЕЛ-ТПЛ(пи)
РСМ	100 (118)*	-**	100 (393)	-	100 (350)	100 (90)
ТПЛ	77	-	462	-	402	37
ЭРМ	4.2	-	7.4	-	8.1	100
ВКМ	42	-	< 3.9	-	< 3.5	37
С.						
ГП	Иммобилизованные антигены на основе ТПЛ					
	ЖЕЛ-ТПЛ(га)	ЖЕЛ(пи) – ТПЛ	ЖЕЛ-ТПЛ(ф)	ЖЕЛ-ТПЛ(эдк)	ЖЕЛ-ТПЛ(аэ)	ЖЕЛ-ТПЛ(пи)
РСМ	100 (5.0)*	100 (7.4)	100 (3.8)	-**	-	100 (3.5)
ТПЛ	< 0.5	< 0.5	< 0.5	-	-	< 0.5
ЭРМ	< 0.5	< 0.5	< 0.5	-	-	< 0.5
ВКМ	< 0.5	< 0.5	< 0.5	-	-	< 0.5

* – Чувствительность анализа представлена значением IC_{50} (нг/мл).
** – Взаимодействие не происходило, либо не подавлялось свободным гаптеном.

Таким образом, конъюгация РСМ по нескольким сайтам на его углеводных фрагментах способствовала его разнообразной ориентации на иммуногене и индуцировала выработку антител с мульти-эпитопной специфичностью. Последующее аффинное «фракционирование» с помощью антигенов разного структурного дизайна оказалось весьма эффективным и позволило разработать анализ как селективным определением РСМ, так и для группового выявления нескольких ГП.

Анти-БСА-ТПЛ(аэ). Иммунная реакция на однозначно ориентированный гаптен рассматривалась в работе на примере Анти-БСА-ТПЛ(аэ), перекрестное взаимодействие которых с представителями ГП изучалось на всей панели приготовленных конъюгатов. Однако, было обнаружено, что лишь конъюгаты на основе гомологичного гаптена способны взаимодействовать с анти-БСА-ТПЛ(аэ). Связывание антител с ЖЕЛ-ТПЛ(аэ) и ЖЕЛ-ТПЛ(эдк) гомологичными по типу связи между гаптеном и носителем было активным, но не могло подавляться свободным гаптеном (Таблица 2С).

Специфичность остальных 4 вариантов анализа, несмотря на различную презентацию ТПЛ на твердофазных антигенах, оказалась строго ТПЛ-селективной, и чувствительность варьировала незначительно (IC_{50} = 3.5–7.4 нг/мл) по сравнению с более выраженным эффектом на РСМ-системах анализа (IC_{50} = 4.2–35 нг/мл). Рабочий диапазон анализа ТПЛ составил 0.2–100 нг/мл, позволял тестировать минимальные объемы биологических жидкостей и элиминировать возможный матрикс-эффект за счет разведения образца.

Выявленные различия между иммунным ответом на РСМ и ТПЛ связаны с репертуаром специфичности антител, сформированным в ответ на доступные детерминанты гаптена. Чем более однозначной является ориентация гаптена на белковом носителе, тем более ограничен репертуар специфичности антител и более однородны их свойства в изменяющихся условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена изучению взаимосвязи между пространственным представлением гаптена в составе иммуногена и репертуаром иммунного ответа с целью создания групп-специфических иммунореагентов. Гликопептидные антибиотики в качестве модельных гаптенов/аналитов были презентированы на иммуногенах в однозначной и смешанной ориентации с помощью соответствующих методов конъюгации. Поликлональные анти-ТПЛ антитела, полученные к БСА-ТПЛ(аэ) со строго определенным положением ТПЛ, продемонстрировали селективность по отношению к ТПЛ и были неспособны распознавать родственные ГП. Репертуар антител был однородным, специфичность анализа оставалась неизменной при модификации твердофазного антигена, а чувствительность 4 вариантов ИФА к ТПЛ варьировала незначительно 3,5–7,4 нг/мл.

РСМ был конъюгирован с БСА по нескольким гликозидным сайтам, поэтому был по-разному ориентирован на иммуногене. Этот иммуноген стимулировал выработку более широкого спектра антител с различной субспецифичностью. Анти-РСМ-антитела позволяли селективно выявлять РСМ в ИФА на антигенах с гомологичным гаптеном, чувствительность варьировала от 4,2 до 35 нг/мл. Один из гетерологичных антигенов, ЖЕЛ-ТПЛ(пи), был выбран в качестве специфического сорбента для связывания анти-РСМ антител к общим групповым эпитопам ГП. Эти реагенты послужили основой группового ИФА для выявления РСМ, ТПЛ, ЭРМ и ВКМ с перекрестной реактивностью 37–100 % и детекцией в диапазоне 10–10000 нг/мл. Таким образом, смешанная ориентация иммунизирующего гаптена, в отличие от однозначной пространственной ориентации, способствует расширению репертуара иммунного ответа к эпитопам гаптена и открывает более широкие возможности для селекции реагента с требуемой тонкой специфичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pfaller M.A., Krogstad D.J., Granich G.G., Murray P.R. Laboratory evaluation of five assay methods for vancomycin: Bioassay, high-pressure liquid chromatography, fluorescence polarization immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence immunoassay. J. Clin. Microbiol. 1984, 20, 311–316.
2. Burkin M.A.; Burkin A.A. Enzyme immunoassay for the determinationof the glycopeptide antibiotic eremomycin. Appl. Biochem. Microbiol. 2009, 45, 210–214.
3. Corti A., Cavenaghi L., Giani E., Cassani G. A receptor-antibody sandwich assay for teicoplanin. Clin. Chem. 1987, 33, 1615–1618.
4. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques, 3d ed.; Elsevier: Amsterdam, 2013; p. 1140.
5. Galvidis I.A., Eremin S.A., Burkin M.A. Development of indirect competitive enzyme-linked immunoassay of colistin for milk and egg analysis. Food Agric. Immunol. 2020, 31(1), 424–434.
6. Carraway K.L., Koshland D.E. Jr. Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents. Biochim. Biophys. Acta 1968, 160, 272–274.
7. Galvidis I.A., Burkin K.M., Eremin S.A., Burkin M.A. Group-specific detection of 2-deoxystreptamine aminoglycosides in honey based on antibodies against ribostamycin. Anal. Methods 2019, 11, 4620–4628.
8. Galvidis I.A., Eremin S.A., Burkin M.A. Three for the price of one! Immunodetection of three amphenicols in foodstuffs using universal standard curve. Anal. Methods 2020, 12, 1728–1735.
9. Burkin M.A., Galvidis I.A. Simultaneous and differential determination of drugs and metabolites using the same antibody: Difloxacin and sarafloxacin case. Anal. Methods 2016, 8, 5843–5850.
10. Lamont, E.; Seaton, R.A.; Macpherson, M.; Semple, L.; Bell, E.; Thomson, A.H. Development of teicoplanin dosage guidelines for patients treated within an outpatient parenteral antibiotic therapy (OPAT) programme. J. Antimicrob. Chemother. 2009, 64, 181–187.

УДК 615.074

ГРУППОВОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОГЛИКОЗИДОВ С ПОМОЩЬЮ ИФА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

И.А. Гальвидис[1], К.М. Буркин[1,2], М.А. Буркин[1]

[1] НИИВС им. И.И. Мечникова», Москва, Россия
[2] МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Аминогликозиды (АГ) представляют собой большую группу природных и полусинтетических антибиотиков с широким спектром антимикробной активности в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. В настоящее время несколько представителей семейства аминогликозидов – гентамицин (ГМ), неомицин В (НМ), паромомицин (ПМ), канамицин (КМ), апрамицин (АП) и стрептомицин (СТМ) (Рис. 1) – одобрены для лечения инфекционных заболеваний животных, и для них установлены максимально допустимые уровни содержания в продукции животноводства [1]. В связи с этим для контроля безопасности продуктов питания и определения остаточного содержания в них АГ необходим эффективный и надежный анализ.

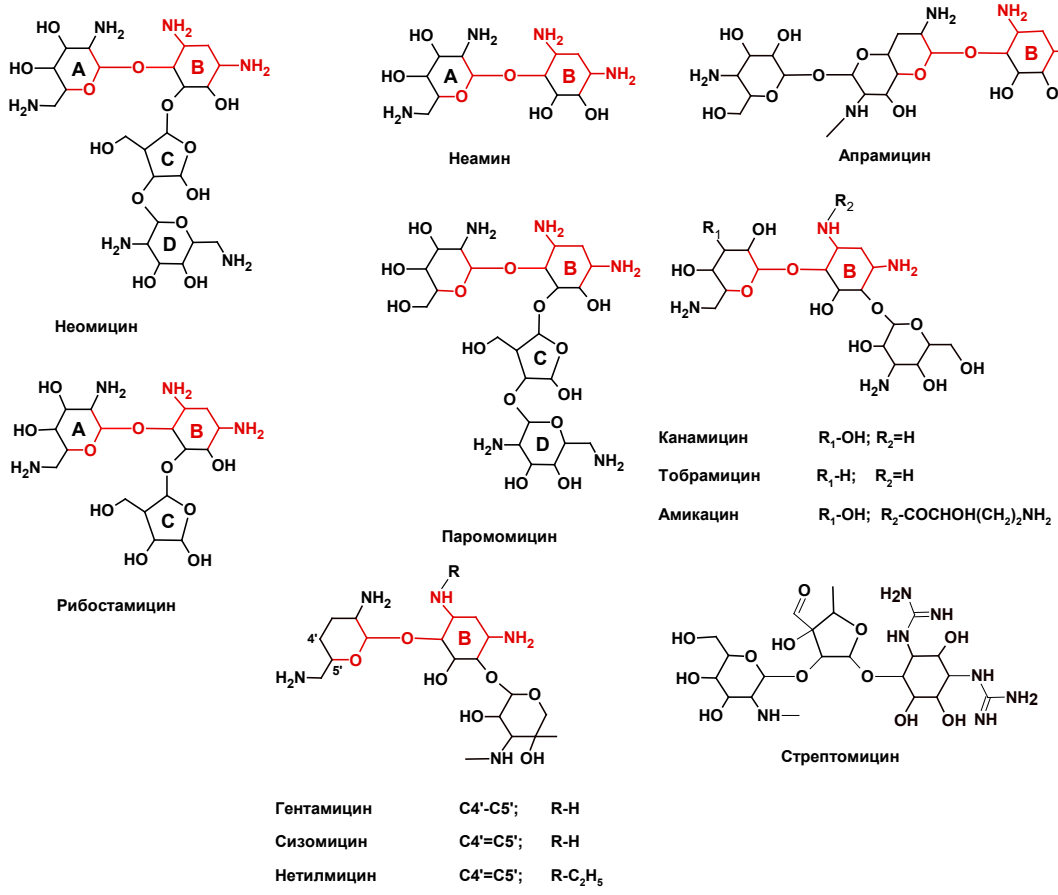


Рисунок 1. Структурные формулы аминогликозидов

В настоящем исследовании для одновременного обнаружения пяти упомянутых АГ в пищевых продуктах предложен иммуноферментный анализ с групповой специфичностью. Поликлональные кроличьи антитела были получены к конъюгированному с бычьим сывороточным альбумином (БСА) рибостамицину (РС), что определило их специфичность к общему фрагменту большинства АГ, 2-дезоксистрептамину (2-ДОС) и возможность распознавания целого ряда АГ. Разработанный групп-специфичный анализ был применен для обнаружения аминогликозидов в мёде [2].

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Неомицин В, рибостамицин, неамин (НА), паромомицин, канамицин, тобрамицин (ТМ), амикацин (АМ), гентамицин, нетилмицин (НТМ), сизомицин (СЗМ), генетицин (ГЦ), апрамицин и стрептомицин были приобретены у ХИММЕД (Москва, Россия). В работе использовали БСА, полный адъювант Фрейнда, 1,6 – гександиамин, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (ЭДК), периодат натрия и борогидрид натрия (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, США), желатин (ЖЕЛ) (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США), сахарозу (Serva, Германия), фосфатно-солевой буфер с 0.05 % твин 20 (ФСБ-Т) и двухкомпонентный раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) Биосервис (Москва, Россия), козьи антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (АК-ПХ) (ИМТЭК, Москва, Россия). Образцы меда были приобретены в местных торговых точках г. Москвы.

Приготовление конъюгатов. Два типа конъюгатов для иммунизации были приготовлены на основе РС и БСА – без и с использованием спейсера С6 между гаптеном и белковым носителем. РС обрабатывали перйодатом натрия для окисления гидроксильных фрагментов рибозы до реакционноспособных альдегидных групп, а затем связывали с аминами БСА посредством восстановительного аминирования. Для удаления несвязанного РС проводили диализ. С использованием аналогичной процедуры был синтезирован конъюгат ЖЕЛ-РС для иммобилизации на планшетах.

Для приготовления БСА-С6-РС сначала модифицировали БСА 1,6 – гександиамином. БСА активировали с помощью ЭДК в течение 30 минут, а затем добавляли 1,6 – гександиамин и перемешивали в течение 2 часов. Модифицированный белок очищали от избыточных реагентов в ходе диализа, и полученный БСА-С6-NH2 конъюгировали с перйодат-окисленным РС в процессе восстановительного аминирования.

Иммунизация и подготовка антител. БСА-РС и БСА-С6-РС были использованы в качестве иммуногенов. Кроликам (2,0–2,5 кг) вводили подкожно в 10–15 точек спины 0,1 мг иммуногена, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда. Такие же дозы иммуногенов в физиологическом растворе вводили ежемесячно для повторных иммунизаций. Через неделю после каждой инъекции для контроля иммунного ответа брали образец крови из латеральных вен уха кроликов. Полученные антисыворотки хранили в глицерине (1:1, v/v.) при -15 °С до тестирования в ИФА.

Процедура ИФА. Конкурентный анализ проводился по классической методике. ЖЕЛ-РС наносили на полистироловые 96-луночные планшеты Costar и оставляли на ночь. Неадсорбированный конъюгат отмывали с использованием ФСБ-Т. Следующий конкурентный этап (1 ч, 25 °С) включал взаимодействие с иммобилизованным антигеном рабочего раствора антител (0,1 мл) в присутствии 0,1 мл стандартных растворов АГ (0.1 мл, 1 пг/мл – 1 мкг/мл, (В) и 0 мкг/мл, (B_0)) в ФСБ-Т или 0,1 мл тестируемого образца. После отмывки связанные с иммобилизованным ЖЕЛ-РС антитела детектировали с помощью АК-ПХ (1 ч, 37 °С). Окрашенный продукт, образовавшийся в результате ферментативной реакции с субстратной смесью ТМБ (0,5 ч, 25 °С), регистрировали при 450 нм на планшетном ридере StatFax 2100 (Awareness Technologies, США).

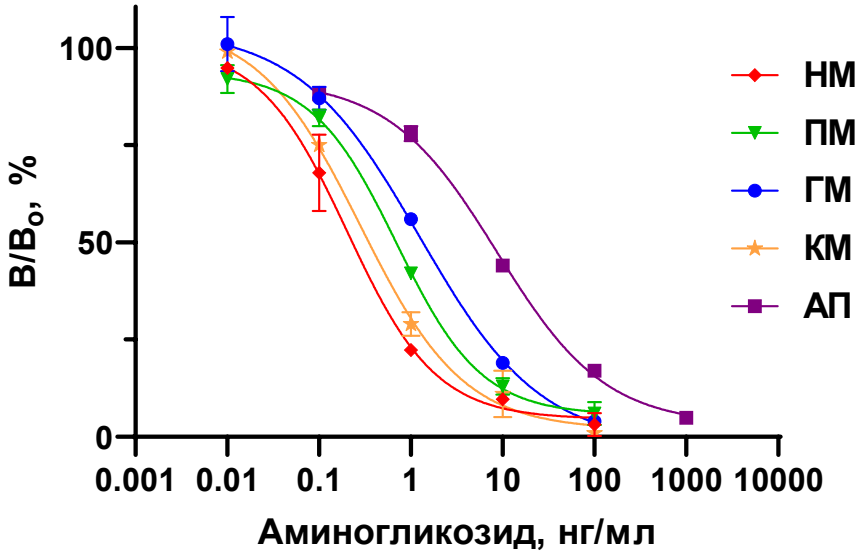
Зависимость относительного связывания антител (B/B_0) от концентраций аналита выражали в виде калибровочных кривых. Перекрестную реактивность для каждого представителя АГ рассчитывали как отношение концентраций 50 %-ного ингибирования IC_{50} НМ/IC_{50} АГ. Рабочим диапазоном анализа считали область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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез иммуногена и получение антител. В большинстве публикаций, посвященных иммуноанализу АГ, иммуногены, антигены, ферментные конъюгаты или трейсеры были получены карбодиимидным или глутаральдегидным методами с участием аминогрупп АГ [3–7]. При этом, из-за наличия нескольких (3–6) аминогрупп в молекулах АГ возможно образование конъюгатов с переменной ориентацией гаптена.

В настоящем исследовании РС был выбран в качестве иммунизирующего гаптена из-за следующих преимуществ: будучи трисахаридом, РС имеет размер молекулы, сопоставимый с большинством АГ; три кольца РС А-В-С (Рис. 1) идентичны таковым у НМ; окислению перйодатом подвержены преимущественно вицинальные гидроксильные группы, поэтому при конъюгировании с белком мы смогли задействовать С-фрагмент РС, который обеспечивал строгую ориентацию гаптена на носителе с благоприятной презентацией фрагмента 2-ДОС. Полученные БСА-РС и БСА-С6-РС сравнивали, чтобы выявить, какая конструкция иммуногена обеспечит лучшую презентацию общего фрагмента молекул АГ и индукцию групп-специфического ответа.

Антитела к БСА-РС продемонстрировали умеренную чувствительность (НМ, IC_{50} = 10 нг/мл) и высокую селективность в отношении НМ с относительно низкой перекрестной реактивностью (<5 %) для ГМ, КМ и АП. Применение спейсера С6 в иммуногене способствовало лучшему представлению 2-ДОС эпитопа и индукции антител с распознаванием широкого спектра различных АГ. Кроме того, анти-БСА-С6-РС антитела продемонстрировали лучшую чувствительность (НМ, IC_{50} = 0,2 нг/мл). Таким образом, последующие исследования проводились с использованием антител к БСА-С6-РС.



Аминогликозид	IC_{50}, нг/мл	Диапазон измерения IC_{20}-IC_{80}, нг/мл	Предел определения, нг/мл	Предел определения в меде, мкг/кг
НМ	0.2	0.03–2.1	0.02	1.0
ПМ	0.7	0.08–7.1	0.05	2.5
ГМ	1.5	0.15–13.3	0.11	5.5
КМ	0.35	0.05–3.9	0.04	2.0
АП	6.8	0.5–96.8	0.23	11.5

Рисунок 2. Стандартные кривые и аналитические параметры ИФА-системы для группового определения аминогликозидов в мёде. Взаимодействие анти-БСА-РС с антигеном ЖЕЛ-РС в 5 % растворе сахарозы в качестве имитатора меда. Предел обнаружения в 5 % растворе сахарозы определяли согласно ПО = B_0 – 3 × SD.

Исследование специфичности анализа и выбора иммунореагентов. Среди нескольких исследованных вариантов конкурентного анализа наиболее широким спектром распознавания характеризовался гомологичный формат анализа [2]. Для оценки его специфичности была изучена панель следующих АГ, и была определена их перекрестная реактивность: НА (625 %), РС (250 %), НМ (100 %), КМ (47,5 %), ПМ (17,3 %). ГМ (9,0 %), ТМ (7,8 %), АП (1,7 %), СЗМ (1,2 %), АМ (<0,1 %), ГЦ (<0,1 %), СТМ (<0,1 %) и НТМ (<0,1 %). Большинство из этих аналитов используются в медицинской и ветеринарной областях, однако для использования в животноводстве регламентированы только НМ, ПМ, ГМ, КМ, АП и СТМ [1].

Определение АГ в мёде и выбор имитатора матрицы. Мед – это сложный продукт, состоящий из углеводов (75–80 %), витаминов, белков, ферментов, органических кислот, микроэлементов, включений и других компонентов. Эти компоненты могут вызывать помехи в ходе иммунохимической реакции и препятствовать корректному измерению аналита. В связи с этим, выделение АГ из мёда обычно является трудоемкой и длительной процедурой. В качестве альтернативного подхода в данной работе рассмотрено использование имитаторов матрикс-эффекта меда на связывание антител.

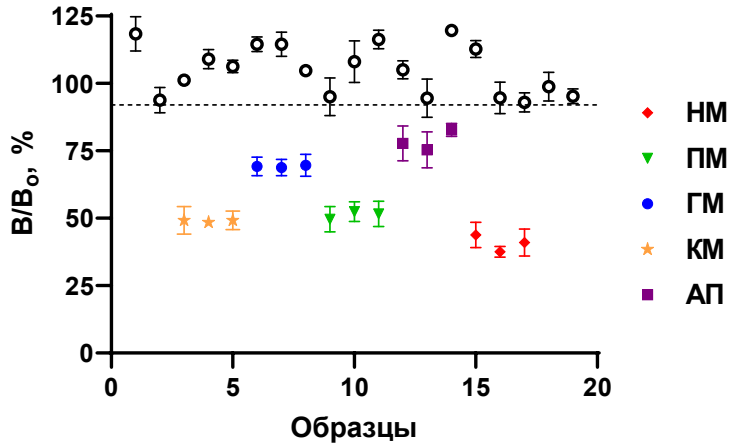


Рисунок 3. Обнаружение АГ в образцах меда с использованием группового ИФА. Каждый символ соответствует среднему относительному связыванию, и ошибка – получена для отдельного образца меда, проанализированного в трех экземплярах. Пустые символы представляют отдельные пустые образцы меда (липовый, гречишный и цветочный), а заполненные символы представляют те же самые образцы, содержащие АГ на уровне 40 мг/кг (уровень аналогичный МДУ для СТМ, принятый в некоторых странах). Пунктирная линия соответствует пределу определения анализа, полученного для имитатора матрикса (5 % сахароза-ФСБ-Т)

В качестве имитатора меда была выбрана сахароза, поскольку она оказывала влияние на связывание антител, подобное меду. Обнаружена взаимосвязь между растворами мёда и растворами сахарозы, проявляющими одинаковый матрикс-эффект. Две пары с эквивалентным эффектом представляли растворы: 1/20 мёд = 20 % сахароза и 1/50 мёд = 5 % сахароза. Из-за неудобства работы с высоковязким 20 %-ным раствором сахарозы последний вариант был выбран как более предпочтительный.

Определение АГ в мёде могло быть выполнено количественно, если искомый аналит известен. Для количественного определения АГ в меде образец разводили в 50 раз в ФСБ-Т и получали стандартную кривую АГ в 5 % сахарозе-ФСБ-Т (Рис. 2).

Если аналит неизвестен, разработанный для групповой ИФА использовался в качестве скринингового теста. В этом случае анализируемый образец считался загрязненным, если он вызвал связывание антител ниже порогового уровня (cut-off, Рис. 3). Таким образом, разработанный тест был способен выявить загрязнение мёда 9 АГ, из которых 5 одобрены для использования у сельскохозяйственных животных (НМ, ПМ, ГМ, КМ и АП), на уровне 10 мкг/кг, а также НА, РС, СЗМ и ТМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан новый непрямой конкурентный ИФА для группового выявления аминогликозидов. Впервые в качестве иммунизирующего гаптена для получения антител против 2-ДОС, общего фрагмента большого количества АГ, использован РС. Анализ позволял обнаружить широкий спектр представителей аминогликозидов, включая НМ, РС, НА, ПМ, ГМ, СЗМ, КМ, ТМ и АП, с пределом их определения 0,02–0,2 нг/мл. Для анализа меда был разработан имитатор матрикс-эффекта, позволяющий значительно упростить пробоподготовку исследуемого материала. Анализ образца меда позволил выявлять любой из упомянутых ветеринарных АГ в меде на уровне 10 мкг/кг.

ЛИТЕРАТУРА

1. EC Council Regulation (EU) № 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin //Off J Eur Union. – 2009. – V. 15. – P. 1–72.
2. Galvidis I.A. et al. Group-specific detection of 2-deoxystreptamine aminoglycosides in honey based on antibodies against ribostamycin //Analytical Methods. – 2019. – V. 11. – № 36. – P. 4620–4628.
3. Thompson S.G., Burd J.F. Substrate-labeled fluorescent immunoassay for amikacin in human serum //Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1980. – V. 18. – № 2. – P. 264–268.
4. Li C. et al. Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY antibody based ic-ELISA and FPIA //Food chemistry. – 2017. – V. 227. – P. 48–54.
5. Galvidis I.A., Burkin M.A. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the aminoglycoside antibiotic kanamycin in foodstuffs //Russian journal of bioorganic chemistry. – 2010. – V. 36. – № 6. – P. 722–729.
6. Haasnoot W. et al. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney //Analyst 1999. V. 124. – № 3. – P. 301–305.
7. Peng J. et al. Multiplex lateral flow immunoassay for five antibiotics detection based on gold nanoparticle aggregations //RSC advances. – 2016. – V. 6. – № 10. – P. 7798–7805.

УДК 57.085.23

КУЛЬТУРА SHED – МИКРОСПОР ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ

А.О. Блинков[1,2], В.С. Рубец[2], М.Р. Халилуев[1,2]

[1] ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия
[2] Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Гаплоидные технологии стали незаменимым инструментом в селекции растений, с их помощью стало возможным закреплять ценные рецессивные признаки, проводить за короткие сроки интрогрессии генов устойчивости при отдалённой гибридизации, осуществлять манипуляции с уровнями плоидности и за один сезон получать чистые линии. Для эффективной работы с данными методами необходима большая исходная популяция удвоенных гаплоидов, однако до сих пор ограничивающими факторами у злаков остаются низкий уровень формирования эмбриоидов, трудности с регенерацией и дигаплоидизацией, а также альбинизм. В связи с этим, важной составляющей современных исследований является повышение эффективности формирования эмбриогенных структур при культивировании различных эксплантов: пыльников и микроспор. Подбор условий и режимов для выделения микроспор у самоопыляющихся злаков особенно важен, поскольку у них непрочная экзина, разрушение которой приводит к их гибели и снижению выхода гаплоидных растений соответственно.

За основу настоящей работы для изолирования и культивирования микроспор был использован немеханический метод их выделения, который в английской научной литературе называют shed-microspores culture. Его преимуществом является простота и меньшая подверженность микроспор стрессам, в отличие от механического изолирования, в котором присутствуют такие этапы как измельчение растительного материала, многократные центрифугирования, отделение дебриса через ряд фильтров. Несмотря на то, что данному методу выделения микроспор посвящено мало работ (Ziauddin et al., 1990; Supena et al., 2006; Ari et al., 2016), во всех случаях отмечается тенденция к формированию максимального количества эмбриоподобных структур. Таким образом, целью данной работы являлась оценка эффективности культивирования shed – микроспор на выход гаплоидных растений озимой тритикале.

Растительным материалом для исследований служили гибриды озимой тритикале: F_2 130h, F_2 967h и F_3 557h. Донорные растения выращивали в полевых условиях. Предварительно колосья, содержащие ранние одноядерные микроспоры, выдерживали при 4 °C в течение 14 суток. За этот период времени микроспоры достигали средней одноядерной вакуолизированной стадии развития.

Микроспоры изолировали двумя методами:

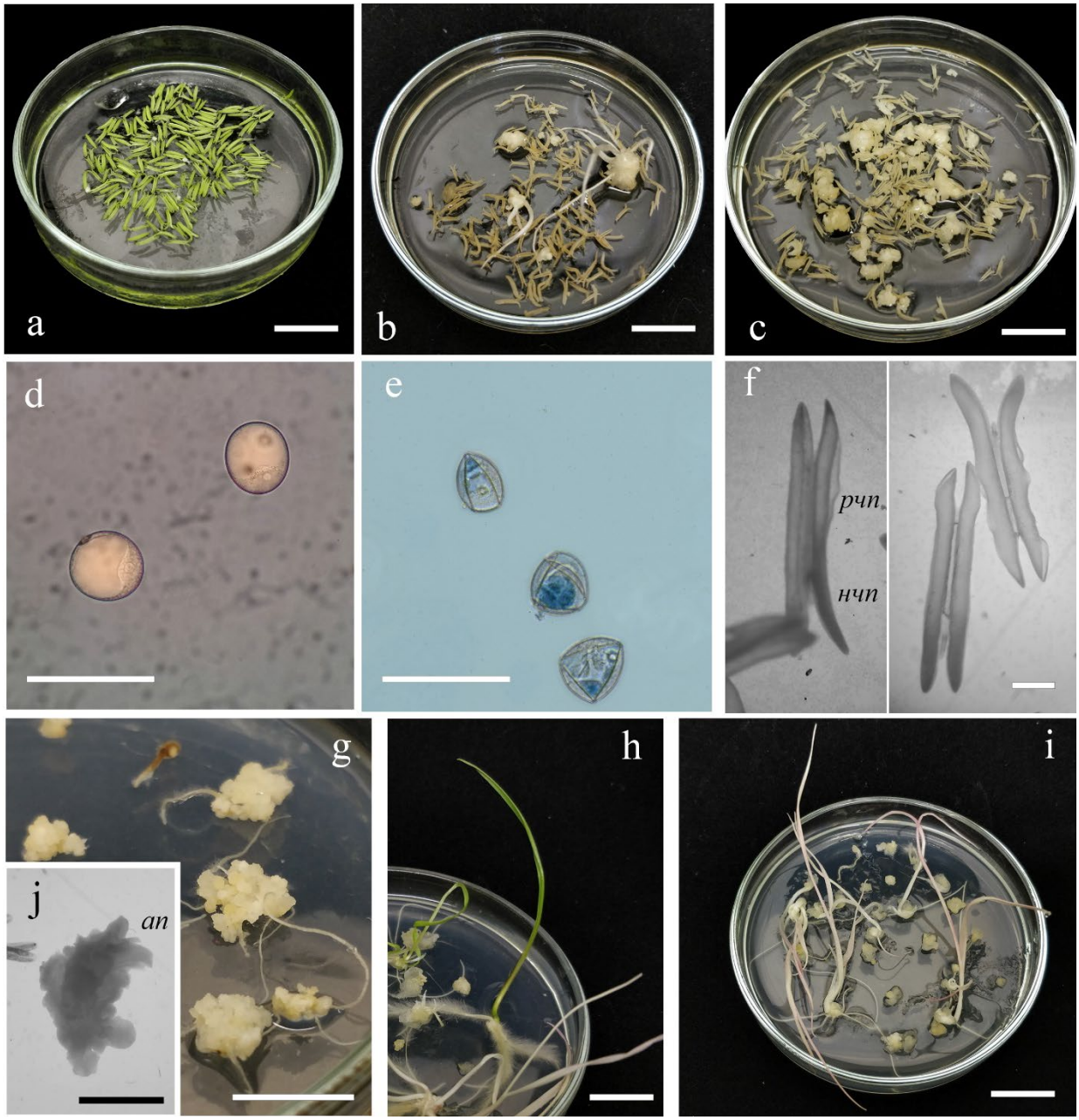
1. В различных концентрациях раствора маннитола (0,3 М, 0,5 М и 0,7 М), из расчёта пыльники двух колосьев/ 20 мл раствора маннитола (что составляет примерно 10 пыльников/1 мл). Инкубировали в темноте при 28 °C.

2. В неагаризованной питательной среде 190–2 с увеличенной концентрацией мальтозы до 90 г./л. Пыльники помещали в среду с такой же плотность, как описано в первом методе. Микроспоры инкубировали в темноте при 28 °C до формирования эмбриоподобных структур.

Для сравнения эффективности культивирования shed – микроспор параллельно был проведен эксперимент по культивированию механически- изолированных микроспор согласно Pauk et al., 2000.

Оценку жизнеспособности микроспор осуществляли красителем Голубым Эванса. Новообразования переносили на агаризованную питательную среду 190–2Cu для формирования полноценных растений. Культивирование осуществляли при 16/8-часовом фотопериоде и температуре 25 °C.

Ни в одной из концентраций маннитола не наблюдался обильный выход микроспор на 3 сутки, хотя Ziauddin et al., 1990 описывает выход 2/3 микроспор ячменя в раствор 0,3 М маннитола в течение первых трёх дней. Начиная с 5 суток можно было заметить небольшой выход микроспор, который отмечали визуально по образованию мутной зернистой среды и цитологическому анализу. На 10 сутки пыльцевые мешки все ещё в основном были целиком заполнены микроспорами. Оценка жизнеспособности микроспор на 10 сутки культивирования в маннитоле показала высокую степень плазмолизирования (Рис. е). В связи с высокой гибелью микроспор дальнейшую работу по их культивированию данным методом мы не производили.



При использовании второго метода наблюдался более дружный выход микроспор на пятые сутки, однако полного выхода микроспор не наблюдалось. В течение культивирования происходило раскрытие щелей и выход микроспор практически у всех культивируемых пыльников (Рис. f). На 10 сутки в среднем наблюдалось 40 % жизнеспособных микроспор (Рис. d). В работе Supena et al., 2006 пыльники перца раскрывались только после 2–3 недели культивирования. В то же время Ziauddin et al., 1990 сообщает, что при культивировании пыльников ячменя в жидкой питательной среде процент вышедших микроспор был очень мал и в дальнейшем, после отделения микроспор от пыльников они плазмолизировались.

Формирование эмбриоподобных структур наблюдалось на 5–6 неделю культивирования (Рис. b, c). Аналогичные сроки формирования новообразований сообщают и другие авторы для методов культивирования изолированных микроспор и пыльников (Pauk et al., 2000). Однако в работе Ziauddin et al., 1990 культивирование shed – микроспор способствовало скорейшему формированию эмбриоидов в 2 раза. В основном все полученные эмбриоподобные структуры формировались непосредственно вне пыльников, что идентично результатам Supena et al., 2006.

Культивирование shed – микроспор озимой тритикале показало высокую эффективность: гаплоидные растения были получены у всех изучаемых генотипов. В основном происходило формирование каллуса (рис. j). Для гибрида F_2 130h средний выход составил 3 новообразования (рис. b), для F_2 967h 60 новообразований и для гибрида F_3 557h 116,7 новообразований (рис. c) на 200 пыльников. Механическое изолирование микроспор оказалось безрезультатным, подобную ситуация описывает Ziauddin et al., 1990, который сообщает, что трудно повторить процедуры других лабораторий, вероятно из-за сильного влияния роста растений.

Количество регенерированных растений составило в среднем 24 % от общего количества эмбриогенных структур, из которых только 10 % оказались зелёными (рис. h). Формирование неморфогенных каллусов (рис. g) и высокий уровень растений – альбиносов (рис. i) являются для нас главными проблемами, которые в дальнейшем мы собираемся решать. Трудности при использовании данного метода описывают и другие авторы: формирование многоклеточных структур без последующей регенерации (Ziauddin et al., 1990), формирование дефектных, не способных к росту, верхушечных побегов у перца (Supena et al., 2006).

Механизм, при котором происходит растрескивание незрелых пыльников с последующим выходом микроспор до сих пор точно не описан. Ziauddin et al., 1990 предполагает, что возможно роль играет кратковременное голодание в растворе маннитола, которое приводит к быстрому старению стенок пыльника. Мы же, основываясь на том, что культура shed – микроспор возможна и в жидких питательных средах (Supena et al., 2006) выдвигаем гипотезу, что быстрое растрескивание пыльников в культуре in vitro (растрескивание in vivo происходит гораздо позже во время цветения) возникает из-за осмотического давления среды, в которой они находятся.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ziauddin A., Simion E., Kasha K.J. Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (Hordeum vulgare L.) cv. Igri //Plant cell reports. – 1990. – Т. 9. – №. 2. – С. 69–72.
2. Pauk J. et al. In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture //Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2000. – Т. 61. – №. 3. – С. 221–229.
3. Supena E.D.J. et al. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (Capsicum annuum L.) //Plant cell reports. – 2006. – Т. 25. – №. 1. – С. 1–10.
4. Ari E. et al. Androgenic responses of 64 ornamental pepper (Capsicum annuum L.) genotypes to shed-microspore culture in the autumn season //Turkish Journal of Biology. – 2016. – Т. 40. – №. 3. – С. 706–717.

УДК 66.047

УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА В ПОВЫШЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ К ДЕФИЦИТУ ВЛАГИ

Д.Р. Масленникова, Ф.М. Шакирова

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

Дефицит влаги или засуха относится к одному из самых распространённых и критически значимых для растений неблагоприятных факторов окружающей среды, вызывающих резкое снижение качества и продуктивности многих сельскохозяйственных культур, включая пшеницу, которая является основной хлебной культурой нашей страны. Применение различных регуляторов роста с целью повышения устойчивости и урожайности пшеницы является актуальной задачей. Одним из кандидатов на роль регулятора роста растений, обладающим ярко выраженным антистрессовым эффектов претендует молекула оксида азота (NO), к которой интерес ученых, как физиологов растений и биохимиков не ослабевает уже более двух десятков лет. NO является внутриклеточной сигнальной молекулой, вовлекаемой в регуляцию основных физиологических процессов на всех этапах жизненного цикла растений, участвуя в регуляции прорастания семян, корнеобразования, гравитропизма, закрывания устьиц, цветения, созревания плодов, процессов старения [1]. Имеются сведения о способности NO повышать устойчивость растений к широкому спектру стрессовых воздействий биотической и абиотической природы [2, 3]. Защитный эффект доноров NO может быть основой для создания химических и биологических препаратов, повышающих устойчивость растений к дефициту влаги и другим абиотическим стрессорам.

Исследования физиологического и защитного влияния оксида азота на растительные объекты современны и по сей день, поскольку, несмотря на большой объем литературных данных о защитной роли оксида азота и механизмах действия N0 как сигнальной молекулы в растительных организмах остается еще много неясного. Для изучения механизмов действия оксида азота на растительные организмы применяют различные доноры NO, такие как диэтиламин – NONO, S-нитрозоглутатион, N – ацетилпенецилламин [1], в своих исследованиях мы использовали нитропруссид натрия – sodium nitroprusside (SNP). В ходе предыдущих исследований была подобрана концентрация SNP – 200 мкМ, которая оказывала ростстимулирующее и антистресовое действия на растения пшеницы, о которых судили по показателям роста и балансу фитогормонов проростков [4].

Цель работы – исследовать вклад неферментативных антиоксидантов клетки в формирование устойчивости в предобработанных и необработанных 200 мкМ SNP растениях пшеницы при действии 12 % ПЭГ, в связи с этим был проведен анализ содержания глутатиона восстановленного (GSH), аскорбата, МДА и состояния проницаемости клеточных мембран в этих проростках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили проростки пшеницы *Triticum aestivum L*. сорта Салават Юлаев. Семена стерилизовали 96 %-ным этанолом и проращивали на смоченной водопроводной водой фильтровальной бумаге при 21–23˚С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 320 мкмоль/($м^2$·с) ФАР. 3-суточные проростки изолировали от эндосперма, часть проростков инкубировали 24 ч на растворе 1.5 %-ной сахарозы, содержащем в смеси 200 мкМ SNP, другую часть – только на 1.5 %-ной сахарозе. Затем обработанные и необработанные SNP 4-суточные проростки подвергали воздействию 12 %-го полиэтиленгликоля (ПЭГ), моделирующего условия нарушения водного режима. Контролем во всех вариантах опытов служили проростки, инкубированные на дистиллированной воде. Содержание восстановленного глутатиона – GSH, определяли с помощью спектрофлуоромерического метода основанного на получении флуоресцирующего продукта о-фталевого альдегида, о проницаемости клеточных мембран проростков судили по уровню выхода электролитов с использованием кондуктометра ОК 102/1 (Radelkis, Венгрия), измеряя омическое сопротивление водных экстрактов в постоянном токе [4]. Содержание аскорбата анализировали методом титрования [5]. Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) судили по содержанию в проростках одного из конечных продуктов ПОЛ малонового диальдегида (МДА) применяя цветную реакцию с тиобарбитуровой кислотой [4].

На рисунках представлены данные средних арифметических трех–четырех независимых опытов, каждый из которых проведен в трех биологических повторах, и их стандартные ошибки. Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью дисперсионного анализа ANOVA, используя SPSS 13.0 для Windows (SPSS Inc., Chicago, IL USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ содержания GSH и аскорбата показал, что дефицит влаги приводит к значительному падению уровня этих важнейших восстановителей растительной клетки на протяжении всего времени воздействия (рис. 1). Это является вполне ожидаемым, поскольку 12 % ПЭГ вызывает развитие окислительного стресса, о чем также свидетельствуют данные представленные на рис. 2. Такие реакции растений на нарушение водного режима вполне закономерны, поскольку окислительный стресс, вызванный действием 12 % ПЭГ истощает пул аскорбата и глутатиона, а также приводит к значительному накоплению МДА и нарушению баланса электролитов в тканях растений (рис. 1, 2). Предобработка SNP практически предотвращала стресс – индуцированное истощение пула GSH (рис. 1б) и способствовала не только поддержанию, но и дополнительному накоплению аскорбата в них, которое наблюдается в первые часы воздействия стресса (рис. 1а). Это свидетельствует о том, что оксид азота способен регулировать содержание аскорбата и глутатиона в стрессовых условиях, что отражается в стабилизации антиоксидантной системы и роста растения в целом (данные не приведены). Хорошо известно, что глутатион является ключевой молекулой в регуляции протекания клеточного цикла – митоза [6], а аскорбиновая кислота – в период формирования и роста зародышевой корневой системы проростков ярового ячменя [7], что в целом определяет важную роль этих антиоксидантов в регуляции роста и развитии растений. Важным показателем физиологического состояния клетки является показатели целостности мембранных структур, воздействие стресса вызвало сильно выраженный повреждающий эффект о котором судили по существенному увеличению содержания МДА и выходу электролитов из тканей (рис. 2). Предобработка проростков SNP способствовала снижению негативного действия моделируемой ПЭГ засухи на целостность мембранных структур, на что указывают данные по уменьшению уровня стресс – индуцированного накопления МДА и экзоосмоса электролитов (рис. 2), это является еще одним аргументом в пользу применения оксида азота для повышения устойчивости пшеницы к дефициту влаги.

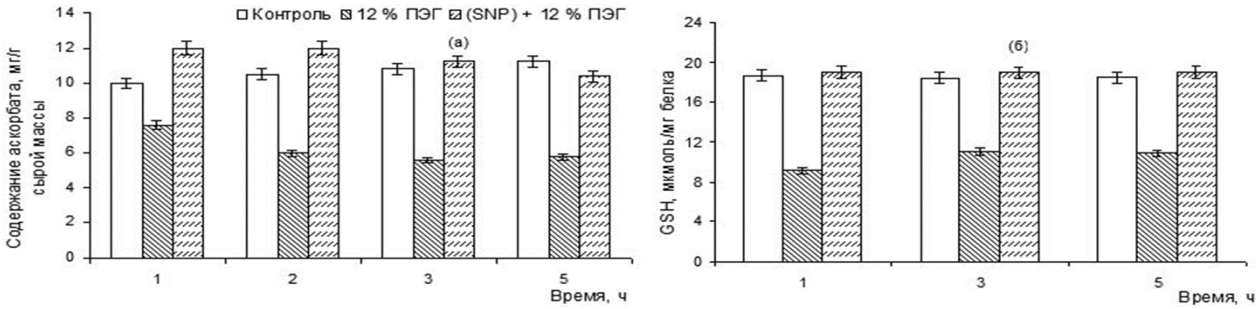


Рис. 1. Влияние 200 мкМ SNP на содержание аскорбата (а) и глутатиона (б) в корнях 4-х суточных растений пшеницы в ходе воздействия 12 % ПЭГ

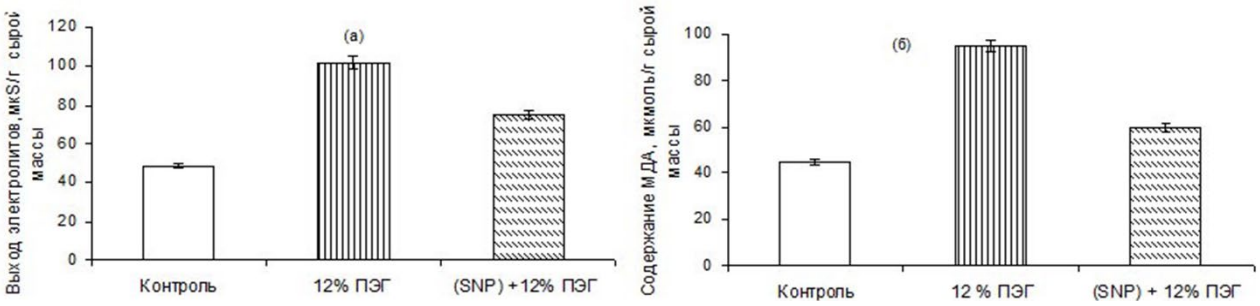


Рис. 2. Влияние 200 мкМ SNP на выход электролитов (а) и содержание МДА (б) в 4-х суточных проростках пшеницы подвергнутых 7 ч воздействию 12 % ПЭГ

Таким образом, важный вклад в формировании SNP-индуцированной устойчивости растений пшеницы к действию 12 % ПЭГ вносит его способность регулировать содержание глутатиона и аскорбата, что в целом приводит к стабилизации состояния мембранных структур клетки и нормализации роста растений. Полученные результаты указывают на защитный эффект 200 мкМ SNP на проростки пшеницы в условиях дефицита влаги, тем самым, расширяя спектр проявлений протекторного действия оксида азота в растениях.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (20–04–00904 а) частично в рамках госзадания (№ гос. регистрации АААА-А16–116020350029–1) с привлечением приборного парка ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

ЛИТЕРАТУРА

1. Мамаева А.С., Фоменков А.А., Носов А.В., Мошков И.Е., Мур Л.А. Холл М.А., Новикова Г.В. Регуляторная роль оксида азота у растений. Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 459–474. doi: 10.7868/S0015330315040132
2. Nabi R.B.C, Tayade R., Hussain A., Kulkarni K.P., Imran Q.M., B. – G. Mun, B-W Yun Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. Environmental and Experimental Botany. 2019. V.161. P. 120–133. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003
3. Ding Y., Gardiner D.M., Kazan K. Regulators of nitric oxide signaling triggered by host perception in a plant pathogen. PNAS. 2020. V. 117(20). P. 11147–11157. doi.org/10.1073/pnas.1918977117
4. Maslennikova D.R., Allagulova Ch. R., Fedorova K.A., Plotnikov A.A., Avalbaev A.M., Shakirova F. M Cytokinins contribute to realization of nitric oxide growth-stimulating and protective effects on wheat plants. Russian Journal of Plant Physiology. 2017. V. 64(5). P. 665–671. doi: 10.1134/S1021443717040094
5. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум / Калинингр. ун-т; Авт.-сост. Г.Н. Чупахина. – Калининград. 2000. 59 с.
6. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. Успехи биологической химии. 2014. Т. 54. С. 316–324.
7. Ковалева О.Н. Содержание аскорбиновой кислоты и глутатиона в прорастающих семенах различных сортов ярового ячменя: автореф. дис. канд. биол. наук. Краснодар. 2011. 25 с.

УДК 640

RHUS CORIARIA (SUMAC): FROM OF UNDERSTANDING THE BIOTECH POTENTIAL TO İTS INDUSTRIAL USES

Gharib Hafizov, Ilham Qurbanov, Samir Hafizov

Research institute of horticulture and tea industry of the Ministry of Agriculture, Guba, Azerbaijan

INTRODUCTION

Features of nutrition and health of modern man oblige to develop research to meet the needs of his food special composition, contribute to the expansion of the range of food products, cause the need to search for new types of biologically active raw materials.

From year to year, the production of new types of plant products, which not only do not contribute to the spread of alimentary, that is food and nutrition, diseases, but, on the contrary, are necessary for their prevention, becomes more and more urgent.

This forces many Azerbaijani companies to pursue a policy of development and use of local biologically active raw materials, which have not yet reached the hands of competitors, which are already few.

It is quite possible that the type of raw materials, which we are going to talk about further, is used only because of the lack of effective product and technological innovations that could bring profit and fame to the enterprises of the canning and other food industries, who mastered their processing first.

Sumac (Rhus coriaria L.) – this shrub is found in the mountain forests of the North Caucasus and Transcaucasia, as well as in the mountainous part of the Crimea. In the Republic of Azerbaijan it can be found in the mountain forests of Lenkaran, Geokchay, Sheki-Zakatala and Guba districts.

This plant is from the family Anacardiaceae – shrub height of 2–7 m. (see photos near the village of Gedik in the Guba districts of the Republic of Azerbaijan – Figure 1). Within Azerbaijan, sumac is distinguished polymorphism. Flowers are heterogeneous, small, greenish – white. The fetus (reaching 5–6 mm in diameter) is a small globular or kidney-shaped single-seeded drupe outside is red-brown, densely pubescent with glandular hairs.

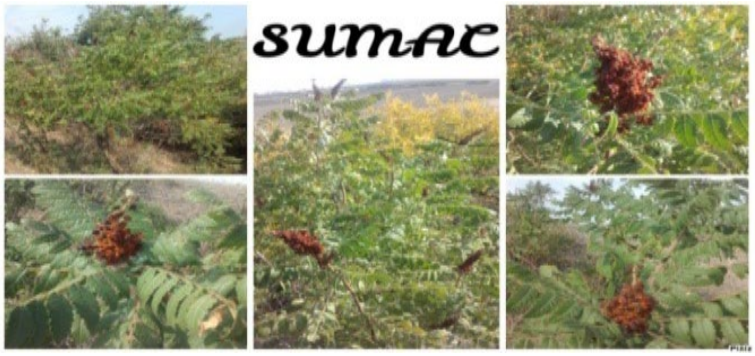


Figure **1**. View of Rhus coriaria L. (Guba districts, Azerbaijan)

The fruits of this plant ripen in September and October.

For the sour taste of fruits and leaves, sumac often called an "acetic tree". Sumac is widely used in Turkey, the Caucasus, as well as in North Africa, the Middle East and South Asia.

In the pharmaceutical industry, from the leaves and fruits of sumac receive not only tannin, but and medicament, such as Tanalbin and Tanzal.

Studied the physic – chemical indices of tannin sumac from the Konya region of Turkey and found that 92 % of them in their total mass were 4.25 to 5.0 mm in length, 88 % of the width from 3.50 to 4.50 mm, 90 % – with a thickness of 2.30 to 3.0 mm. The measurements showed that their diameter averaged 3.64 ± 0.023 mm, a volume of 19.49 ± 0.442 mm^3, a weight of 0.018 ± 0.001 grams. In the total mass of fruits 10.6 ± 1.1 % is water, 7.4 ± 1.6 % – fat, 63.8 ± 4.2 % – water-soluble extract. The mass fraction of crude protein was 2.6 ± 0.2 5 %, crude fiber – 14.6 ± 0.4 %, ash – 1.8 ± 0.4 %, organic acids – 4.6 ± 0.2 %. Among the mineral substances prevail potassium (7963.5 ± 47.85 mg / kg), calcium (3661, 57 ± 25, 71 mg / kg) and phosphorus (1238.74 ± 37.82 mg / kg). Behind them go other ash elements (mg/kg): magnesium (855,95 ± 17,63); iron (144,53 ± 3,76); aluminum (125,47 ± 11,04); sodium (114,06 ± 3, 65); boron (25,72 ± 1,86); zinc (10,93 ± 0,84); manganese (10,49 ± 1,32); vanadium (6, 43 ± 0,67); copper (3,73 ± 0,14); lithium (1,40 ± 0,13); nickel (1,07 ± 0,03); chrome (1,03 ± 0,07); barium (0,52 ± 0,12); lead (0,52 ± 0,03); selenium (0,47 ± 0,02) and cadmium (0,03 ± 0,01) [14].

According to dietary norms, the need for an adult in copper, iron and zinc is 3, 18 and 15 mg per day, respectively, and they appear to be present in rather large quantities in sumac fruit. Barium, bromine, cadmium, lead and lithium, which participate in biological processes are no less active, are present in the sumac in relatively small amounts, although the relatively low content of cadmium and lead is rather the value of sumac fruit than their disadvantage.

Of the leaves, flowers and fruits of the tan sum of tannins, myrycitrin (C_{21} H_{20} O_{12} × 1.5 H2O) was isolated. The various organs of this plant can be used as a source of mirycetin (C_{15} H_{10} O_8), given its value as a hepatoprotector. Mirycetin in the experiment shows high protective activity in the formation of experimental dystrophies of the stomach on the model of reserpinization and immobilization of mice. In addition, mirycetin and quercetin inhibit lipid peroxidation processes catalyzed by cytochrome C [13].

İt was found that the phenolic complex of sumac fruits includes quercetin derivative, myricetin 3-rhamnoside, quercetin 3-glucoside, and its basis is Gallic acid and its derivatives (pentagalloyl-glucoside, hexagalloyl-glucoside, heptagalloyl-glucoside, octagalloyl-glucoside, nonagalloyl-glucoside, decagalloyl-glucoside) [17].

Rhus coriaria L. – the only kind used directly in food as a spice. A known method of obtaining beverages from the fruits of another member of the family Anacardiaceae – Rhus thiphina L. [7] widely in practice did not enter and remained in the past.

Almost never sold in Azerbaijan in the form of whole fruits-usually a ready-made coarse powder beautiful purple-red or purple-pink color (Figure 2). It tastes sour, tart, a little astringent. Its main exporters are Iran and Syria.

In our homeland, this powder is used as a seasoning for dishes such as lula – kebab (from the Persian کباب – kabâb – "fried meat"), kuku and kutab – cakes stuffed with fresh herbs, sometimes minced lamb or giblets (Figure 3).



Figure 2. Dried and crushed fruits of sumac



Figure 3. Azerbaijani dishes which are well combined with sumac: A -"kuku" and “kutab with fresh herbs”; B – "lyulya – kebab in pita bread"

From unripe fruits sumac get marinade, which used as an acute seasoning for meat and fish dishes and for obtaining medicinal extracts and infusions.

The fruits of sumac in dried form are used as one of the components of a mixture called "zatar" – an Arab snack and at the same time a mixture of fragrant and very useful spices, which in the East (Syria, Lebanon, Palestine) is used as a breakfast or a snack, and also for the preparation of many dishes. Syria is preparing the zatar with the following composition: thyme, sesame seeds, marjoram, dill, cumin, anise, coriander, sumac, hyssop, citric acid, salt. There are two types of zatar – red and green. The difference in the percentage of sumac (in red it is more) and in the degree of grinding.

There is growing interest in using this important seasoning in medicine and the food industry as a natural preservative [2]. Its aqueous extract exerts strong antibacterial effects (Aliakbarlu et al., 2013; Kossah et al., 2013) and antifungal action [15].

In addition, this plant is traditionally are used in the treatment of diabetes mellitus (Muhammad et al., [12]), stroke and cancer [19], gastrointestinal tract ailments [3], arterial hypertension [16]. It is recommended are used it at high temperatures [5]. Consumption of sumac can provide protection against atherosclerosis [18]. İndicate, that the antioxidant effect of sumac is 50 times stronger than that of vitamins C and E [6].

Even the naked eye can see that the fruits of sumac are rich in coloring substances – anthocyanins, which, incidentally, are characterized by high antioxidant and P-vitamin activity and are effective for preventing cancer of the esophagus and colon cancer.

Anthocyanins usually give different organs of plants a purple, blue, brown, red, orange color. This coloration often depends on the pH of the cell content, and therefore can change with increasing flowering and ripening. They are secondary metabolites. They are allowed to be used as food additives (E-163i) belonging to the group of water-soluble natural food colors.

The main disadvantage of anthocyanin dyes is a change in color with a change in the pH of the medium.

Other disadvantages of these dyes are the low content of dyes, low resistance to storage in their pure form, and in products in which it is used. At the same time, the raw material for anthocyanin dyes are most often berries or berry squeeze, that is seasonal, rapidly perishable raw materials, which makes the process of producing dyes multi-stage and complex in technical terms and expensive in financial terms.

All this prompted us to conduct a study aimed at obtaining a natural anthocyanin dye from sumac fruits, which has a high thermal and photo stability, the production of which can be carried out in any required amount, regardless of the time of year, seasonality and any other factors.

MATERIALS AND METHODS

We were not able to get into an environment of relevant information of scientific and inventive nature, which highly satisfies our plan about getting a liquid red dye from the fruit of the poison tree.

Therefore, the Foundation took the methodology followed in their work [11] during the tests, aimed at obtaining extracts from the fruit of the poison tree for therapeutic purposes.

The basis of this methodology is the testing of the boundaries of each experience different solvents and process parameters and selection of the best one the basis of the evaluation criteria, the main of which is the degree of extraction of phenols from dried and ground fruit of the sumac. It allows you to use the existing possibilities for the intensification of diffusion processes occurring at the interfacial contact components of the system "solid-liquid". Among the parameters studied, the most important influence on the degree of extraction was the concentration of ethyl alcohol in water and the duration of extraction. The work has been tested: absolute ethanol and its aqueous solutions of various concentrations; extraction time in the range of 1 – 9 hours; the temperature of extraction is in the range of 20– 60 °C; degree of grinding fruit sumac in the range of 0.5 – 2.5 mm; different ratio between the solvent and powdered sumac from 5:1 to 25:1.

They found that preferred is a variant in which solvent was used water ethanol solution of concentration 20 g/100 cm^3, dried sumac was milled to particles with an average size of 1 mm, the mass ratio between the solvent and the raw material was 15:1, temperature – 40 °C, the extraction time is 1 hour. The content of phenolic compounds in the extract obtained according to this variant was the highest and amounted to 159.32 mg/g for GAE.

One of the tested by these authors variants – extraction with aqueous ethanol concentration of 80 g/100 cm^3 – had nothing to do with the technologies we develop are and were considered by us as the method-analogue. The other – extraction with aqueous ethyl alcohol of concentration 20 g/100 cm^3 – was considered by us as the closest in nature to our idea of the prototype method.

We considered that the main drawback of the prototype method is associated with an unsuccessfully selected solvent. In this known method, they were forced to go from strong ethanol solutions down to weak ones in search of the optimal solvent. At the same time, the question of the possibility of complete rejection of ethanol in favor of water remained open.

Given this, we had to finalize the question of the optimal solvent, as well as to determine the direction of further processing of the separated extracts, which would ensure the receipt of the target product with a characteristic texture for the type of product chosen by us. To achieve this task had to be solved basic questions such as:

– Selection of the best solvent (both in terms of its safety and cheapness, and taking into account the achieved degree of extraction of phenolic compounds from this particular type of raw material);

– İdentification of the optimal parameters of the extraction process with the participation of the selected solvent;

– Evaluation of the quality of the target product based on the study of its coloring ability and other consumer characteristics.

The fruit of the sumac tree was collected in the mountainous part of the Guba district in the mountain forest near the village of Gedik in late September. In this time they until still contain water a bit more (13–15 wt. %), than it is required for the fruits, which are ground here to obtain the seasoning, which we have already mentioned. It is possible to collect sumac fruits almost dry in October, but by this time they fall under the rain several times.

The next day they were dried and ground into a fine powder and stored at a temperature of 5 ℃ before use.

Technological experiments and chemical analyses were carried out in the laboratory of Processing and storage technologies of the Ministry of agriculture of the Republic of Azerbaijan.

To dry mature sumac fruits, a laboratory drying Cabinet with forced ventilation and an inspection window of the SH-DO-149 FG series (South Korea) was used.

Grinding of dried sumac fruits was carried out using a laboratory mill Tube Mill control (Germany) with batch loading.

Extraction of the crushed product was conducted by percolation method.

Soluble extract was recovered two static methods: one-stage (maceration, percolation) and multistage (re-maceration) at different temperatures from room temperature to 80 ℃.

Obtaining the extract by maceration was as follows.

Sumac fruits of a certain grinding were loaded into a macerator (glass container or enameled metal inside container), filled with a calculated amount of solvent and kept for the required amount of time. The resulting extract was then separated.

The process of re-maceration is characterized in that the solvent used not at once, but divided into several parts. The rest of the raw material after the first infusion is poured with the next portion of the solvent. Often used bi-maceration, that is, the solvent is divided into two parts.

The primary extracts were evaporation using a rotary evaporator Lab Protovar 2 l (China).

In the section "Formulation of the tasks" we have already touched upon the question of solvent selection and outlined the objectives of extraction. And we have already decided that we will use only weak solutions of ethyl alcohol and water as a solvent.

Therefore, the main attention was paid to the factors affecting the extraction process, such as the ratio of raw material / solvent, the duration of the process, the temperature, which varied at 3–5 levels.

As the output option was used the concentration of pigments in the extract (in units of optical density).

Sampling for chemical analyses was conducted in accordance with the GOST (State standard of the Russian Federation) 26313. The samples were prepared in accordance with the GOST 26671.

In dried and powdered fruits and products of their processing were determined:

– Dry substances – thermally-gravimetric method, which consists in drying the loosened sample of the product at high temperature and atmospheric pressure, according to GOST 28561–90;

– Monosaccharaides and sucrose – according to the Bertrand method, which is embedded in the basis of GOST 8756.134;

– Total acidity – titration with sodium hydroxide solution in the presence of phenolphthalein indicator, according to the Interstate (AM, BY, KZ, KG, MD, RU, UZ) standard ISO 750–2013;

– Vitamin C – iodine metric method, by the GOST 28556;

– The pH – potentiometric method according to the GOST 26188–84.

– The total amount of water-soluble phenols- – titration of their solutions 0.1 n. potassium permanganate solution by Leventhal. This method of their quantitative determination is based on the oxidation of phenols in an acidic medium with potassium permanganate. But this reagent is oxidized and some other substances. Therefore, all substances capable of reacting with $KMnO_4$ are first oxidized, then the phenols are separated, taking advantage of their property to be adsorbed by animal or charcoal, and oxidation is again carried out. According to the difference in the amount of potassium permanganate, which went to oxidation for the first and second time, the content of phenols is determined using 0.004157 as a conversion factor of 0.1 N milliliters of $KMnO_4$ solution per grams of phenols. This principle is embedded in the basis of the method for determining tannins in medicinal raw materials according to GOST 24027.2–80 and the corresponding article of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, which is also devoted to the definition of these substances in medicinal raw materials.

All analytical definitions are performed in 3-fold repetition. The data is statistically processed using Excel. The mean square error of the mean did not exceed 1.5–2.0 %.

Antioxidant activity of biologically active substances of extracts was determined by the indicator of total content of antioxidants (in terms of Gallic acid) by amperometric method on the device «ЦветЯуза 01-АА – TsvetYauza 01-AA, Russia» [19].

RESULTS AND DISCUSSION

The efficiency of the extraction process depends on the main technological factors: the temperature and time of extraction, the degree of grinding of raw materials, the type of solvent, hydromodule (the ratio between the raw material and the solvent), etc. for each type of plant raw materials are characterized by rational parameters, modes, conditions established experimentally.

Therefore, at the first stage of work it was necessary to optimize the process of extracting biologically active substances from sumac fruits; the method of bi-maceration was used. To select the optimal solvent, experiments were conducted, which showed that the best solvent for sumac fruits is an aqueous solution of citric acid concentration of 0.3 g/cm^3. Citric acid greatly intensifies the output of the coloring components of the raw material in the extract.

The selected solvent has another important property. It lies in the fact that an aqueous solution of citric acid absolutely does not extract fat – like substances (and there are a lot of them in sumac fruits-up to 17 % of their dry weight), because of which the transparency of primary extracts can be violated (which we saw, for example, in experiments using strong solutions of ethyl alcohol as a solvent).

The use as a solvent of an aqueous solution of citric acid with a concentration higher than 0.3 g/100 cm^3, almost does not affect the degree of extraction of tannins and dyes, leads to an unjustified increase in the consumption of citric acid and the rise in the cost of the method as a whole, and therefore it is impractical.

It was found that it is better to conduct extraction in two stages with the separation of the extract from the first stage and the addition of a new portion of the solvent before the second stage of extraction. The method of bismaceration was effective in the sense that it allows to significantly increase the degree of extraction of soluble components of raw materials, that is, to reduce their losses.

Based on a series of experiments, a graphical interpretation of the dependence of the mass fraction of solids (%) in extracts on two variables was obtained: temperature and extraction time was obtained (figures 4 and 5).

$$F(x,y) = -3.0495 + 3.0640x + 0.1576y - 0.3212x^2 - 0.00004xy - 0.0011y^2 \quad (1)$$

$$F(x,y) = -11.4332 + 2.6321x + 0.4752y - 0.2876x^2 + 0.0020xy - 0.0040y^2 \quad (2)$$

Mathematical models of extraction of sumac fruits are expressed in the form of polynomial equations of the second degree, where F (x, y) is a function of the content of soluble solids, %; x is the duration of extraction, hour; y is the temperature of the solvent, ºC. The absolute error for mathematical models ranged from 2.2 to 4.2 %.

According to the results of the experiments, the optimal modes of obtaining red food dye from sumac fruits were obtained: extraction time of 1 hour (30 minutes in each stage); temperature of 75–80º C; the degree of grinding of raw materials 3.0–4.0 mm; hydromodule (raw materials/solvent) in the first and second stages of bilaterali 1:8 and 1:4 respectively.

The specified ratio between the raw material and the solvent is chosen so that, on the one hand, it is possible to extract from the raw material as many components of a hydrophilic nature as possible, and on the other – there would be no strong dilution of the extracts, which after separation are evaporated under vacuum. This is also due to the need to create an environment with a pH of 3.2–3.5. In a less acidic or neutral environment, diffusion processes occur at a much lower rate.

Experiments have shown that the content of components that can be extracted with water in dried sumac fruits is at a level close to 38 wt. % and grinding and processing of this specific type of raw materials in the conditions selected by us provides 90–92 % degree of their extraction. At the same time, we have not identified any reasons that would not be in favor of our chosen parameters. While changing these modes led to undesirable consequences such as a strong dilution of extracts, reduction of the extraction coefficient, etc.

The technology provides for the drying of sumac fruits by convective method to a residual water content of 10–8 wt. %. For drying sumac fruits selected temperature 60–55 °C at which the raw material is quickly dehydrated. Experiments have shown that drying this raw material at higher temperatures activates the process of degradation of anthocyanins. Drying sumac fruits at a temperature below 55 °C is also undesirable, as it increases the drying time, and this is bad for the time of the overall production cycle.

Also, the efficiency of extraction largely depends on the degree of destruction of the cell structure of the object under study. For this purpose, grinding of the product was used.

The characteristic range of grinding of raw materials with residual moisture 10–8 wt. % the percentage with the help of disintegrator was also determined empirically and is 3–4 mm for sumac fruits. At the same time, when the particle sizes are more than 5 mm, the rate of diffusion processes is noticeably reduced.

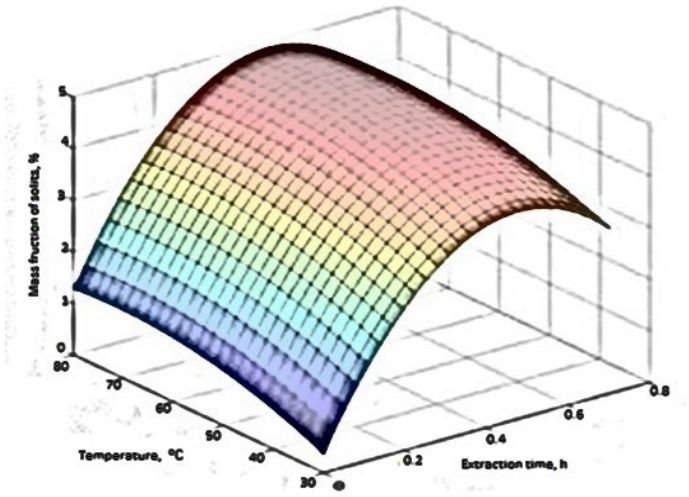


Figure 4. The dependence of the mass fraction of solids in the extract on two variables: temperature and extraction time (the first stage of extraction)

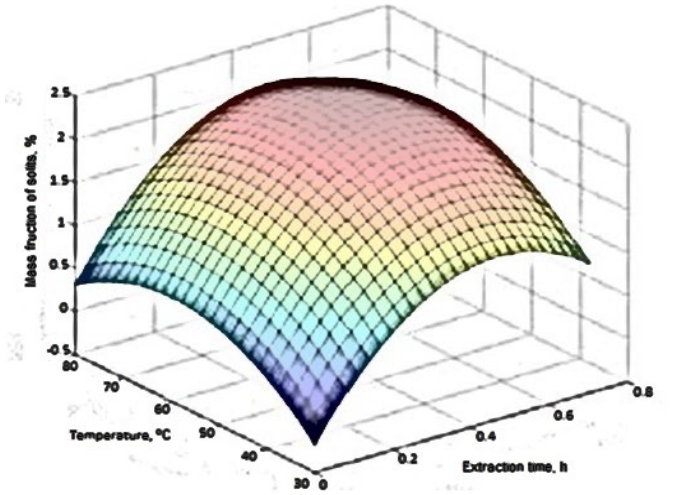


Figure 5. The dependence of the mass fraction of solids in the extract on two variables: temperature and extraction time (the second stage of extraction)

In extracts from the first and second stages of bi-maceration at the end of the time allotted for their conduct, the concentration of dry substances, depending on the used batch of raw materials, is set at 4±0.1 wt. % and 2±0.3 wt. %, respectively. After the extraction is completed, the extracts are separated, filtered, and then concentrated by evaporation. Experiments have shown that their evaporation to the desired consistency should be carried out under vacuum at a temperature of 50–60° C and a vacuum of 80–87 kPa (600–650 mm Hg). This gentle mode allows you to better preserve anthocyanins. The resulting liquid concentrate is pasteurized at a temperature of 65 °C for 5 minutes, followed by cooling to a temperature of 25 °C.

In factory conditions extraction can be carried out in usual devices of vertical type with heating and the filtering bottom to which the drain crane is attached. It is important that the separation of the formed extracts occurs quickly. To speed up filtration, vacuum filtration (suction with a water jet pump) can be used – a method of filtering liquids, in which the difference between the atmospheric pressure outside the filtrate receiver and artificially reduced pressure inside it is used to move the filtered liquid through the filter element.

Evaporation of primary extracts to a dry matter content of 30, 35, 40 or 60 wt. % and compare these four products based on characteristics such as color strength and viscosity, showed that the duration of this process depends on how the concentrate is fluid and how easy it will be to work with him in the future. The relatively long evaporation was bad for its fluidity. Beyond a certain point, it also began to provoke processes ending in the degradation of labile components of the extract, such as anthocyanins. Tests have shown that the loss of part of the anthocyanins are inevitable and prevent them completely is almost impossible. To reduce their losses, it is necessary to adjust the process time so that it ends relatively quickly, even before the moment when the mass fraction of dry substances in the concentrate begins to exceed the mark of 33 wt. %. Therefore, this gentle treatment mode was chosen, which allowed to obtain the target product with a dry matter content of 30 ± 1 wt. %.

Table. The chemical composition of the feedstock and the target products obtained in two ways

The dye	Chemical composition, g/100 g						Total antioxidant content, mg / dm^3
	Dry substan – ces	Mono – saccha raides	Saccharose	Total acidity (by citric acid)	Water-soluble phenolic compounds	Ascorbic acid (mg/100 g)	
Dried and shredded fruits sumac (Guba, Azerbaijan)	92.0±2,00	11.44±0.24	0.58±0.01	4.44±0.10	12.31±0.27	5.86±0.13	-
In the method-analogue	31.0±1.00	9.23±0.14	1.03±0.03	3.81±0.16	6.80±0.15	4.96±0,16	3013,2±80,7
Of the proposed method	31.0±1.00	7.84±0.23	0.05±0,001	4.78±0.15	8.19±0.26	4.20±0.14	4031,7±97,6
Data are means of three determinations ±SD. Means with different superscripts within the same row are significantly different (p<0.05)							

The target product is bottled in glass bottles. This is a necessary condition, since anthocyanins in glass containers are stored better, than in metal lacquered jars. This is due to the fact that during long-term storage of the concentrate in the lacquered coating, micro-cracks are formed, through which anthocyanins come into contact with the metal. This opens the way to the formation of chelate complexes of dark blue color.

Bottles with dye pasteurized to increase its biological resistance.

The table presents data on the chemical composition of dried and crushed sumac fruits and two food dyes, one of which is obtained by the method proposed by us (using as a solvent an aqueous solution of citric acid with a concentration of 0.3 g / 100 cm^3), and the other-by the method-analogue under exactly the same conditions, but using as a solvent an aqueous solution of ethyl alcohol with a concentration of 20 g / 100 cm^3. From it can be seen that in the dye obtained by the method-analogue, the content of tannins and dyes (water-soluble polyphenols) is 6.80±0.15 g/100 grams and this is much lower than that of the dye obtained by our method (8.1±0.26 g/100 g).

It is also seen that the dye obtained by the method–analogue contains a little more vitamin C than the dye obtained by our method. This is due to the fact that the alcohol from the extracts evaporates faster and with less harsh heat treatment than water, which led to a somewhat greater loss of vitamin C in our method, designed to work with an aqueous extract. But this insignificant difference can not affect the biological value of the dye, the main advantage of which, based on its purpose, is an extremely low content of antioxidants phenolic acid. This is evidenced by the large difference between these two dyes in the total content of antioxidants. As you can see, the dye obtained by the technology developed by us, with such a high percentage of antioxidants that it can be used as an additive to the substances of Botanical therapy.

Using the data table, you can see that a total dry mass of the dye obtained by the chosen solvent on phenolic compounds, many of which have high antioxidant activity, it is necessary 27.33 wt. %. Almost the same part falls on monosaccharides (26.13 wt. %). The proportion of organic acids in the dry matter of the dye is 15.93 wt. %.

The dye is a transparent thick liquid of dark red color, completely soluble in water and aqueous solutions of ethyl alcohol, with an odor peculiar to the smell of raw materials, sour taste. The dye is an extract isolated from anthocyanin-containing plant material with a total antioxidant content of 4031.7±107.6 mg / dm^3. It can be used for coloring in red-pink tones of different intensities of sweet-sour (pH = 6 – 4) and sweet – sour (pH 4 or below) drinks at a concentration of 700 – 1000 ppm (0.7–1 g / l).

According to the literature [1, 9], aqueous extracts of sumac fruit contain of delphinidin (delphinidin 3–glucosid) and some cyanidin glycosides (cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3 (2˝ galloyl) galactoside, 7-methyl-cyanidin 3 galactoside and 7-methyl-cyanidin 3 (2˝ galloyl) galactoside), organic matter and mineral salts.

As you know, cyanidin glycosides in alkaline medium has a blue color, and acidic-red. Delphinidin has a bluish cyanidin and blue color, and red color is only in methylation. The combination of these anthocyanins in the developed dyes makes it possible to obtain a dye with a rich gamut of shades of red.

At the same time, the predominance of the most persistent forms of anthocyanins – cyanidin glycosides allows to obtain a dye with a number of physically valuable properties, namely, the claimed dye retains a red color at a pH of no more than 7, is heat-resistant and retains its properties for two years, while its relative optical density is maximum when exposed to light with a wavelength of 505–515 nm.

The developed dye is an extract of plant raw materials, contains biologically active compounds extracted from the raw material. The presence of such a large number of biologically active compounds increases the quality of the claimed dye. The highest concentration of biologically active substances allows its use in the technology of functional drinks.

The output of the dye with a dry matter content of 30 wt. % (specific gravity 1.3–1.14) is high and is 116 kg per 100 kg of dried sumac fruits. Speaking of this, it should also be noted that in Azerbaijan the market price of 1 kg of ground sumac is not higher than $ 7–8. For this money now you will not buy and 200 ml of natural dye. And in the proposed method, the yield of the dye from 1 kg of raw materials is more than 1 kg.

This relatively high yield of the target product will give the opportunity to maneuver its selling price and facilitate competition for a place in the market of food additives. This suggests that the proposed technology is very promising in terms of the available opportunities for its commercialization. It should also be borne in mind that the modern stage is characterized by an ever-increasing demand for natural products, which is associated with the deterioration of the environmental situation

CONCLUSION

Thus, as a result of our research, we have developed a technology for processing sumac fruits, including drying, grinding and extraction, followed by separation of the resulting extracts and their concentration to obtain anthocyanin dye.

SIGNIFICANCE STATEMENT

This is one of the rare works that aims to prepare the technological base for large-scale processing of sumac fruits-the most valuable biologically active raw materials, which, as we believe, should deserve more attention from product and technological innovation managers than is currently the case.

Today, the need for the fruits of this shrub is satisfied, mainly due to their natural reserves, since sumac is used very limited, only as a seasoning for meat dishes and as part of health mixtures for Breakfast. We have calculated that this is the relatively low demand for sumac fruits and is the main reason that in Azerbaijan and most other places of its habitat this plant is among the plants with unclear prospects for cultivation. The situation, frankly, is not the best for a plant with such a high biotechnological potential.

It is time to think about other ways to use them, given its high biotechnological potential.

Our proposed extraction technology is one of the rare examples of how sumac fruits can be obtained and other valuable products. Its development required the solution of inventive problems [8].

The extraction technology was not chosen by chance. A good reason for this choice was the fact that water-soluble phenolic compounds on the one hand and all other combined soluble components of the chemical composition on the other, are presented in dried sumac fruits in a rare ratio for vegetable raw materials equal to 0.75/1, which characterizes them as a natural storehouse of antioxidants of phenolic nature.

It is with this that the expected result of the developed and proposed extraction technology can be associated. It makes it possible to obtain from this rich raw material a red food dye, in the total mass of dry matter of which 26.43 % are phenolic compounds, including anthocyanins, which are natural antioxidants. This is so much that it allows the target product to be used as a red dye at a concentration of 700–1000 ppm (0.7–1 g / l) and in functional beverage technology.

The dye is not fat-soluble, and hydrophilic, which in the world now is not so much.

In favor of the considered innovation, the fact that now in the food industry, as a rule, synthetic dyes are used, which harms the health of consumers. Therefore, consumers prefer products colored with plant pigments, which is due to the deteriorating environmental situation.

The implementation of this new technology can increase the demand for this raw material, and this, in turn, will contribute to the withdrawal of the sumac plant from the list of plants with unclear prospects for cultivation, as is still happening, for example, in Azerbaijan.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author acknowledges the efforts of the research teams and technical staff who read the manuscript and prepared the reagents in the course of this study.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors of this study have any financial interest or conflict with industries or parties.

REFERENCES

[1] Abu-Reidah, I.M., Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M. et al. *HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from Rhus coriaria L. (sumac) fruits*. Food Chem., 2015, 166, 179–191.
[2] Abu – Reidah, I.M., Jamous, R.M. and Ali-Shtayeh, M.S. Phytochemistry, pharmacological properties and industrialapplications of Rhus coriaria L. (Sumac). Jordan Journal of Biological Sciences (JJBS), 2014, 7(4), 233 – 244. https://doi.org/10.1128/AEM.00054–15
[3] Ahmad, H., Ahmad, F., Hasan, I. and Ahmad, S. *Unani description of Sumaq (Rhus coriaria Linn.) and its scientific report.* Global Journal of Medical Research (GJMR), 2013, 13, 74–78.
[4] Aliakbarlu, J.S., Mohammadi, S. and Khalili, S. A Study on antioxidant potency and antibacterial activity of water extracts of some spices widely consumed in Iranian diet. J. Food Biochem, 2013, 38, 159–166.
[5] Ali-Shtayeh, M.S., Al-Assali, A.A. and Jamous, R.M. *Antimicrobial activity of Palestinian medicinal plants against acne-inducing bacteria.* African J Microbiol Res., 2013, 7, 2560–2573.
[6] Ferk, F., Chakraborty, A., Simic, T., Kundi, M. and Knasmüller S. Antioxidant and free radical scavenging activities of Sumac (Rhus coriaria) and identification of gallic acid as its active principle. BMC Pharmacology and Toxicology, 2007, 7(2): A71. https://doi. org/ 10.1186/1471–2210–7-S2-A71.
[7] Gatchenko, E.V, Kobets, L.G. et al. *Method of obtaining a non-alcoholic drink "Oromgoh"*. Patent SU No. 1747007, 1992, Bulletin No. 26 (in Russian).
[8] Hafizov, Gh. K., Kurbanov, I.S., Abubekirov, G. Sh., Hafizov, S.G. and Suleymanova, S.J. *Method of obtaining red food coloring from plant raw materials*, Patent RU No. 2627851, 2017, Bul. No. 23 (In Russian).
[9] Kirby, C.W.; Wu, T.; Tsao, R.; McCallum, J.L. Isolation and structural characterization of unusual pyranoanthocyanins and related anthocyanins from Staghorn sumac (Rhus typhina L.) via UPLC-ESI-MS, III, 13C, and 2D NMR spectroscopy. Phytochemistry, 2013, 94, 284–293.
[10] Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H. and Chen, W. *Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of Syrian Sumac fruit extract*. J. Natural Products, 2013, 6, 96–102.
[11] Kossah R., Nsabimana C., Zhang H. and Chen W. Optimization of extraction of polyphenols from Surian sumac (rhus coriaria L.) and Chinese Sumac (Rhus typhina L.) fruits. Res. J. Phytochemistry, 2010, 4 (3), 146 – 153.
[12] Mohammad, S., Montasser Kouhsari, S. and Monavar Feshani, A. *Antidiabetic properties of the ethanolic extract of Rhus coriaria fruits in rats.* DARU J Pharm Sci., 2010, 18(4), 270–275.
[13] Movsumov, I.S., Garaev, E.A. The study of chemical components of some plants from the flora of Azerbaijan in order to obtain biologically active substances, Chemistry of plant raw materials, 2010, 3, 5–10 (In Russian).
[14] Özcan, M., Haciseferogullari, H. *A condiment [Sumac (Rhus coriaria L.) fruits]: some physico-chemical properties*. Bulg. J. Plant Physiol., 30 (3 – 4), 2004, 74 – 83.
[15] Panico, A., Cardile, V., Santagati, N.A. and Messina, R. *Antioxidant and protective effects of sumac leaves on chondrocytes*. J. Medicinal Plants Res., 2009, 3, 855–861.
[16] Polat, R., Cakilcioglu, U and Satıl F. *Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl – Turkey).* J. Ethnopharmacol., 2013, 148, 951–963.
[17] Romeo, F.V., Ballistreri, G., Fabroni, S. et al. *Chemical Characterization of different sumac and pomegranate extracts Effective against botrytis cinerea rots.* Molecules, 2015, 7, 11941–58. **Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки.**.
[18] Shafiei, M., Nobakht, M. and Moazzam, A.A. Lipid-lowering effect of Rhus coriaria L. (Sumac) fruit extract in hypercholesterolemic rats. Pharmazie, 2011, 66, 988–992.
[19] Yashin, Ya. I, Ryzhnev, V. Yu, Yashin, A. Ya, Chernousova, N.I. *Natural antioxidants. Content in foods and their impact on human health and agingş*. TransLit, Moscow, 2009 (in Russian).
[20] Zargaran, A., Zarshenas, M.M., Karimi, A., Yarmohammadi, H. and Borhani-Haghighi, A. Management of stroke as described by Ibn Sina (Avicenna) in the Canon of Medicine. Int. J Cardio l., 2013, 169, 233–237.

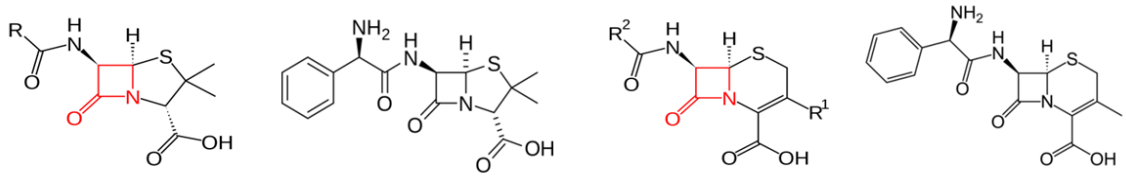
УДК 577.18+57.083.3

КОНСТРУКЦИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ КОНКУРЕНТНОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНАЛИЗА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВИ

Т.С. Серченя, И.В. Горбачева, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Бета-лактамные антибиотики являются давно известными, важными и наиболее широко применяемыми средствами антибактериальной химиотерапии для лечения инфекционных заболеваний в медицине и ветеринарии и стимуляции роста сельскохозяйственных животных и аквакультур. Этот класс антибиотиков включает, в частности, пенициллины и цефалоспорины, которые представляют собой гетероциклические соединения, имеющие четырехчленное бета-лактамное кольцо в своей структуре (рисунок 1). Механизм их антибактериального действия заключается в нарушении биосинтеза клеточной стенки микроорганизмов. Молекулярной мишенью этих антибиотиков является пенициллинсвязывающий белок (ПСБ), который является транспептидазой и катализирует сшивание пептидогликана клеточной стенки бактерий. ПСБ узнает бета-лактамное кольцо антибиотиков и химически взаимодействует с ним, что приводит к необратимому связыванию лиганда и подавлению функции этого бактериального фермента.



Пенициллины *Ампициллин* *Цефалоспорины* *Цефалексин*

Рисунок 1 – Структурные формулы бета-лактамных антибиотиков

Неконтролируемое и избыточное использование пенициллинов и цефалоспоринов может приводить к появлению их остатков в пищевой продукции животного происхождения, что оказывает неблагоприятное влияние на здоровье человека, может вызывать аллергические и канцерогенные реакции, угнетение микрофлоры кишечника, дисбактериоз, а также способствует формированию микробной резистентности к этим лекарствам [1]. С целью обеспечения биобезопасности и минимизации рисков для здоровья человека во многих странах введена система контроля остаточных количеств бета-лактамных антибиотиков в продуктах питания и установлены максимально допустимые уровни (МДУ) их содержания. В странах Таможенного союза и Евросоюза концентрации бета-лактамов регулируется Техническим регламентом ТС «О безопасности пищевой продукции» [2] и директивой ЕС № 37/2010 [3]. В этих документах установлены МДУ для остатков бета-лактамов в молоке на уровне 4 мкг/кг для пенициллинов (пенициллин G, ампициллин, амоксициллин) и 50–100 мкг/кг для цефалоспоринов (цефоперазон, цефапирина, цефалексин и цефтиофур).

Для обнаружения и количественного определения бета-лактамных антибиотиков в продуктах питания и биологических жидкостях используются различные методы [4], включающие микробиологические, инструментальные и биохимические тесты. Микробиологические методики являются длительными в исполнении и недостаточно специфичными. Инструментальные методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, жидкостная хроматография и масс-спектрометрия, обладают высокой чувствительностью и точностью. Однако их выполнение сопряжено с наличием дорогостоящего оборудования, работой высококвалифицированного персонала, сложной пробоподготовкой и невозможностью тестирования большого количества проб. Биохимические тесты, включающие иммунохимический и рецепторный анализ, являются эффективными скрининговыми подходами и характеризуются хорошей чувствительностью, широкой групповой специфичностью и высокой производительностью. Большинство описанных в литературе и применяемых на практике аналитических систем для определения антибиотиков в продуктах питания основаны на иммунохимической реакции антиген-антитело. Для разработки таких систем необходимы высокоаффинные антитела, получение которых часто является сложной задачей, особенно если важны их группоспецифичные свойства. И эта проблема актуальна для бета-лактамных антибиотиков.

Показано, что тест-системы на основе антител не могут одновременно выявлять все пенициллины или цефалоспорины в одном анализе, не говоря уже о межгрупповом узнавании этих соединений. Перспективным направлением разработок тест-систем для определения бета-лактамов является рецепторный анализ, который характеризуется высокой чувствительностью и широкой специфичностью, позволяя выявлять практически весь спектр пенициллиновых и цефалоспориновых антибиотиков. Это возможно благодаря уникальной способности рецепторного бактериального ПСБ проявлять высокое сродство к бета-лактамным антибиотикам различной структуры. В нашей работе поставлена цель получить и исследовать биохимические реагенты, разработать конструкцию и определить характеристики тест-системы гетерофазного рецепторного анализа пенициллинов и цефалоспоринов.

В разработанной биоаналитической системе реализован принцип непрямого конкурентного анализа (рисунок 2). Основой анализа является лиганд-рецепторное взаимодействие бета-лактамных антибиотиков и ПСБ (рекомбинантный PSB2 из *Streptococcus pneumonia* R6). На твердой фазе иммобилизован конъюгат бета-лактама с инертным белком. В ходе анализа в лунки вносят бета-лактам в возрастающих концентрациях и ПСБ в комплексе с моноклональным антителом к этому рецепторному белку. При инкубации происходит обусловленное конкуренцией распределение ПСБ между конъюгированным бета-лактамом на твердой фазе и свободным бета-лактамом в жидкой фазе в составе калибровочных или исследуемых проб. Выявление иммобилизованного комплекса происходит за счет конъюгата антивидовых антител с пероксидазой из корней хрена. Таким образом, на внутренней поверхности лунки микропланшета формируется многокомпонентный комплекс, включающий адсорбированный белковый конъюгат бета-лактама и последовательно связанные силами биологического сродства ПСБ, антитело к ПСБ и антивидовое антитело с ковалентно присоединенной пероксидазой. Ферментативная активность этого комплекса детектируется с помощью хромоген-субстратного раствора, содержащего 3,3', 5,5' – тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода. Интенсивность образующейся окраски обратно пропорциональна концентрации антибиотика в калибровочных и исследуемых пробах. Оптическая плотность растворов в лунках измеряется при длине волны 450 нм, и на основании полученных данных строится калибровочная кривая зависимости конкурентного связывания B_i/B_0 в % (ось ординат, линейная) от концентраций бета-лактама в калибровочных пробах в нг/мл (ось абсцисс, логарифмическая), где B_0 – оптическая плотность в отсутствии бета-лактама в растворе, B_i – оптическая плотность в присутствии возрастающих концентраций бета-лактама в растворе. По калибровочному графику рассчитывается концентрация аналита в исследуемых пробах.

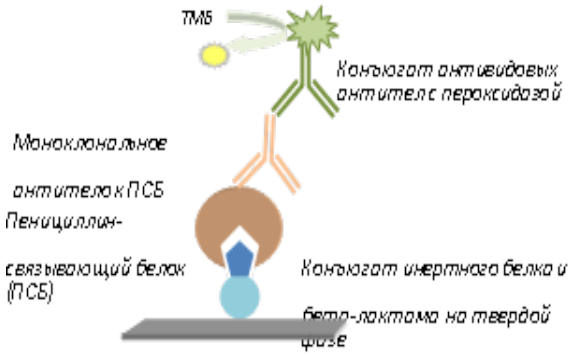


Рисунок 2 – Конструкция тест-системы непрямого конкурентного рецепторного анализа бета-лактамных антибиотиков

Для создания конструкции тест-системы нами синтезированы и исследованы твердофазные конъюгаты бета-лактамов, охарактеризованы основные реагенты и изучены лигандсвязывающие свойства рецепторного белка. Анализ проводили в 96-луночных микропланшетах (ООО «Хема-медика», Россия). В работе использовали ПСБ и моноклональное антитело к нему («Glory Sciences Co., Ltd», Китай), конъюгат антивидовых антител (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) с пероксидазой («Sigma-Aldrich», США) и применяли препараты антибиотиков пенициллинового (пенициллин G. ампициллин, амоксициллин) и цефалоспоринового рядов (цефалексин, цефтиофур, цефоперазон, цефапирин) («Sigma-Aldrich», США).

Конъюгаты бета-лактамов с инертным белком для адсорбции на твердой фазе синтезировали на основе альбумина человека, используя ампициллин и цефалексинв качестве гаптенов. Выбор этих представителей пенициллинов и цефалоспоринов обусловлен наличием в их структуре реакционноспособной аминогруппы в боковой цепи, не затрагивающей бета-лактамное кольцо.

По этой группе и проводили биоконъюгирование с белковой молекулой методом активированных эфиров с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) – карбодиимид гидрохлорида и N-гидроксисульфосукцинимида («Thermo Fisher Scientific», США). Полученные конъюгаты характеризовали с помощью MALDI-TOF и спектрофотометрически. Было установлено, что присоединение гаптена вызывает гипсохромный сдвиг максимума и увеличение интенсивности поглощения белка в ближней ультрафиолетовой области. Из анализа спектров MALDI-TOF найдено, что содержание антибиотиков в белке составило 18 и 15 моль на моль белка соответственно для цефалексина и ампициллина. Связывающие свойства полученных конъюгатов исследовали в системах рецепторного анализа. Установлено, что происходит взаимодействие ПСБ с его лигандами на твердой фазе. При этом конъюгированный ампициллин характеризуется более высокой активностью по сравнению с цефалексином в составе его белкового конъюгата, что выражается в больших количествах связанного рецептора в единицах оптической плотности при 450 нм, оно составило соответственно 2,0 и 1,5.

Выполнены исследования для обеспечения надлежащих условий протекания лиганд-рецепторного взаимодействия в тест-системе и выбраны оптимальные концентрации всех биохимических реагентов, белково-солевые составы и значения pH буферных растворов, а также температурные и временные режимы реакции связывания. Проведена сравнительная характеристика применения полученных белковых конъюгатов бета-лактамов в качестве твердофазных лигандов. По результатам оптимизации конъюгированный антибиотик иммобилизовали в концентрации 0,1 нг/мл. Оптимальный для тест-системы комплекс между ПСБ и моноклональным антителом к нему формировался при мольном соотношении рецептора и иммуноглобулина, равным 2:1. Установлено, что наилучшими для протекания гетерофазного лиганд-рецепторного взаимодействия являются среды с pH 7,4, температура инкубации 20–25° С и выдерживание системы в течение 0,5–1 ч.

Таблица – Параметры калибровочных кривых при использовании различных стандартных растворов бета-лактамных антибиотиков для конкурентного ингибирования связывания ПСБ с ампициллином на твердой фазе

Стандарт	IC_{50}, нг/мл	Диапазон концентраций, нг/мл	ПР, %
Пенициллин G	0,35±0,05	0,03 – 6,0	145,7
Ампициллин	0,51±0,04	0,03 – 9,0	100,0
Амоксициллин	0,52±0,04	0,03 – 9,0	98,0
Цефалексин	60,0±1,0	3,0 – 900,0	0,85
Цефаперазон	0,85±0,10	0,03 – 9,0	60,0
Цефтиофур	2,61±0,05	0,30 – 90,0	19,6
Цефапирин	1,35±0,03	0,03 – 60,0	37,8

Для определения аналитических и биохимических характеристик одной из разработанных версий тест-системы, включающей конъюгированный ампициллин в качестве твердофазного лиганда ПСБ, проведено сравнительное исследование с использованием различных антибиотиков в качестве стандартных препаратов (калибраторов). Калибровочные кривые получены для семи наиболее применяемых в сельскохозяйственной практике бета-лактамных антибиотиков (трех пенициллинов и четырех цефалоспоринов). Результаты представлены в таблице. Чувствительность метода оценивали по IC_{50}, что соответствует концентрации антибиотика в растворе, обеспечивающей 50 % ингибирование связывания рецептора с твердофазным лигандом. Перекрестную реактивность (ПР) рассчитывали по формуле: ПР (%) = IC_{50}(ампициллин)/ IC_{50}(другие антибиотики)·100. Установлено, что связывающая активность бета-лактамных антибиотиков по отношению к рецептору уменьшается в следующем ряду пенициллин G > ампициллин > амоксициллин > цефаперазон > цефапирин > цефтиофур > цефалексин. Калибровочная кривая для ампициллина характеризуется хорошей линейностью в диапазоне концентраций 0,03–9,0 нг/мл и IC_{50} = 0,51±0,05 нг/мл (n=3). Калибровочные графики, полученные для других бета-лактамов, характеризовались IC_{50} в широком диапазоне 0,35–60,0 нг/мл, а перекрестная реактивность составила 0,85–145,7 %.

Для установления аналитических параметров тест-системы и соответствия ее назначению выполнено сравнительное исследование с использованием проб молока и коммерческого иммуноферментного набора Penicillin ELISA («EuroProxima B.V.», Нидерланды) для определения пенициллинов.

В работе проведено тестирование образцов цельного сырого молока, несодержащих пенициллины. Также были приготовлены «положительные» образцы путем внесения в молоко ампициллина, пенициллина G и амоксициллина в диапазоне концентраций 0,25–1,0 нг/мл, тщательного перемешивания и выдерживания для равномерного распределения антибиотиков в молочном матриксе. При постановке рецепторного и иммуноферментного анализов образцы молока обезжиривали и разводили в 2 раза соответствующим буферным раствором. Показана хорошая корреляция результатов, получаемых с помощью разработанной рецепторноферментной системы и коммерческого иммуноферментного набора. Коэффициент вариации результатов измерений разработанной тест-системой не превышал 10 %, а открытие добавок различных антибиотиков составило 98,4±2,1 %, 108,4±3,2 % и 96,8±2,3 % соответственно для проб с ампициллином, пенициллином G и амоксициллином.

Таким образом, разработанная тест-система имеет показатели чувствительности, прецизионности и групповой специфичности в отношении пенициллинов и цефалоспоринов, удовлетворяющие современным требованиям к скрининговым системам биоанализа и может служить основой нового набора реагентов для контроля содержания бета-лактамных антибиотиков в пищевой продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mitchell J.M. [et al.] Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance (1998) *J Food Protect*. V. 61. P. 742-756.
2. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии 13.02.2018 № 28 (2018) О максимально допустимых уровнях остатков ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), которые могут содержаться в непереработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сырье, и методиках их определения. http://pravo.by/document/? guid=3871&p0=F91800044
3. European Commission. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. (2010) *Official Journal of the European Union*, L 15/10, https://ec.europa.eu/health/sites/ health/ files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf.
4. Kantiani L., Farre M., Barcelo D. Analytical methodologies for the detection of b-lactam antibiotics in milk and feed samples (2009) *Trends in Analytical Chemistry*. V. 28 (6). P. 729–744.

УДК 632.959

CLONING AND EXPRESSION OF CHITINASE 19 FAMILIE FROM *D.CAPENSIS*

I.G. Sinelnikov, A.M. Chulkin, A.M. Rozhkova

Federal Research Centre Fundamentals of Biotechnology of the RAS, Moscow, Russia

Chitinases are divided into two main families. Family 18 chitinases are widely studied class of enzymes are presented in almost all groups of organisms and possess a broad spectrum of physiological functions. Fungal producers 18 family are used in agriculture for the protection of plants against plant pathogens and pests. Chitinases of family 19 (GH19) less studied, but their potential as a biocontrol agent can significantly exceed the chitinases family 18, since they are evolutionary proteins immune response of higher plants in response to infection by phytopathogens. Chitin-degrading activity determines practical use of chitinases as protective agents against pathogenic organisms such as fungi and insects. These properties allow the use of chitinases for biocontrol of plant pathogens and eliminate the step of treating with mutagenic pesticides of agricultural plants.

This article focuses on the cloning and expression of heterologous chitinase family 19 (Gh19) of the carnivorous plant *Drosera capensis*, that can effectively destroy the exoskeleton of an insect.

We were isolated RNA and DNA from plants obtained *IV vitro* by modified CTAB method [1]. The sequence of the chitinase gene was reconstruct by TAIL-PCR [2] and submission in the GenBank data base (MK093978). Gene length was 2,443 bp, including three introns. The predicted open reading frame composed of 978 nucleotides was confirmed by amplifying the coding sequence from the cDNA. Protein encoded by this sequence has a length of 325 amino acid residues and represents a classical chitinase having two domain and a signal peptide at the C-terminal region.

In this work was carried heterologous expression of full GH19 and GH19 without chitin-binding domain in different strains of *E.coli: Arctic Express (DE3*), *Rosetta™(DE3), Rosetta-gami™ 2(DE3)* и Shuffle *(DE3*). However, soluble form of protein wasn't obtained in any of the strains. To restore the native structure GH19 from inclusion bodies, refolding protocol was optimized. Refolding of inclusion bodies was carried out in the system of oxidized and reduced glutathione

To the resulting homogeneous chitinase was determined optimum temperature and pH, which was 55 °C and 4,5 respectively. Under optimal conditions, the activity of chitinase for colloidal chitin was 0,56 U/mg for a full-size chitinase and 0,14 U/mg for a form without a chitin-binding domain. Nonspecific activity for other polysaccharides (microcrystalline cellulose, xylan, carboxymethylcellulose) is not detected.

In this way, the work was carried out a directed search and cloning of chitinase 19 family from *Drosera capensis*. Primary biochemical characteristics are described, and the optimum pH and temperature are determined. The set of characteristics of the obtained enzyme demonstrates the relevance of further study of fungicidal and phytoprotective properties, in order to create biological products for the control of phytopathogens.

This work was supported by the Ministry of science and higher education of the Russian Federation under the agreement 05.616.21.0128 (RFMEFI61620X0128).

REFERENCES

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, № 1, P. 19–24.

*УДК 630*165.6*

ВЛИЯНИЕ ГАЗОВОЙ ДЕКОМПРЕССИИ НА ВСХОЖЕСТЬ И РОСТ СЕЯНЦЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО

Т.А. Благодарова[1], А.Ю. Кошелев[2], А.И. Сиволапов[2]

[1] ВНИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии, Россия
[2] Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова, Россия

Газовая декомпрессия является одним из методов дезинтеграции клеток. 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 [1, 2]. Нами 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 лесопаркового участка ВНИИЛГИСбиотех сеянцы дуба черешчатого из намоченных семян в течение суток с отобранных деревьев дуба, обработанные кислородом в декомпрессионной камере 5 атмосфер показали незначительное превышение по высоте. Наблюдения продолжаются (таблица).

Таблица – Характеристика двухлетних сеянцев дуба черешчатого, обработанных в декомпрессионной камере кислородом при давлении 5 атм.

Вариант опыта	Высота сеянцев, см	Диаметр корневой шейки, мм	Состояние сеянцев
Опыт (обработанные)	14,6±0,79	2,8±0,05	хорошее
Контроль (без обработки)	13,5±0,61	2,6±0,04	хорошее

Данные таблицы показывают, что фенотипические признаки сеянцев дуба, желуди которых обработаны в декомпрессионной камере кислородом при давлении 5 атм. отличаются не достоверно по высоте и диаметру корневой шейки от контроля (без обработки).

В биологических системах образование свободных радикалов протекает с участием молекулярного кислорода. Поэтому изучение генетических последствий влияния кислорода под давлением, повышенные концентрации которого генерируют в живых системах все известные формы свободных радикалов, является основным методом исследования механизмов становления повреждений после окислительного стресса, знание которых определяет стратегию защиты генома от активных метаболитов кислорода.

Известно, что активные формы кислорода принимают участие в развитии многих патофизиологических процессов. Они могут выступать в качестве посредников при канцерогенезе и других болезнях человека – ишемии, инсульте, бронхиальной астме, диабете, атеросклерозе и др. (Halliwell, [3]; Sahnoun et al., [4]). Они способны инактивировать ферменты и гормоны, вызывать деструкцию мембран, повреждения ДНК и теломерных участков хромосом и, в конечном итоге, гибель клеток (Chiu et al., [5, 6]; Bunout, Cambiazo, [7]; Kang et al., [9]; Bohr et al., [8]).

Опыты с древесными растениями, в частности с дубом черешчатым, показали, что в результате обработки кислородом под давлением никаких изменений внешних признаков у сеянцев не обнаружено. Получены стандартные сеянцы (рис. 1, 2).



Рисунок 1 – сеянец дуба черешчатого После обработки в декомпрессионной камере кислородом при давлении 5 атм.



Рисунок 2 – сеянцы дуба черешчатого на грядке в питомнике

Таким образом, газодекомпрессионный шок при давлении 5 атм. экспозиции 1 час не влияет на внешние фенотипические признаки дуба черешчатого.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кошелев А.Ю. Применение газовой декомпрессии для обработки семян сосны обыкновенной и дезинфекции эксплантов in vitro [Текст] / А.Ю. Кошелев // Мониторинг состояния, использования и воспроизводства лесов Европейской части Российской Федерации: материалы Всероссийской молодежной научно-практической конференции 20.09.16 г. / Кошелев А.Ю. – Воронеж: ВГЛТУ, 2016. – С. 105–106.
2. Патент на изобретение № 2663288. Установка для обеззараживания объектов. Глухов А.А., Ващенко Ю.Е., Кошелев А.Ю. Сиволапов А.И. Кошелев П.И. 2018 г.
3. Halliwell B Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation Studies //Free radical research., 1998. – V.29. – № 6.P.469–486.
4. Sahnoun Z., Jamoussi K., Zeghal KM. Free radicals: fundamental notions and methods of exploration. Part 2. // Therapie., 1998, – V.53. – № 4. – P.315–339.
5. Chiu DTY, Kuypers FA, Lubin B. Lipid peroxidation in human red cells. Semin Hematol., 1989. – V.26. – P.257–276.
6. Chiu DTY, Liu TZ. Free radical and oxidative damage in human blood cells //J. Biomedical Scienc., 1997. – N4. – P.256–259.
7. Bunout D., Cambiazo V. Nutrition and aging // Revista medica de chile., 1999, – V. 127, – № 1. – P.82–88
8. Bohr V., Anson R., Mazur S., Dianov G. Oxidative DNA damage processing and changes aging // Free radical biology and Medicine, 1999. – V.27. – № 3–4. – P.47–52.
9. Kang C., Kristal B., Yu B. Age-related mitochondrial DNA deletions – effect of dietary restriction // Free radical biology and medicine, 1999. – V. 27. – № 3–4. – P. 148–154.

УДК 637.5.039

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ В МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ ПЕРСПЕКТИВНОЙ СТАРТОВОЙ КУЛЬТУРЫ НА ОСНОВЕ KOCURIA VARIANS

М.Ю. Минаев, Е.А. Коноров

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

Современное производство сырокопченых / сыровяленых мясных изделий сложно представить без применения стартовых культур. Традиционные технологии естественной ферментации сырокопченых или сыровяленых колбас все больше уступают долю рынка ферментированным мясным изделиям. Основным требованием к стартовым культурам является их безусловная безопасность для человека. И это понятие безопасности более широкое нежели отсутствие патогенности или токсигенности.

Европейское Агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) постоянно обновляет перечень микроорганизмов, имеющих статус презумптивно безопасных – Qualified Presumption of Safety (QPS)» [1]. В этот список входят как целые группы микроорганизмов, например, молочнокислые бактерии (*Lactococcus* и *Lactobacillus*), бифидобактерии, так и отдельные виды микроорганизмов, например, *Corynebacterium glutamicum*. Это означает, что любой производитель стартовых культур может включать данный микроорганизм в состав своей стартовой культуры без проверки ее безопасности и регистрации. В этот список включены микроорганизмы, которые на уровне рода или семейства не имеют патогенных или условно-патогенных видов, что подтверждается историей их применения, а также виды микроорганизмов, которые признаны безопасными в определенной технологической цепочке, например, производство глутамата натрия. [2]

Тем не менее, в качестве стартовых культур используются не только сертифицированные как безусловно безопасные микроорганизмы. В 1955 г. финским ученым Niinivaara [3,4] была разработана научная теория введения в рецептуру микрококков и практического использования стартовых культур на их основе в мясной промышленности. Его исследования показали, что при традиционной технологии изготовления сырокопченых и сыровяленых мясных изделий микрококки играют определяющую роль в формировании характерного качества готового продукта.

Позднее, ряд разработчиков стартовых культур заменил микрококки на непатогенные коагулазоотрицательные стафилококки. Наиболее распространенным видом непатогенных стафилококков в составе стартовых культур стал Staphylococcus carnosus, а микрококков – Micrococcus varians. Несмотря на продолжительную историю их применения в качестве стартовой культуры для производства сырокопченых колбас, эти виды микроорганизмов не попали в список QPS (EFSA) и GRAS (FDA USA). Связано это с тем, что Staphylococcus carnosus практически единственный вид в своем роде не являющийся патогенным или условно-патогенным. В составе рода Micrococcus ныне Kocuria, имеется один вид, относящийся к эмерджентным патогенам, Kocuria kristinae.

С развитием методов высокопроизводительного секвенирования и функционального анализа данных полногеномного секвенирования появилась возможность быстро получать информацию о наличии в геноме микроорганизма потенциальных факторов патогенности, вирулентности и резистентности к антибиотикам, а также исследовать на основании сравнения с базами данных особенности метаболических путей микроорганизма, представляющих интерес для исследователя.

В 2009 г. был полностью секвенирован штамм Staphylococcus carnosus TM300 и только в 2015 г. в базе данных NCBI появился полностью аннотированный его геном (AM295250). В результате были обнаружены ряд генов гомологичных генам патогенности S.aureus, S.epidermidis и т. п. Наиболее высокая гомология была к генам гемолизина – Putative hemolysin (NC_002951) на 79 % и экзотоксина – Exotoxin (YP_040552). Были также обнаружены гены осмотолерантности и активный ген орнитин декарбоксилазы, который может способствовать образованию таких биогенных аминов как путресцин и кадаверин. [5]

Цель работы – получение полногеномной последовательности микроорганизма Kocuria varians 80 и на этой основе изучение возможных рисков его применения в качестве стартовой культуры.

Культура микроорганизма

Штамм Micrococcus/Kocuria varians 80 был выделен в 1973 г. из сырокопченого продукта скиландис (Литовская ССР) и заложен в лабораторную коллекцию микроорганизмов. В 1997 г. он

вошел в состав бактериального препарата ПБ МП для производства сырокопченых и сыровяленых колбас, на что был получен Патент RU 2 091 486 C1.

Выделение ДНК, приготовление библиотек и полногеномное секвенирование

Бактериальная ДНК была выделена с помощью GBD набора (Биосилика, Россия). Для приготовления библиотек были использованы NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit для секвенирования на платформе Illumina HiSeq2500 и SMRTbell Template Prep Kit 1.0 для ссеквенирования на Pacific Biosciences. Всего было получено 2,1 (2x250 п.о.) миллиардов чтений Illumina HiSeq2500 и более 158 тыс. чтений PacBio (средняя длина прочтения 10 тыс. п.о.)

Сборка и аннотация генома

После обрезания ошибочных чтений (phred-оценка менее 20) и удаления адаптерных последовательностей с помощью Trimmomatic геном K. varians был собран с помощью SPAdes v3.11. Поиск генов в геноме производился с помощью prokka, каждый предсказанный ген был функционально аннотирован с помощью BLASTP (база данных nr), InterProScan и BLAST2GO. Для поиска факторов вирулентности использовался поиск BLASTP по базам данных VSFB и VirulenceFinder2.

В геноме изучаемого штамма K. varians sensu auct. (K. salsicia) штамма 80 есть все необходимые для метаболизма D-глюкозы ферменты гликолиза, как и в геноме другого штамма K. salsicia, выделенного на скотобойне в Дании, при этом в изначальном описании как K. varians, так и K. salsicia не отмечена метаболизация D-глюкозы (Yun J.H. et al. 2011, Hans-Jurgen Busse, 2012). Данные полногеномного секвенирования говорят о потенциальной возможности превращения D-сорбитола и D-маннозы-6-фосфат в D-фруктозу-6-фосфат, но отсутствует фермент маннокиназа и фермент, отвечающий за включение в метаболизм внеклеточной маннозы manXa, что согласуется с данными биохимического теста, в котором K. varians sensu auct. (K. salsicia) штамма 80 не проявляла метаболитической активности по отношению к маннозе и манниту. При этом, исходя из описания биохимических свойств музейных штаммов, оба вида утилизируют D-маннозу до кислоты (Yun J.H. et al. 2011, Hans-Jurgen Busse, 2012). Также в геноме изученного штамма отсутствует гомолог инвертазы, что объясняет отсутствие роста на сахарозе, однако потенциально возможен гидролиз крахмала из-за наличия гомолога мальтазы-глюкоамилазы. В фосфотрансферазной системе бактерий отсутствуют EIICB/EIICBA компоненты для всех сахаров (включая глюкозу), кроме фруктозы как в геноме штамма 80, так и в других геномах K. salsicia. Обнаружена также гомологичная последовательность гена орнитин декарбоксилазы, однако, биохимический тест с лизином и орнитином показал отрицательный результат, кДНК с этого гена также не удалось получить.

Таким образом, только полногеномное секвенирование промышленно ценных штаммов позволяет в полной мере оценить все возможные риски его применения, оценить его потенциальные возможности, снять разночтения по биохимическим свойствам штамма.

ЛИТЕРАТУРА

1. EU Regulation. EFSA Journal, 3 February 2020. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 11: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2019
2. Багрянцева О.В., Шатров Г.Н. О необходимости внесения изменений в законодательство Евразийского Экономического Союза в области нормирования ферментных препаратов. Сборник научных трудов ГНУ ВНИИПБ «Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов», 2014, С. 101–108.
3. Анисимова И.Г., Терешина О.В., Солодовникова Г.И., Лагода И.В. Использование методов биотехнологии при производстве сырокопченых полусухих колбас: Обзор. информ. – М.: АгроНИИТЭИММП, 1989. – 30 с.
4. Минаев М.Ю. Разработка бактериального препарата с денитрифицирующими свойствами и его применение в технологии мясных продуктов. Автореферат диссертации, 2006.
5. Ralf Rosenstein, 1 * Christiane Nerz, 1 Lalitha Biswas, 1 Alexandra Resch, 1 Guenter Raddatz, 2 Stephan C. Schuster, 3 and Friedrich Go¨tz1. Genome Analysis of the Meat Starter Culture Bacterium Staphylococcus carnosus TM300. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 2009, p. 811–822 Vol. 75, No. 3 //doi:10.1128/AEM.01982–08
6. Yun J.H. et al. Kocuria salsicia sp. nov., isolated from salt-fermented seafood //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2011. – Т. 61. – №. 2. – С. 286–289.
7. Aidan Parte, William B. Whitman, Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Wolfgang Ludwig, Kenichiro Suzuki. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria, 2012

УДК 575

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С АПОМИКСИСОМ, *CENH3* И *APOLLO*

Е.А. Бакин[1,2], Ф. Сезер[3], М.П. Райко[1], К.М. Таскин[3], В.Б. Брюхин[1,4]

[1] Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
[2] Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия
[3] Университет Чанаккале Онсекиз Март, Чанаккале, Турция
[4]Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Половой процесс способствует возникновению большого разнообразия новых форм и признаков у живых организмов. В результате естественной и искусственной гибридизации близкородственных и отдаленных организмов в первом поколении гибридов часто возникает явление, называемое гетерозисом (увеличение жизнеспособности гибридов), выражающееся у растений в лучшем росте, увеличении урожайности, улучшении пищевых свойств семян и плодов, повышении технических характеристик растительного сырья. Однако, в результате мейоза и рекомбинации в последующих поколениях происходит расщепление выгодного сочетания аллелей, определяющего ценные признаки. Кроме того, гибридизация часто сопровождается возникновением полиплоидии, анеуплоидии и невозможностью воспроизведения образовавшихся гибридов половым путем. Одним из хорошо известных механизмов, который может предотвратить эти явления и продуцировать «клоны» материнских растений, является апомиксис, который часто описывают как способ бесполого размножения семенами, встречающийся в природе как минимум в 400 семействах растений (Carman 1997; Koltunow and Grossniklaus 2003; Brukhin 2017). При апомиксисе мейоз модифицируется, либо полностью отсутствует (апомейоз), а генетически идентичные материнскому растению зародыши развиваются без оплодотворения, путем партеногенеза. Благодаря способности апомиктов к быстрому фенотипическому ответу на требования отбора за короткое время апомиксис способствует моментальной репродуктивной изоляции полиплоидных линий, формируя фрагментированные генофонды в популяции, которые развиваются независимо, тем самым, он увеличивает диапазон распространения популяции и расширяет экологическую пластичность. Таким образом, апомиксис является очень важным экологическим и эволюционным феноменом в природе. Несмотря на прогресс в изучении апомиксиса, молекулярно-генетическая регуляция последнего остается слабо изученной (Koltunow and Grossniklaus 2003; Brukhin 2017). В нашей работе мы предприняли попытку филогенетической и функциональной характеристики двух генов, ассоциированных с апомиксисом, *CENH3* и *APOLLO* у апомиктических и половых растений из рода *Boechera* (Brassicaceae), которые являются очень удобной моделью для изучения апомиксиса (Brukhin et al. 2019). Особого внимания заслуживают апомиктический вид *Boechera divaricarpa*, который известен как межвидовой гибрид между половыми видами *B. stricta* и *B. retrofracta* или другими близкородственными видами *Boechera* (Koch 2003). Ген *Centromere Specific Histone 3* (*CENH3)* является одним из важнейших генов, необходимых для осуществления деления клеток и, как предполагают, он задействован в возникновение апомиксиса (Lermontova et al 2011; 2015). Этот ген кодирует специфичный для центромеры вариант гистона H3. Накопление белка CENH3 определяет место формирования кинетохор, основная функция которых – связывать хромосомы с нитями веретена деления во время расхождения хромосом при мейозе и митозе (Talbert and Henikoff 2010). *CENH3* содержит два домена: ДНК-связывающий гистоновый складчатый домен (HFD) и N-концевой хвостовой домен. HFD структурно сходен и высоко консервативен у всех высших эукариот. Однако N-концевой регион белка CENH3 сильно варьирует даже у близкородственных видов и выполняет специфическую для мейоза функцию (Maheshwari et al. 2015). Мутации в N-терминальном хвосте *CENH3* вызывают нарушение расхождения хромосом при мейозе и часто приводят к стерильности (Lermontova et al. 2011; Ravi et al. 2011). Нулевые мутации в *CENH3* также вызывают элиминацию хромосом; мутанты по данному гену были предложены в качестве инструмента для получения гаплоидных растений (Ravi and Chan 2010; Marimuthu et al. 2011; Karimi-Ashtiyani et al. 2015; Evtushenko et al. 2019).

Мы выявили различные уровни экспрессии гена *CENH3* в клетках меристем цветка при апомиктическом и половом развитии растений *Boechera*. Тогда как сразу после оплодотворения у апомиктов экспрессия *CENH3* понижалась, у половых растений она возрастала в первый день после оплодотворения. Эти результаты указывают на возможную роль, которую *CENH3* может играть в апомиктическом развитии у видов *Boechera*.

Также мы изучили филогению гена *APOLLO* (*APomixis-L*inked *LOcus*), который кодирует ген аспартат-глутамата аспартат-аспартат-гистидин экзонуклеазы NEN и, как было показано, имеет несколько полиморфных половых и апо-аллелей (Corral et al. 2013; Kliver et al. 2018). Экспрессия этого гена подавляется в клетках семязачатков половых растений на стадии мейоза и активируется в семязачатках апомиктических растений *Boechera*. Геномы апомиктических растений всегда гетерозиготны по этому гену и содержат по крайней мере оду апо-аллель, в то время как половые генотипы всегда гомозиготны по половым аллелям (Corral et al. 2013; Kliver et al. 2018). *APOLLO* является одним из самых важных генов, связанных с апомиксисом у видов *Boechera*. Эволюционный анализ генов *APOLLO*, представленный в нашем исследовании, показывает, что половые и апомиктичные виды *Boechera* сгруппированы в разные клады на филогенетическом дереве на основе выравнивания множественных нуклеотидных последовательностей. Это может быть связано с тем, что апо-аллели *APOLLO*, присутствующие в геномах апомиктических видов, могут приобретать новую функцию (Kliver et al. 2018).

Характеристика гена CENH3 и изоформ белка CENH3

У семи исследованных видов *Boechera* изоформы белка CENH3 показали высокое сходство друг с другом с индексом сходства не менее 97 % (как на уровне нуклеотидов, так и на уровне белка). Все последовательности белка CENH3, содержащие консервативный домен гистона H3/CENP-A (IPR000164), составляли 177 п.н. (пар нуклеотидов) и предположительно были локализованы в ядре. Результаты выравнивания белка CENH3 представлены на рис. 1. У семи исследованных видов *Boechera* были обнаружены 10 полиморфных сайтов аминокислот в белке CENH3. *B. stricta* и *B. divaricarpa*, которые были подвергнуты дополнительному сравнительному анализу экспрессии гена *CENH3*, имели только две полиморфные аминокислоты в положениях 7 и 16 N – концевого хвоста, которые были расположены вне консервативного домена гистона H3. Вариабельность в районе N-концевого хвоста может быть причиной, влияющей на сегрегацию хромосом при мейозе (Lermontova et al. 2011; 2015) и приводящей к апомейозу.

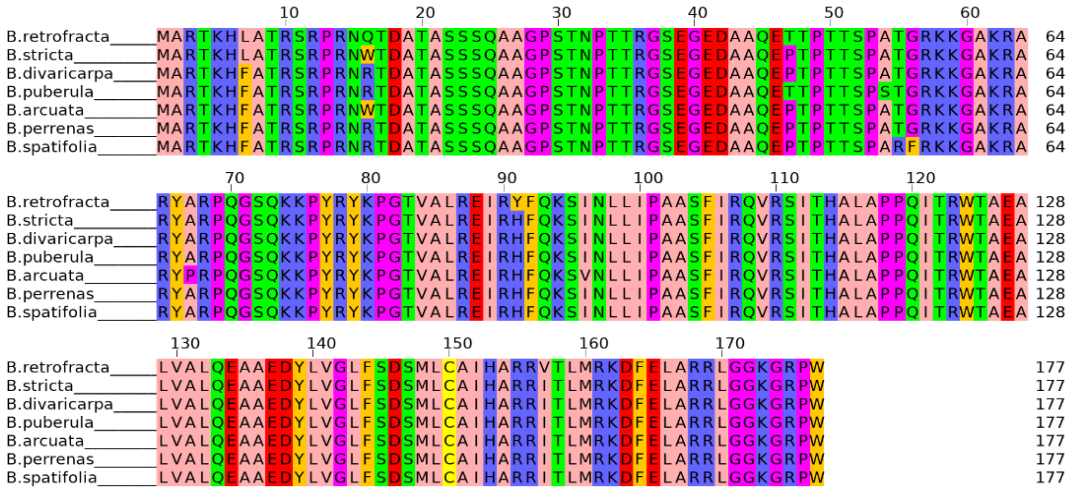
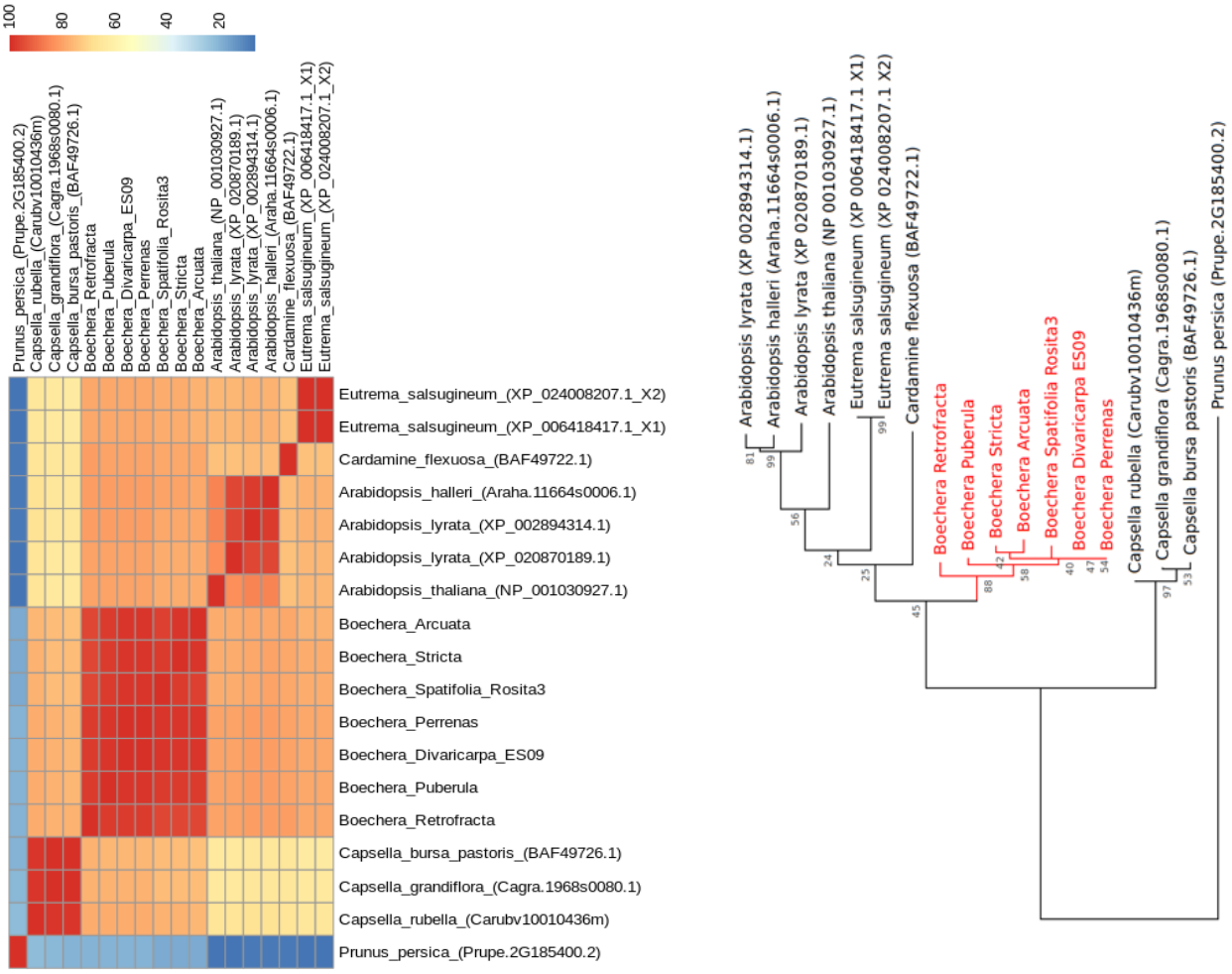


Рисунок 1. Множественное выравнивание белков CENH3 у семи видов Boechera sp., выполненное с использованием программного обеспечения MUSCLE и визуализированное в Jalview.

Матричная тепловая карта сходства гомологов *CENH3* и его реконструированное филогенетическое дерево изображены на рис. 2, (а) и (б) соответственно. Тепловая карта демонстрирует, что последовательности CENH3 у всех видов *Boechera* практически идентичны, что согласуется с анализом выравнивания белков (рис. 1), и очень похожи (≥80 %) на гомологичный белок у *Arabidopsis*, а также у других исследованных представителей Brassicaceae. Ген *CENH3* представлен только одной копией на геном у каждого исследованного вида. Эволюционная история оценивалась с помощью наивысшей логарифмической вероятности. Реконструированное филогенетическое дерево (рис. 2б) укоренялось с помощью *P. persica*, выбранной в качестве внешней группы. Все виды *Boechera* сгруппировались в одну кладу, которая оказалась довольно близка к видам *Arabidopsis, Eutrema, Cardamine sp*. и немного удалена от видов *Capsella*. Из этого можно предположить, что ортологи *CENH3* очень похожи в геномах всех видов Brassicaceae, использованных в нашем исследовании.

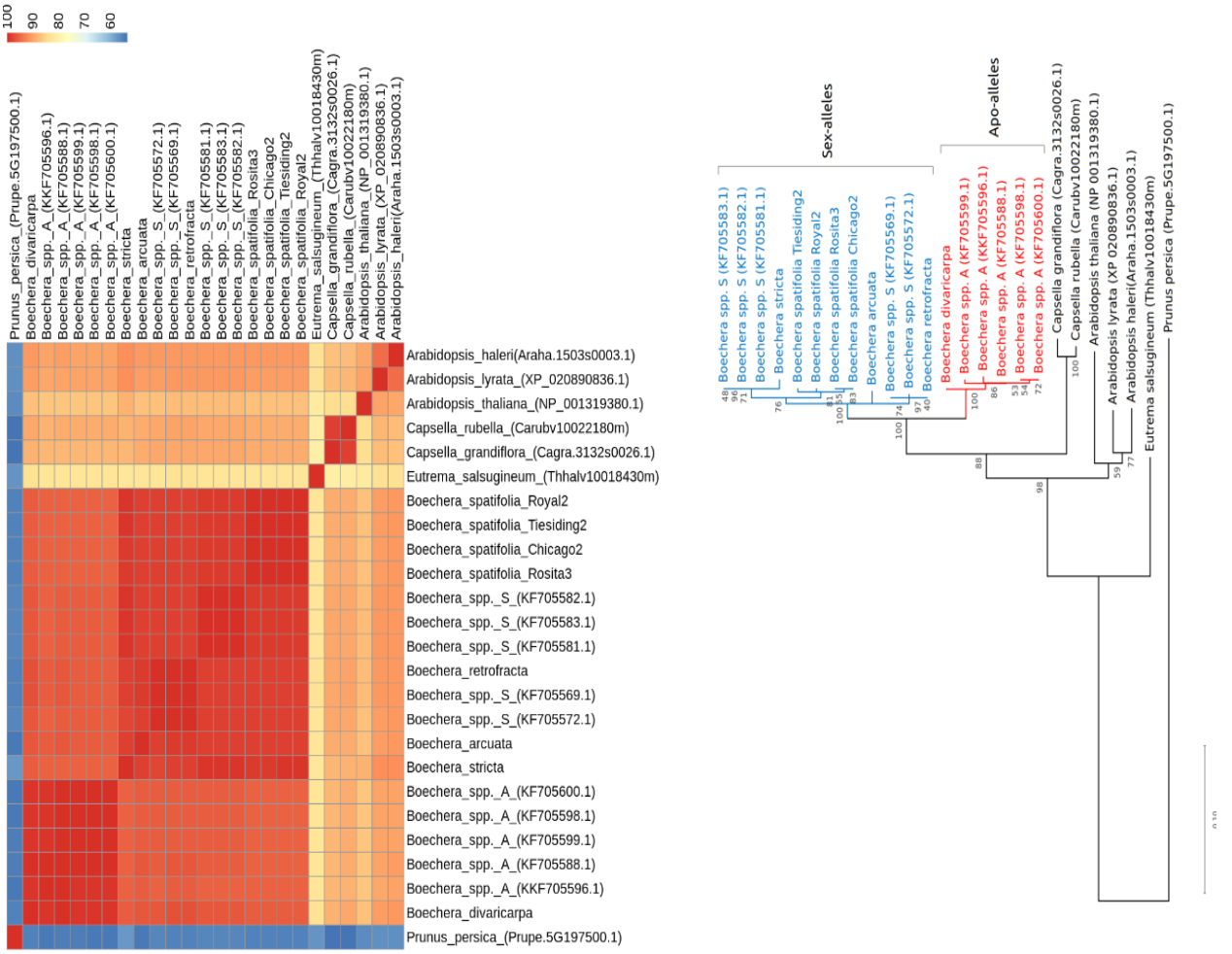


(а) (б)

Рисунок 2. (а) Матрица сходства и (б) Филогенетическое древо CENH3 (гистон H3-подобный центромерный белок) у семи видов. Последовательности *Prunus persica* использовали в качестве внешней группы. Все виды *Boechera* сгруппировались в одну кладу. Числа рядом с узлами представляют соответствующую поддержку начальной загрузки (бутстрэп). Филогенетическое дерево было реконструировано с использованием метода максимального правдоподобия.

Филогенетический анализ гена APOLLO

Комплексный анализ гена APOLLO и белковых ортологов проводился ранее (Corral et al. 2013; Kliver et al. 2018), поэтому целью данного исследования было изучение филогении гена APOLLO с использованием имеющихся в открытом доступе секвенированных геномов апомиктичных и половых видов Boechera путем трансляции нуклеотидных последовательностей APOLLO в белки и применения метода множественного выравнивания для получения аминокислотных последовательностей с использованием программного обеспечения MUSCLE и метода максимального правдоподобия для построения филогенетического дерева. Тепловая карта, изображенная на рис. 3а, демонстрирует, что все сравниваемые белки APOLLO у видов Boechera довольно похожи (≥92,5 %), несмотря на присутствие 5 апо- и 5 половых аллелей этого гена. Филогенетическое дерево APOLLO (рис. 3б) указывает на то, что виды Boechera сгруппированы в два отдельных субклада в соответствии с типом размножения: первый субклад содержит гомозиготные образцы для половых аллелей, размножающихся половым путем, а второй содержит образцы с апо – аллелями, которые размножаются посредством апомиксиса. В то же время, все виды Boechera, представленные на филогенетическом дереве, сгруппированы в общую кладу, слегка отделяющую их от других родов семейства Brassicaceae (сходство ≥82,5 %).



(а) (б)

Рисунок 3. Матрица сходства (а) и Филогенетическое древо (б) *APOLLO* у интересующих видов. Последовательности *Prunus persica* использовали в качестве внешней группы. Числа рядом с узлами представляют соответствующую поддержку начальной загрузки (бутстрэп). Филогенетическое дерево было реконструировано с использованием метода максимального правдоподобия. В зависимости от способа размножения виды *Boechera* группировались в два отдельных субклада: первый содержит гомозиготные образцы для половых аллелей, а второй содержит образцы с апо-аллелями

В заключении можно отметить, что подробное знание структуры и филогении аллелей генов, тесно связанных с апомиксисом и динамики их экспрессии, по-видимому, может быть использовано для идентификации половых и апомиктичных растений в агамных комплексах, а также для изучения эволюционной, экологической и популяционной роли апомиксиса.

Работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ № 20–54–46002, гранта Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ № 51148284) В.Б. Брюхину, а также гранта TÜBİTAK № 119N384 и гранта университета Чанаккале Онсекиз Март BAP № FHD-2016–1038 К.М. Таскину. Исследование осуществляется в рамках государственного задания № АААА-А18–118051590112–8 БИН РАН.

ЛИТЕРАТУРА

Brukhin V. (2017) Molecular and Genetic Regulation of Apomixis. Russ J Genetics 53 (9), 1001–1024.
Brukhin V., Osadtchiy J.V., Florez-Rueda A.M., Smetanin D., Nobre M.S., Bakin E., Grossniklaus U. (2019) The *Boechera* Genus as a Resource for Apomixis Research. *Frontiers in Plant Science* – Special Issue Plant Breeding, March 2019, v. 10:392. doi: 10.3389/fpls.2019.00392.
Carman J.G. (1997) Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. Biological Journal of the Linnean Society, 61, 51–94, doi: 10.1111/j. 1095–8312.1997.tb01778.x
Corral, J.M.; Vogel, H.; Aliyu, O.M.; Hensel, G.; Thiel, T.; Kumlehn, J.; Sharbel, T.F. A Conserved Apomixis-Specific Polymorphism Is Correlated with Exclusive Exonuclease Expression in Premeiotic Ovules of Apomictic Boechera Species. *PLANT PHYSIOLOGY* 2013, *163*, 1660–1672.
Evtushenko, E.V.; Lipikhina, Y.A.; Stepochkin, P.I.; Vershinin, A.V. Cytogenetic and molecular characteristics of rye genome in octoploid triticale (× Triticosecale Wittmack). *CCG* 2019, *13*, 423–434.
Karimi-Ashtiyani, R.; Ishii, T.; Niessen, M.; Stein, N.; Heckmann, S.; Gurushidze, M.; Banaei-Moghaddam, A.M.; Fuchs, J.; Schubert, V.; Koch, K.; et al. Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015, *112*, 11211–11216.
Kliver, S.; Rayko, M.; Komissarov, A.; Bakin, E.; Zhernakova, D.; Prasad, K.; Rushworth, C.; Baskar, R.; Smetanin, D.; Schmutz, J.; et al. Assembly of the Boechera retrofracta Genome and Evolutionary Analysis of Apomixis-Associated Genes. *Genes* 2018, *9(4)*, 185. doi: 10.3390/genes9040185.
Koch, M.A. Multiple Hybrid Formation in Natural Populations: Concerted Evolution of the Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA (ITS) in North American Arabis divaricarpa (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* 2003, *20*, 338–350.
Koltunow, A.M., and Grossniklaus, U. (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 547–574. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.110901.16084
Lermontova, I.; Koroleva, O.; Rutten, T.; Fuchs, J.; Schubert, V.; Moraes, I.; Koszegi, D.; Schubert, I. Knockdown of CENH3 in Arabidopsis reduces mitotic divisions and causes sterility by disturbed meiotic chromosome segregation: *Consequences of AtCENH3 depletion. The Plant Journal* 2011, *68*, 40–50.
Lermontova, I.; Sandmann, M.; Mascher, M.; Schmit, A. – C.; Chabouté, M. – E. Centromeric chromatin and its dynamics in plants. *Plant J* 2015, *83*, 4–17.
Maheshwari, S.; Tan, E.H.; West, A.; Franklin, F.C.H.; Comai, L.; Chan, S.W.L. Naturally Occurring Differences in CENH3 Affect Chromosome Segregation in Zygotic Mitosis of Hybrids. *PLoS Genet* 2015, *11*, e1004970.
Marimuthu, M.P.A.; Jolivet, S.; Ravi, M.; Pereira, L.; Davda, J.N.; Cromer, L.; Wang, L.; Nogue, F.; Chan, S.W.L.; Siddiqi, I.; et al. Synthetic Clonal Reproduction Through Seeds. *Science* 2011, *331*, 876–876.
Ravi, M.; Chan, S.W.L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 2010, *464*, 615–618.
Ravi, M.; Shibata, F.; Ramahi, J.S.; Nagaki, K.; Chen, C.; Murata, M.; Chan, S.W.L. Meiosis-Specific Loading of the Centromere-Specific Histone CENH3 in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* 2011, *7*, e1002121.
Talbert, P.B.; Henikoff, S. Histone variants – ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, *11*, 264–275.

УДК 576.311.332:578.232:578.232(045)

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЛКОВ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ BRUCELLA В СЕРОДИАГНОСТИКЕ БРУЦЕЛЛЕЗА

А.К. Булашев, О.С. Акибеков, А. Сыздыкова, Ж.А. Сураншиев, Б. Инербай

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Нур-Султан, Республика Казахстан

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез остается одним из самых распространенных зоонозов в мире. Одной из основных причин низкой эффективности мер против бруцеллеза является недостаточная специфичность традиционных серологических тестов, таких как роз-бенгал проба (РБП), реакция агглютинации (РА) и реакция связывания комплемента (РСК), основанных на использовании липополисахаридов клеточной стенки гладких штаммов (S-ЛПС) бактерий рода *Brucella*. Последние могут проявлять перекрестные реакции с близкородственными бактериями, такими как *Yersinia enterocolitica, Escherichia coli* и др. Кроме того, S-ЛПС создают определенную проблему в дифференциации больных от вакцинированных против бруцеллеза животных в случае использования аттенуированных гладких штаммов бруцелл [1].

Достижения генетической инженерии открыли новые перспективы для изучения более специфического компонента клеточной стенки, а именно белков, с целью использования их в качестве диагностических и / или вакцинных препаратов [2]. Среди неполисахаридных компонентов *Brucella* spp. белки наружной мембраны (БНМ) представляют наибольший интерес для исследователей, занимающихся совершенствованием диагностики бруцеллеза [3]. Тем не менее, потенциал рекомбинантных БНМ в серологической диагностике бруцеллеза все еще остается недостаточно изученным, а имеющиеся результаты иногда противоречат друг другу. Так, например, на мышиной модели было установлено, что иммуноферментный анализ (ИФА) на основе комбинированных БНМ может дифференцировать постинфекционные анти – *B. melitensis* антитела от вакцинных и / или перекрестно реагирующих антител [4]. Однако наши предыдущие исследования показали, что антитела к рекомбинантным БНМ с молекулярной массой 25кДа (БНМ25) и 31кДа (БНМ31) могут быть обнаружены не только у инфицированных коров, но и у некоторых здоровых животных, вакцинированных *B. aborus* 19 [5]. Более того, антигенность другого белка – БНМ19 по отношению к антителам инфекционного и вакцинного происхождения до сих пор остается неизученной.

Цель работы – сравнительное изучение серологического потенциала БНМ19, БНМ25 и БНМ31 в непрямом ИФА (н-ИФА) при определении *Brucella* – специфических антител.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление суспензии клеток B. abortus 19. Клетки бруцелл культивировались на эритрит агаре (Микроген, Махачкала, Россия). Выращенная культура проверялась на чистоту и типичность роста, затем смывалась 0,5 % фенолизованным раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и выдерживалась в инкубаторе при 37 °С в течение 48 часов для инактивации бактериальных клеток. Затем клеточная суспензия трижды промывалась центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 минут.

Рекомбинантные белки. В работе были использованы рекомбинантные белки бруцелл, полученные в наших предыдущих исследованиях: БНМ19 [6], БНМ25 и БНМ31 [7]. Для очистки рекомбинантных белков были использованы колонки His Trap на основе металл-аффинной хроматографии в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare Life Sciences, Кардифф, Великобритания). Присутствие целевых белков было подтверждено вестерн-блоттингом с использованием моноклональных антител против His-Tag, конъюгированных с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Получение антител против цельных клеток (ЦК) B. abortus 19. Иммунизация кролика суспензией убитых фенолом ЦК проводилась подкожно по описанной ранее методике [4]. Образцы крови брали из краевой вены уха под седативным эффектом перед иммунизацией (0 день) в качестве отрицательного контроля, а затем на 14, 21, 35 и 45 дни иммунизации для определения уровня антителообразования. Образцы сыворотки хранили при -20 °С до использования.

Сыворотки крови. В работе было использовано 327 сывороток крови крупного рогатого скота (КРС). Из них 12 сывороток принадлежали КРС, экспериментально зараженному вирулентным штаммом *B. abortus* 544. Эти сыворотки были любезно предоставлены профессором К. Табыновым, заведующим лабораторией по профилактике инфекционных заболеваний Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Республика Казахстан (РК). 152 образца сывороток невакцинированных серопозитивных коров из свежих эпизоотических очагов бруцеллеза были получены из коллекции Национального референтного центра ветеринарии МСХ РК. 151 образец крови был взят у ревакцинированных коров крестьянского хозяйства «Мереке» (Бухаржырауский район, Карагандинская область, РК), благополучного по бруцеллезу. Коровы были привиты в 2015 году в возрасте 5–6 месяцев подкожно полной дозой (8×10^{10} клеток) *B. abortus* 19 (Щелковский биокомбинат, Московская область, Россия), и в течение последующих трех лет ревакцинировались той же вакциной конъюнктивально в дозе 8×10^{9} клеток. 12 сывороток крови, полученные от не вакцинированных и серонегативных по комплексу традиционных реакций (РБП, РА и РСК) телок, были использованы в качестве негативного контроля.

Определение антигенности рекомбинантных белков в н-ИФА. Вкратце, лунки полистирольного планшета покрывали БНМ19, БНМ25 и / или БНМ31 в концентрации 1,0 мкг/мл в бикарбонатном буфере, pH 9,6. В 8 лунках, покрытых определенным белком, готовили разведения кроличьей антисыворотки против ЦК *B. abortus* 19 и / или сыворотки КРС в ФСБ с твином 20, начиная с разведения 1:100, и планшет выдерживали при 37 °C в течение 1 часа. Количество связанных антител определяли антивидовыми антителами против кроличьего (Jackson ImmunoResearch, West Grove, США) и / или бычьего иммуноглобулинов, меченных пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). В качестве титра кроличьих антител брали то разведение сыворотки, оптическая плотность (ОП) которой была в два или более раз выше, чем ОП неиммунной (отрицательной) сыворотки в разведении 1: 100. Предельное значение (*cutoff*) для КРС рассчитывали, используя среднюю ОП сывороток контрольных телок, и результаты считали положительными, если ОП лунки с исследуемой сывороткой (ОПис) было выше, по меньшей мере, в два раза средней ОП контрольных сывороток (ОПкс) в разведении 1: 100.

Постановка РБП. РБП (Антиген, Алматы, Казахстан) проводился согласно инструкции производителя.

Гель-электрофорез и вестерн блот анализ. БНМ *Brucella* индивидуально фракционировали с помощью электрофореза в 12 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, затем гель переносили на 0,45 мкм нитроцеллюлозную мембрану (Watman Nytran Supercharge Aldrich, Сент-Луис, США) и иммуноблот проводили классическим методом. После промывки и блокировки мембрану инкубировали в сыворотке крови коровы (№ 6), экспериментально инфицированной *B. abortus* 544, и / или в кроличьей антисыворотке против ЦК *B. abortus* 19. Специфические белковые полосы проявляли 4-хлор-1-нафтолом (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США).

Статистическая обработка результатов. Односторонний ANOVA был использован для статистического сравнения средних значений ОПис/ОПкс. Статистический анализ титров антител проводили по методике, описанной Т. Сайдулдином [8]. Результаты считались значимыми при уровне вероятности менее 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

БНМ19 *Brucella* заметно уступал другим использованным белкам по антигенности (реактивности) в кроличьей антисыворотке. Средние титры антисывороток, взятых на 14, 21, 35 и 45 дни против БНМ19, были значительно ниже (1: 980), чем титры БНМ25 (1: 1970) и БНМ31 (1: 1490) ($P<0,05$). Эти данные указывают, во-первых, на то, что изучаемые рекомбинантные белки распознаются кроличьей анти-ЦК *B. abortus* 19 сывороткой, а во-вторых, доказывают их экспрессию *E. coli* BL21 в нативном состоянии.

На рисунке приведены результаты сравнительного исследования реактивности БНМ19, БНМ25 и БНМ31 в сыворотке КРС, экспериментально зараженного *B. abortus* 544.

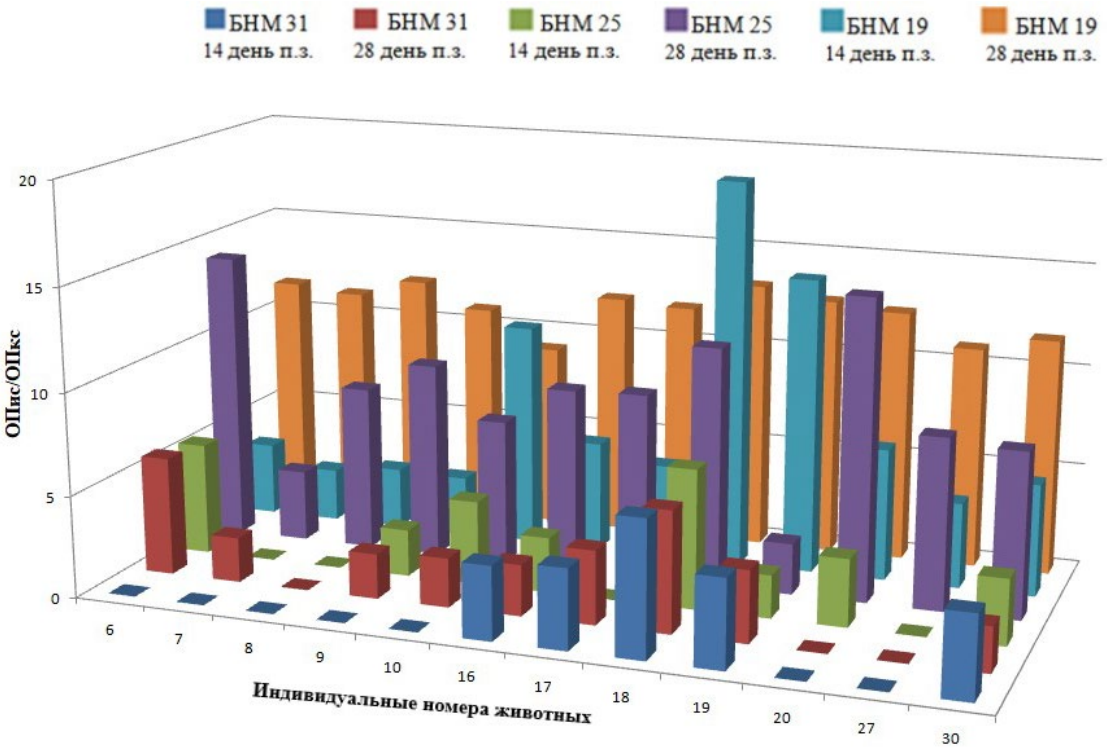


Рисунок – Антигенность БНМ *Brucella* в сыворотке крови экспериментально зараженных животных

Из рисунка видно, что н-ИФА/БНМ19 был более чувствительным, чем иммуноанализ, основанный на двух других рекомбинантных белках. Например, на 14 день после заражения (п.з.) у всех экспериментально инфицированных животных были обнаружены анти-БНМ19 антитела, в то время как н-ИФА/БНМ31 и н-ИФА/БНМ25 обнаруживали присутствие *Brucella*-специфических антител только у 42 % и 67 % животных, соответственно. Антитела против БНМ31 не были обнаружены у 3 животных (№№ 8, 20 и 27) как на 14, так и на 28 сутки п.з. Более того, судя по значениям ОПис/ОПкс, уровень образования антител против БНМ31 в течение этого периода не претерпел значительных изменений, тогда как гуморальный ответ на БМН19 и БМН25 стал более выраженным: 6,9±3,0 – 11,6±1,1 ($P<0,05$) и 2,9±1,8 – 8,8±3,6; $P<0,01$), соответственно.

Титры антител у зараженных животных к использованным белкам на 14 сутки п.з. находились на одном и том же уровне: БНМ19 – 1:650 (+36,6 %; -27,3 %), БНМ25 – 1:400 (+36,6 %; -27,3 %) и БНМ31 -1:420 (+18,9 %; -15,9 %). Однако на 28 день п.з. средний титр антител к БНМ19 был значительно выше (1:6400), чем у БМН25 и БМН31 (1:2 600 и 1:2 200, соответственно; $P\leq0,05$). Интересно отметить, что БМН19 был менее реактивен в кроличьей анти-ЦК *B. abortus* 19 сыворотке по сравнению с БМН25 и БМН31, однако он показал относительно высокую антигенность в ИФА при серологическом тестировании КРС, инфицированного *B. abortus* 544. Представление БМН19 иммунной системе организма живыми и инактивированными бруцеллами, видимо, несколько отличается по сравнению с экспозицией двух других белков, что привело к получению неоднозначных результатов при использовании сывороток кроликов, иммунизированных убитыми клетками, и КРС, экспериментально зараженного бруцеллезом. Ранее нами было описано ярко выраженное антигенное свойство белка *B. abortus и B. melitensis* с молекулярной массой 19кДа в вестерн-блот при использовании сыворотки крови коровы, спонтанно зараженной бруцеллезом [9]. Приведенные выше данные свидетельствуют о более высокой реактивности БНМ19 по сравнению с БНМ25 и БНМ31. Эти результаты согласуются с выводами J.J. Letesson et al. (1997) о более высокой антигенности минорных внешне-мембранных белков, включая БНМ19, по сравнению с мажорными белками [3]. По мнению авторов, данный феномен связан с сохранением антигенности БНМ19, поскольку он представляет собой не интегральный мембранный белок, а липопротеин и, следовательно, влияние мембранных компонентов на его антигенность является менее вероятным.

При изучении антигенности белков методом иммуноблота сыворотка коровы № 6, взятая на 28 сутки п.з. *B. abortus* 544, выявила только полосу БНМ19, тогда как антитела кролика, полученные против инактивированных ЦК *B. abortus* 19, связывались с БНМ25, БНМ31 и БНМ19, расположенными на уровнях 42 кДа, 48 кДа и 19 кДа, соответственно. Первые две полосы соответствовали молекулярным массам слитых белков БНМ25 и БНМ31, экспрессируемых штаммом-продуцентом *E. coli*. Хорошо известно, что многие молекулы могут стать более иммуногенными при денатурации. Обработка ЦК *Brucella* фенолом может изменить структуру его БНМ и обнажить новые эпитопы. Инъекция денатурированных антигенов, по всей вероятности, индуцирует антителообразование против детерминант, которые не доступны для иммунной системы на нативном антигене [10]. В организме зараженного животного серологически важные эпитопы БНМ25 и / или БНМ31, видимо, менее доступны для иммунной системы, чем детерминанты БНМ19. Кроме того, следует учесть и денатурирующие условия, имеющие место во время иммуноблота и приводящие к изменениям третичной структуры рекомбинантных белков. Наконец, антигенные и / или иммуногенные свойства белков патогена могут быть различными в условиях культивирования бруцелл *in vitro* и *in vivo* [2].

Антигенность БНМ бруцелл в сыворотках крови коров из благополучных и неблагополучных по бруцеллезу ферм показана в таблице.

Таблица – Реактивность белков бруцелл в н-ИФА при серологических исследованиях коров из ферм с различной эпизоотической ситуацией

Количество исследованных коров (гол.)	Эпизоотический статус ферм по бруцеллезу	Серологические тесты			
		РБП	н-ИФА на основе рекомбинантных белков:		
			БНМ19	БНМ25	БНМ31
		количество животных с положительными результатами, гол. (%)			
151	благополучный	96 (63,5)	92 (60,9)	64 (42,4)	93 (61,6)
152	неблагополучный	152 (100)	152 (100)	152 (100)	146 (96,7)

В образцах сыворотки крови коров, ревакцинированных *B. abortus* 19, антитела обнаруживались и через 10 месяцев после последней иммунизации у более чем половины скота (61–64 %) в РБП, н-ИФА/БНМ31 и н-ИФА/БНМ19 со средними титрами 1:210 (+3,5 %; -3,3 %) и 1:280 (+4,2 %; -4,0 %), соответственно. БНМ25 оказался менее антигенным, поскольку антитела к нему были обнаружены у 42 % КРС со средним титром 1:250 (+5,0 %; -4,8 %). Следует подчеркнуть, что сыворотка почти одной трети коров (28 %) не содержала антител, которые могли бы взаимодействовать, по крайней мере, с 1 из 3 рекомбинантных белков. Антитела к 1 и / или 2 из 3 использованных белков были обнаружены у 13 % и / или 28 % коров, соответственно. Между результатами н-ИФА/БНМ19-н-ИФА/БНМ31 была установлена прямая сильная корреляция с коэффициентом 0,70. Умеренная корреляция наблюдалась между н-ИФА/БНМ19-н-ИФА/БНМ25 (r = 0,38) и н-ИФА/БНМ31-н-ИФА/БНМ25 (r = 0,35).

У серопозитивных коров из неблагополучных ферм агглютинирующие антитела в РБП обнаруживались у всего исследованного поголовья. Результаты этого теста полностью подтверждались результатами н-ИФА/БНМ19 и н-ИФА/БНМ25 со средними титрами 1:280 и 1:370 (+ 2,1 %; -2,1 %), соответственно. Только 4 % РБП-позитивных животных не имели антитела, связывающиеся с БНМ31. Средний титр антител к этому белку составил 1:350 (+2,8 %; -2,7)%. Титры антител коров из ферм с различным эпизоотическим статусом не отличались друг от друга по показаниям н-ИФА/БНМ19, однако анти-БНМ25 и анти-БНМ19 антитела детектировались в более высоких разведениях сывороток крови коров из эпизоотического очага ($P<0,05$). БНМ19, как и БНМ25, показал высокую реактивность по отношению к антителам серопозитивных коров из эпизоотических очагов бруцеллеза, обеспечивая 100 % чувствительность к ИФА. Нельзя не отметить, что антитела, взаимодействующие с БНМ, также были обнаружены у более чем половины животных благополучного стада даже через 10 месяцев (время наблюдения) после ревакцинации *B. abortus* 19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

– Антитела к БНМ бруцелл вырабатываются КРС как зараженным бруцеллезом, так и привитым аттенуированной вакциной из штамма *B. abortus* 19;

– Раздельное использование БНМ в качестве антигена в н-ИФА снижает чувствительность анализа, что может быть связано с неузнаваемостью одного белка антителами, имеющими специфичность к другим белкам;

– Антиген, состоящий из комбинации БНМ19, БНМ25 и БНМ31, можно рекомендовать для использования в н-ИФА с целью достоверного выявления инфицированного КРС перед первой вакцинацией.

Работа проводилась в рамках научно-технической программы № BR05236307 «Создание новых продуктов и инновационных биотехнологий для сельского хозяйства и ветеринарии» на 2018–2020 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bonfini B., Chiarenza G., Paci V., Sacchini F., Salini R., Vesco G., Villari S., Zilli K. and Tittarelli M. Cross reactivity in serological tests for brucellosis: a comparison of immune response of *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* O:9 vs *Brucella spp*. // Veterinaria Italiana. – 2018. – Vol.54(2). – P. 107–114,
2. Navarro-Soto M., Morales-Loredo A., Álvarez-Ojeda G., Ramírez-Pfeiffer C., Tamez-Guerra P. and Gomez-Flores R. Recombinant proteins as antigens in serological diagnosis of brucellosis // In: Baddour M.M. (editor), Updates on Brucellosis. Rijeka, Croatia: IntechOpen. – 2015. – P. 161–169.
3. Letesson J., Tibor A., van Eynde G., Wansard V., Weynants V. et al. Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme linked immunosorbent assay // Clinical and Diagnostic Laboratory. – 1997. – Vol.4(5). – P.556–564.
4. Ahmed I., Khairani-Bejo S., Hassan L., Bahaman A. Serological diagnostic potential of outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay // BMC Veterinary Research. – 2015. – 11: 275.
5. Bulashev A., Akibekov O., Suranshiyev Zh., Ingirbay B. and Eskendirova S. Serodiagnostic potential of *Brucella* outer membrane and periplasmic proteins // Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. – 2019. – Vol. 43. – P.486–493.
6. Булашев А.К., Турсунов К.Т., Каирова Ж.К., Сыздыкова А. Получение штамма продуцента рекомбинантного БВМ19 *Brucella abortus* и изучение его антигенности // Вестник КазАТУ им. С. Сейфуллина. – 2018. – № 3(98). – С.117–128.
7. Bulashev A., Jakubowski T., Tursunov K., Kiyan V., Zhumalin A. Immunogenicity and antigenicity of *Brucella* outer membrane proteins // Veterinarija ir Zootechnika. -2018. – Vol.76(98). – P.17–24.
8. Сайдулдин Т.С. Статистический анализ результатов серологических реакций // Ж. Ветеринария. – 1981. – № 7. – С. 62–66.
9. Булашев А.К., Сураншиев Ж.А., Жумалин А.Х., Турсунов К.А. Антигенность белков внешней мембраны бруцелл // Ж. Биотехнология. Теория и практика. – 2016. – № 1. – С. 20–27.
10. Greenfield E.A., DeCaprio J. and Brahmandam M. Making weak antigens strong: Modifying protein antigens by denaturation, Cold Spring Harbor Protocols. doi: 10.1101/pdb.prot099960, 2018.

УДК 636.52/.58:57.089.36

ПОЛУЧЕНИЕ И КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЗАРОДЫШЕВЫХ И ПОЛОВЫХ КЛЕТОК СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ В РАМКАХ СОЗДАНИЯ КРИОБАНКОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Н.Ю. Герман, Б.С. Иолчиев, Н.А. Волкова

ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы, Московская область, Россия

Создание криобанков биологического материала сельскохозяйственной птицы является одной из приоритетных задач современных агропромышленных технологий, направленных на сохранение, поддержание и восстановление генофонда ценных пород и линий. Благодаря определенным продуктивным и адаптационным качествам многие породы занимают прочные позиции. Однако в последние годы в мировой практике отмечается тенденция к снижению общего количества пород. Криоконсервация генетических ресурсов позволяет сохранить ценные генотипы. Основным генетическим материалом, используемым в программах по сохранению генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы, является сперма самцов, что связано с широким распространением метода искусственного осеменения в птицеводстве. Половые клетки самцов (спермии) могут быть использованы не только для поддержания сохраняемых популяций птицы, но и для воссоздания пород и линий путем поглотительного скрещивания. Однако в полученном потомстве определенный процент генов будет сохраняться от материнской родоначальной популяции, в связи с чем для восстановления генома породы необходимо получение более пяти генераций потомков. К настоящему времени накоплен значительный материал, касающийся различных аспектов криоконсервации спермы сельскохозяйственной птицы. Современные методы криоконсервации спермы обеспечивают в целом удовлетворительное получение потомства, однако существует проблема, связанная с низким выходом полноценных клеток: после цикла замораживание–оттаивание удается сохранить не более 50 % функционально полноценных спермиев. Применяемые в настоящее время защитные среды позволяют сохранять сперму птиц in vitro при положительных температурах и в глубокозамороженном состоянии без утраты основной функции сперматозоидов – оплодотворяющей способности. Однако поиск эффективных криозащитных сред продолжается, так как до сих пор не удается успешно криоконсервировать сперму некоторых видов птиц. Актуальным также является и разработка эффективных методов получения семени.

Нами были отработаны и оптимизированы методические приемы по получению семени от самцов разных видов сельскохозяйственной птицы. При использовании базового метода (массаж по Барроусу и Квинну) объем полученного эякулята семени варьировал у разных видов птицы в зависимости от индивидуальных особенностей и составил в среднем у петухов – 1,2±0,05 мл, у селезней – 1,1±0,05 мл, у гусаков и индюков – 1,5 мл.

Модификация данного подхода по получению спермы посредством использования специального станка для фиксации птицы позволила оптимизировать данный процесс за счет возможности проведения необходимых манипуляций одним оператором и снижения стрессовых ситуаций для самцов. Особенно актуальным это является для крупной птицы – гусаков, селезней и индюков. Модифицированный метод позволил упростить процедуру взятия семени. При этом не было установлено снижения качества получаемого семени. Наоборот, у большинства самцов отмечалось незначительное увеличение объема получаемого эякулята семени по сравнению с использованием базового метода на 15–38 %, что позволяет рекомендовать использование модифицированного метода для получения спермы наряду с базовым.

Использование высасывающей трубки со спермопремником, заполненным разбавителем (380С), для сбора спермы у крупной птицы – гусаков и индюков позволило значительно улучшить качество получаемого семени: подвижность спермиев в полученном эякуляте возрастала на 5–8 %.

Установлено влияние на качество нативного семени самцов птиц ряда биотических и абиотических факторов. Однофакторный дисперсионный анализ показал зависимость объема получаемого семени от индивидуальных особенностей самцов на уровне 33 % ($P<0,05$) для петухов, 30 % – для гусаков и 31 % – для индюков. На основании дисперсионного анализа также была установлена зависимость ряда показателей качества семени от индивидуальных особенностей самцов. Коэффициент вариации по содержанию подвижных сперматозоидов в эякуляте петухов, гусаков, селезней и индюков составил соответственно 25, 25, 18 и 23 %.

По показателям процента живых сперматозоидов и частоте встречаемости анормальных спермиев данный показатель достигал соответственно 10, 15, 17, 19 % и 18, 12, 17, 21 %. Нарушения морфологии сперматозоидов отмечались в разных сегментах – головке, шейке, жгутике. В исследованных образцах семени самцов независимо от вида птицы наибольший процент нарушений в морфологии спермиев был установлен в области жгутика.

Цикл замораживание-оттаивание отрицательно влиял не только на активность, но и на долю живых сперматозоидов. У петухов этот показатель снизился с 89,2 до 47,6 %, у гусаков – с 76,5 до 38,2 %, у индюков – с 87,2 до 48,5 %. В результате замораживания-оттаивания увеличивалась доля сперматозоидов с аномальной морфологией. Наблюдалось изменение в частоте встречаемости аномалий в отдельных сегментах, увеличилось количество сперматозоидов с патологией жгутика.

В качестве альтернативных подходов рассматривается использование в качестве генетического материала для криоконсервации предшественников половых клеток – примордиальных зародышевых клеток, присутствующих в эмбрионах птиц на ранних стадиях их развития. Использование данного типа клеток в программах по сохранению генетических ресурсов предполагает получение химерных особей по линии как мужских, так и женских половых клеток. При этом зародышевые клетки, полученные от генетических самцов, при их трансплантации в эмбрионы, развивающиеся по пути развития женской особи, могут дифференцироваться в полноценные женские половые клетки – яйцеклетки и, наоборот, донорские зародышевые клетки генетических самок в эмбрионах–реципиентах мужского пола могут развиться до функционально нормальных сперматозоидов. Благодаря этому свойству примордиальных зародышевых клеток отпадает необходимость идентификации пола у отдельных особей как на этапе сбора генетического материала, так и на этапе воссоздания породы при введении донорских клеток.

В отличие от млекопитающих у птиц эмбрионы ввиду их развития вне материнского организма являются доступным материалом для проведения различных манипуляций с ними. Эта особенность птиц открывает широкие возможности для получения соматических химер различных типов. Данный подход также может быть использован в программах по воссозданию пород.

Нами были оптимизированы методические подходы по получению и криоконсервации примордиальных зародышевых клеток разных видов сельскохозяйственной птицы, в частности, уток, гусей и индеек. На основании гистологических исследований развития гонад эмбрионов данных видов птиц было установлено, что оптимальным возрастным периодом для получения культуры примордиальных зародышевых клеток является возраст эмбрионов от 6 до 7 дней. Культура эмбриональных клеток, полученная из ранних эмбрионов, состоит из разных типов клеток. Разделение эмбриональных клеток разных типов с учетом их различной способности к адгезии позволило получить культуру примордиальных зародышевых клеток, максимально очищенную от других типов клеток. Был оптимизирован состав криозащитной среды для криоконсервации зародышевых клеток. Высокая жизнеспособность данного типа клеток после криоконсервации отмечалась при использовании криозащитной среды, включающей 75 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 15 % среды ДМЕМ и 10 % криопротектора ДМСО.

Таким образом, возможность криоконсервации зародышевых и половых клеток птицы в условиях криобанков открывают широкие возможности для использования данных типов клеток в птицеводстве в программах по сохранению ценных пород и линий.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РНФ, проект № 16–16–04104.

УДК 636.52/.58:57.089.36

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПО ВВЕДЕНИЮ СИСТЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ И СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

А.Н. Ветох, Т.О. Котова, Л.А. Волкова, Е.К. Томгорова, Н.А. Волкова

ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы, Московская область, Россия

Генетическая модификация сельскохозяйственных животных, в том числе птицы, является одним из приоритетных направлений современной биотехнологии и агротехнологий, направленных на решение широкого спектра фундаментальных и прикладных задач. Данный подход уже давно используется в качестве одного из приемов улучшения генотипа существующих пород для придания им устойчивости к различным возбудителям вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций, повышения эффективности усвоения корма, получения рекомбинантных белков с яйцом. На сегодняшний день с использованием конститутивных и тканеспецифических промоторов получены генетически модифицированные птицы, экспрессирующие репортеные гены LacZ и GFP, бактериальный ген β-лактамазы, интерферон человека α2b β-интерферон человека, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, моноклональные антитела, антагонист рецептора β-интерлейкина и гормон роста человека (1–5). Однако применявшиеся технологии модификации генома для животных и птицы до 2012 года носили высоко неспецифичный характер, за исключением модельных научных систем. С 2012 года технология CRISPR/Cas9 последовательно вытесняет прочие технологии промышленного трангенеза. Имеется ряд работ по успешному использованию данной технологии для модификации клеток млекопитающих с последующим получением особей с заданными свойствами. Так, используя систему CRISPR/Cas9, Park K.E. с соавт. выполнили редактирование гена NANOS2 в эмбрионах свиней (6). Было показано, что свиньи с диаллельным нокаутом NANOS2 характеризуются специфическим для самцов отсутствием генеративных клеток, в то время как другие аспекты тестикулярного развития у них в норме. Самцы с одноаллельным нокаутом и самки с нокаутом аллелей на обеих гомологичных хромосомах оказались плодовиты, что открывает возможности для ведения генетически-модифицированной линии и получения необходимого количества стерильных самцов-реципиентов посредством простого скрещивания гомозиготных по мутантному аллелю самок и гетерозиготных самцов. Однако особенности эмбрионального развития птиц не позволяют использовать для генноинженерных манипуляций, как классический метод микроинъекции, так и соматическое клонирование, что требует поиска альтернативных подходов.

Исходя из вышеизложенного, нами были оптимизированы методические подходы по редактированию эмбриональных клеток кур и перепелов посредством (а) генетической модификации эмбрионов in vivo; (б) генетической трансформации ПЗК в культуре in vitro с последующей их трансплантацией эмбрионам-реципиентам.

Для генетической модификации эмбрионов кур in vivo использовали лентивирусный вектор. Вирусные вектора, полученные на основе рекомбинантных лентивирусов, характеризуются, как правило, высокой эффективностью интеграции в геном клетки-хозяина, что делает использование данных векторных систем оптимальным для трансформации эмбриональных клеток. Вирусный препарат вводили непосредственно в зародышевый диск на 24 часу инкубации яиц. Ввиду введения вирусного препарата в многоклеточный эмбрион, полученные после генно-инженерных манипуляций особи являлись мозаиками. При этом важное значение имеет эффективность трансформации репродуктивных органов (яичники, семенники), т. к. модифицированные половые клетки в последующем могут быть использованы для получения потомства с внесенными признаками. В наших исследованиях результативная трансформация репродуктивных органов отмечалась у 61 % полученных особей.

Эффективность модификации половых клеток может быть повышена посредством целенаправленной трансфекции их предшественников – примордиальных зародышевых клеток. Данная технология предполагает выделение данного типа клеток из эмбрионов, их трансфекцию в культуре in vitro и последующую трансплантацию эмбрионам-реципиентам. После трансплантации донорские примордиальные зародышевые клетки в процессе развития эмбриона дифференцируются в мужские и женские половые клетки. В рамках оптимизации отдельных этапов данной технологии была

проведена серия экспериментов по выделению, генетической трансформации и трансплантации донорских ПЗК кур и перепелов. Оптимальные результаты были получены при обработке эмбрионов 0,05 % раствором трипсина в течение 5 минут: полученная суспензия состояла, преимущественно, из разобщенных клеток, количество нежизнеспособных клеток не превышало 5 %. Полученная клеточная суспензия состояла из разных типов эмбриональных клеток. Для очистки примордиальных зародышевых клеток от других типов клеток проводили их разделение по адгезии. Трансформацию полученной культуры осуществляли с использованием различных методов: липофекции, электропорации и вирусной трансдукции. При использовании электропорации эффективность трансформации клеток-мишеней достигала 12 %. Результативность трансформации примордиальных зародышевых клеток липофильным агентом не превышала 1 %. Оптимизация по количеству ДНК и трансфекционного агента не способствовала повышению эффективности данного показателя. Трансформированные клетки были введены в дорсальную аорту 2,5 – дневных эмбрионов-реципиентов. Перед введением донорских ПЗК эмбрионы-реципиенты были обработаны бусульфаном с целью удаления собственных (эндогенных) ПЗК. Оптимальная концентрация данного препарата для элиминации эндогенных ПЗК составила 80 мкг/эмбрион. Наличие рекомбинантной ДНК в половых клетках реципиентов было установлено как у эмбрионов, так и полученных особей.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18–29–07079

ЛИТЕРАТУРА

Mozdziak P.E., Borwornpinyo S., McCoy D.W., Petitte J.N. Development of transgenic chickens expressing bacterial betagalactosidase // Dev. Dyn. V. 2003. 226: 439–445.

Byun S.J., Kim S.W., Kim K.W. et al. Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011. 75(4): 646–649.

Lillico S.G., Sherman M.J., McGrew C.D. et al. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens // PNAS. 2007. 104 (6): 1771–1776.

Kwon S.C., Choi J.W., Jang H.J. et al. Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white // Biology of Reproduction. 2010. 82:1057–1064.

Kodama D., Nishimiya D., Nishijima K. et al. Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system // J Biosci Bioeng. 2012. 113 (2): 146–153.

Park K. – E., Kaucher A.V., Powell A. et al. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. // Scientific Reports, 2017, 7:40176

УДК 579.67:638.165

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ МЁДА НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МОЛОЧНО-КИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Л.Р. Гайфуллина, Е.С. Салтыкова, М.Д. Каскинова, А.В. Поскряков, А.Г. Николенко

Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, Россия

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении многих веков мед использовался человеком в качестве ценного пищевого продукта с лечебными свойствами. Однако недоказанность или малая изученность механизмов действия обуславливает ограниченное применение меда в практике традиционной медицины. Совокупность современных исследований меда позволяют определять его как функциональный продукт широким спектром биологической активности, обусловленной его физико-химическими свойствами. В качестве одного из положительных эффектов меда выделяют его пребиотическую активность. Лабораторные исследования in vitro и in vivo демонстрируют стимулирующее действие меда на молочнокислые бактерии, населяющие нижние отделы пищеварительного тракта человека и животных, и используемые при производстве йогуртов [1]. Пребиотические свойства меда обусловлены входящими в его состав олигосахаридами с низкой степенью полимеризации, являющимися результатом активности α-D-глюкозидаз медоносных пчел [2]. Качественный и количественный углеводный состав меда является переменным и зависит от ботаничекского и географического происхождения меда. По сути, мед является перенасыщенный раствором сахара с примерно 15–20 % воды, общее содержание сахаров колеблется от 60 до 85 %. Помимо основных сахаров, фруктозы и глюкозы, в различных медах обнаружено около 25 различных олигосахаридов. К настоящему времени проведены исследования пребиотической активности медов австралийского, новозеландского, индийского, иорданского, североамериканского происхождения [3]. Многочисленные сорта отечественного меда остаются практически неизученными в данном направлении. Целью настоящей работы являлось оценить пребиотическую активность медов различного ботанического происхождения, собранных с различных регионов Российской федерации, в отношении коммерческих штаммов молочно-кислых бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения ботанического происхождения меда проводили мелиссопалинологический анализ [4, 5], в результате которого были отобраны монофлерные меда с пыльцой доминирующего нектароноса более 50 % (для каштана – более 90 %), соответствующие требованиям ГОСТ по физико-химическим параметрам: водности, содержанию оксиметилфурфурола (ОМФ), пролина и диастазной активности (Таблица 1).

Таблица 1. Физико-химические показатели исследуемых медов

№	Доминирующий нектаронос	Содержание воды, %	Содержание ОМФ, мг/кг	Содержание пролина, мг/кг	pH	Диастазное число, ед. Готе
1	*Melilotis sp.*	18,2	7,2	281,08±25,30	4,0	17,28±2,73
2	*Trifolium sp.*	17,5	9,8	545,67±49,11	4,2	28,34±1,74
3	*Castanea sativa*	18,4	12,3	567,57±51,08	3,8	27,30±1,56
4	*Lotus corniculatus*	17,5	5,5	415,00±37,35	4,4	22,30±0,64
5	*Salvia sp.*	18,6	6,4	294,65±26,52	4,2	22,34±1,92
6	*Fagopyrum esculentum*	17,8	17,6	533,93±0,42	3,8	34,30±2,55
7	*Archangelica officinalis*	17,6	15,4	671,69±60,45	3,9	35,65±2,79
8	*Tilia cordata*	18,0	4,2	308,39±27,76	4,2	19,41±0,13
Требования ГОСТ		≤ 20	≤ 25	180 ≥	≤5	8 ≥

Используемые в исследовании культуры *Lactobacillus fermentum, L. acidophilus* и *L. plantarum* были выделены из лиофилизированной закваски Биолакт (ФГУП «Экспериментальная биофабрика») и культивировались на MRS-среде при 37 °C. По 0,5 мл 24-часовых культур переносили в 50 мл стерильный MRS-бульон, содержащий в качестве углевода 2 % глюкозы, либо инулина, либо мёда. Культуры инкубировали при 37 °C, спустя 48 часов контролировали рост путем измерения оптической плотности при длине волны 610 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным результатам, инулин, коммерческий пребиотик, используемый нами в сравнительных целях, не показал ожидаемой ростстимулирующей активности на культуры лактобактерий (Рис. 1). Аналогичные данные были получены ранее при анализе австралийских медов [6]. Меда 1–5 и 8 стимулировали рост всех трех культур лактобактерий Максимальный эффект на *L. fermentum* и *L. acidophilus* показал мед, собранный с шалфея (№ 5), а на *L. plantarum* – мед, собранный с каштана (№ 3). Примечательно, что четыре из шести медов, обладающих пребиотической активностью, собраны с растений семейства *Fabaceae*, что дает основание полагать о наличии схожих олигосахаров в нектаре представителей данного таксона. Так, было показано, что мед, собранный с люцерны, содержит 5,5 % олигосахаридов, усиливает рост *Streptococcus thermophilus* и *Bifidobacterium bifidum*, а также стимулирует производство молочной кислоты *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *L. acidophilus* [7]. Каштановый и акациевый меда повышают ферментативную активность и количество жизнеспособных клеток *B. lactis* и *B. longum* в соевом молоке [8].

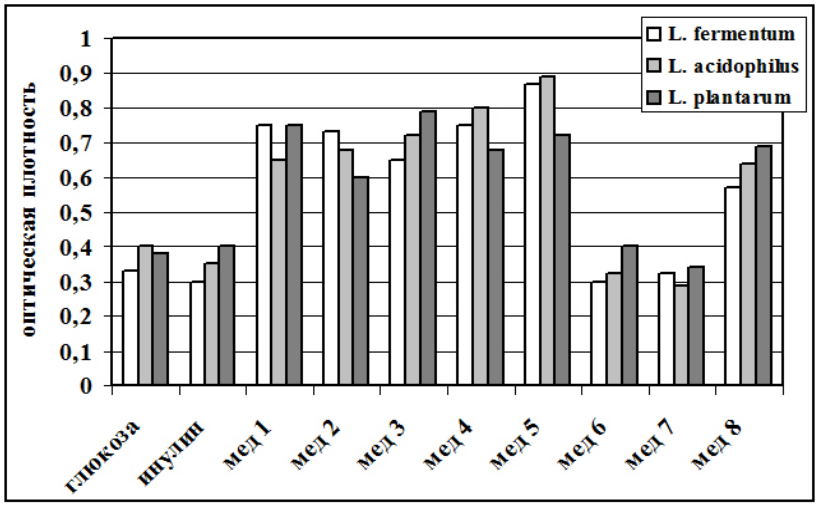


Рисунок 1. Рост L. fermentum, L. acidophilus и L. plantarum в MRS-среде с различными источниками углеводов

По литературным данным, мед, собранный с *Salvia apiana*, содержащий около 4 % олигосахаридов, стимулирует рост и активность B. longum, B. adolescentis, B. breve, B. bifidum, and B. infanti, населяющих кишечник человека и использующихся в производстве ферментированных молочных продуктов [2, 7]. Исследованный нами шалфейный мед (№ 5) содержал пыльцу трех видов *Salvia sp.: S. verticillata, S. stepposa и S. pratensis* и показал наиболее высокую пребиотическую активность в отношении *L. fermentum* и *L. acidophilus*, усилив рост культур в 2,6 и 2,2 раза соответственно.

Липовый мед (№ 8) проявил в целом невысыокую ростстимулирующую активность на культуры лактобактерий, а гречишный и дягилевый меда (№ 6 и 7) вовсе не обладали таковой. Полученные результаты могут быть обусловлены повышенной антибактериальной активностью данных медов. Так, меда, собранные с *Fagopyrum sp*., ингибировали рост ряда патогенных грам-пложительных и грам-отрицательных бактерий [9]. Авторы отмечают, что антимикробная активность темных сортов меда значительно выше, чем у светлых, и связана с более высоким содержанием перекиси водорода и фенольных соединений. Кроме того, гречишный и дягилевый меда отличаются высоким содержанием белка и наличием в белковом спектре выраженных зон, соответствующих антимикробным пептидам. Что касается липового меда, то отдельные его образцы также подавляют рост отдельных микроорганизмов (неопубликованные данные).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ростстимулирующая активность в отношении лактобактерий зависит от ботанического происхождения меда. Согласно литературным и представленным здесь данным, поиск медов с пребиотическими свойствами целесообразно осуществлять среди светлых сортов с невысокой антибактериальной активностью, собранных с растений-нектароносов семейства *Fabaceae* и *Lamiaceae*. Данные меда могут быть рекомендованы для улучшения состояния желудочно-кишечного тракта и производства молочно-кислых продуктов.

Работа поддержана грантом РФФИ 19–54–70002 е-Азия_т и часть ее выполнена в рамках госзадания № 01201350736.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shamala T, Shri-Jyothi Y, Saibaba P. Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under in vitro and in vivo conditions // Letters in Applied Microbiology. – 2000. – V. 30. № 6. – P. 453–455.
2. Shin HS, Ustunol Z. Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: An in vitro comparison // Journal of Food Research International. – 2005. – V. 38. – P. 721–728.
3. Gaifullina L.R., Saltykova E.S., Nikolenko A.G. Honey as a synbiotic food product // Biomics. – 2017. – V. 9. – № 1. – P. 12–23.
4. Maurizio A., Louveaux J., Vorwohl G. Methods of melissopalynology // Bee World. – 1970. – V. 51. – № 3. P. 125–138.
5. Карпович И.В., Дребезгина Е.С., Еловикова Е.Н., Леготкина Г.И., Зубова Е.Н., Кузяев Р.З., Хисматуллин Р.Г. Атлас пыльцевых зерен. – Екатеринбург: Уральский рабочий, 2015. – 320 с.
6. Conway P.L., Stern R., Tran L. The Value-adding Potential of Prebiotic Components of Australian Honey // RIRDC Publication No. 09/0179. – 2010. – 30 p.
7. Popa D., Ustunol Z. Influence of sucrose, high fructose corn syrup and honey from different floral sources on growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria // International Journal of Dairy Technology bifidobacteria. – 2011. – V. 64. – № 2. – P. 247–253.
8. Slacanac V., Lucan M., Hardi J., Krstanovic V., Koceva Komlenic D. Fermentation of Honey-Sweetened Soymilk with Bifidobacterium lactis Bb-12 and Bifidobacterium longum Bb-46: Fermentation Activity of Bifidobacteria and in vitro Antagonistic Effect against Listeria monocytogenes FSL N1–017 Czech // Journal of Food Science. – 2012. – V. 30, – № 4. – P. 321–329.
9. Peter J. Taormina a, Brendan A. Niemira b, Larry R. Beuchat Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power // International Journal of Food Microbiology – 2001. – V. 69. – P. 217–225.

УДК 640

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ФЕРМЕНТНОГО РАСТВОРА НА ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS*)

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

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

В связи с ведущей ролью подсолнечника *(Helián*th*us ánnuus)*, как одного из важнейших масличных культур не только в России, но и во всем мире, актуальным становится изучение методов, увеличивающих продуктивность данного растения (Якупова и др., 2018). Несмотря на большие успехи, достигнутые в области селекции, потребность в новых высокопродуктивных сортах постоянно растет и здесь немаловажную роль играет использование методов культуры клеток и тканей. Получение растений из протопластов является незаменимой технологией для генно-инженерных манипуляций (Мирошниченко и др., 2019). Оценка различных факторов, влияющих на эффективность выделения протопластов, включая генотипы, типы изолированных тканей (молодые листья и гипокотили), подбор концентрации целлюлазы, показали, что качество и качество выделения протопластов варьирует в зависимости от этих показателей, и их необходимо индивидуально оптимизировать (Kativat et al., 2012).

Цель работы – изучение влияния состава ферментного раствора на выделение протопластов подсолнечника. Получение протопластов проводили в три этапа: 1) ферментация; 2) выделение протопластов из клеточных стенок; 3) отделение протопластов от клеточных осколков.

Объектом исследований служили растения подсолнечника (*Helián*th*us ánnuus)* сорта Казачий. Для выделения протопластов подсолнечника отбирали различные экспланты (листья, семядоля, гипокотиль, эпикотиль) из 14-и дневных пробирочных растений подсолнечника (Рис. 1).

Одним из важных моментов выделения протопластов, является оптимизация концентрации ферментов, разрушающих клеточную стенку. Ферментную обработку эксплантов с целью получения протопластов проводили коммерческими энзимными препаратами Cellulase 1,8U/mg (SERVA) и Macerozyme R-10 0,71 U/mg (SERVA), количественное соотношение которых варьировало в вариантах опыта. Для защиты клеток от лизиса, после разрушения ферментами клеточной стенки, в качестве осмостабилизатора добавили сахарозу. В промывочном растворе использовали следующие соли: $CaCl_2$ x $2H_2O$, NaCl, KCl, pH раствора: 5,6–5,7.

Ферментный раствор готовили непосредственно перед опытом и стерилизовали в условиях ламинарного бокса с помощью бактериальных фильтров с размером пор 0.2 мкм. После инкубации выделенные протопласты очищали от ферментного раствора и от оставшихся непереваренных кусочков тканей фильтрацией и далее центрифугировали. Промывали протопласты последующим двухкратным центрифугированием в промывочном растворе, каждый раз заменяя надосадочную жидкость свежей порцией раствора. После промывки протопласты осаждались.

Оценивали эффективность выделения протопластов в зависимости от концентрации ферментов, подсчитывая количество выделенных протопластов с помощью камеры Горяева под микроскопом Primo Star Carl Zeiss (Табл. 1).

Таблица 1. Выход протопластов из листьев подсолнечника в зависимости от концентрации ферментов ($\times 10^6$, клеток/мл)

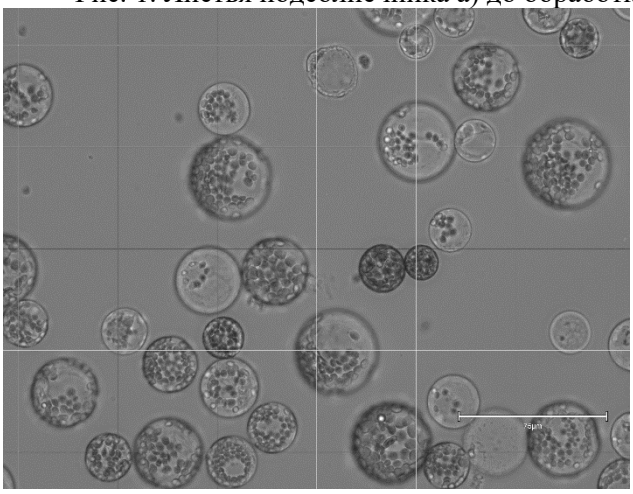
Macerozyme, % / Cellulase, %	0,1	0,5	1
0,1	-	0.40	0.36
0,5	0.25	**1.22**	0.24
1	0.62	0.54	0.15

Оптимизация концентрации ферментов показала, что одновременное добавление 0,5 % Cellulase и 0,5 % Macerozyme наиболее эффективно, а увеличение концентрации Cellulase и Macerozyme свыше 0,5 %, приводит к резкому снижению выхода жизнеспособных протопластов. (Рис. 2)


(а)


(б)

Рис. 1. Листья подсолнечника а) до обработки ферментами; б) после ферментации


(а)

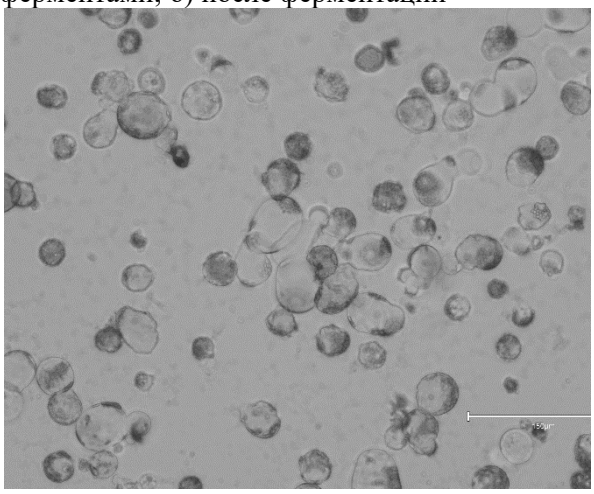

(б)

Рис. 2. Изолированные протопласты подсолнечника а) сразу после выделения б) на 3-й день после выделения, можно наблюдать первое деление. Бар = 150 мкм

Таким образом, в результате выполнения данной работы было выявлено оптимальное количество ферментов, для максимального выхода протопластов подсолнечника сорта Казачий.

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

ЛИТЕРАТУРА

Kativat C, Poolsawat O., Tantasawat P. (2012) Optimization of factors for efficient isolation of protoplasts in sunflower (Helianthus annuus L.) AJCS 6(6):1004–1010

Мирошниченко, Д.Н., Шульга, О.А., Тимербаев, В.Р., & Долгов, С.В. (2019). Достижения, проблемы и перспективы получения нетрансгенных растений с отредактированным геномом. *Биотехнология, 35*(1), 3–26.

Якупова, А.Б., Мусин, Х.Г., & Кулуев, Б.Р. (2018). Генетическая трансформация подсолнечника с использованием agrobacterium rhizogenes с целью получения бородатых корней. In Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды (pp. 20–24).

УДК 574.55

НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ DAPHNIA MAGNA ПРИ ИСКУССТВЕННОЙ КУЛЬТИВАЦИИ В ЧИСТОЙ И СМЕШАННОЙ ВОДОРОСЛЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

Н.И. Кочетков, О.Г. Бугаев, П.Ю. Татаренко, А.В. Горбунов

Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия

Daphnia magna распространённый организм пресноводного зоопланктона, используемый как для лабораторных исследований, так и для кормления молоди рыб в аквакультуре [3]. Отличаясь высокой адаптивностью, данный вид обладает способностью быстро накапливать биомассу и может составлять до 90 % от веса зоопланктона в прудах и озерах мезасапробного типа [6]. При массовом культивировании дафнии используют различные водоросли, так как по способу питания она является фильтратом. Дафния манга может поглощать пищевые частицы диаматом от 3–4 мкм до 100–150 мкм [2]. При кормлении различными культурами фитопланктона может значительно варьироваться: скорость роста, плодовитость и динамика накопления биомассы [5]. В этом свете интерес предоставляет сравнения динамики сроста дафния магна, при кормлении в монокультуре и поликультуре. Для данных целей наилучшее всего подходят такие виды водорослей как: сценодесмус, гематококус.

В качестве емкости для культивации дафнии использовались пластиковые бассейны емкостью 1000 л, наполнявшиеся отстоянной водопроводной водой и добавлялись макро и микроэлементы по составу среды Успенского [1]. В баки вносилась алькологически чистые культуры водорослей: монокультура – *Scenedesmus quadricauda*; поликультура – *Scenedesmus quadricauda, Haematococcus pluvialis*. Баки накрывались светлым нетканым материалом, для предотвращения попадания заносных культур. Культивация водорослей проходила в течении пяти дней, после чего в субстрат вносилась дафния. На пятый день плотность культуры водорослей составляла в баках с моно- и поликультурой соответственно составляло: $3.2*10^3$ и $4.5*10^3$ шт./мл. Для формирования партеногенетической культуры дафнии в каждый бак помещали 1000 особей. После чего культивация длилась 14 дней, на последний день, после тщательного перемешивания, производился подсчет биомассы и оценка морфологии.

По результатам эксперимента было выявлено существенное различие в биомассе между моно- и поликультурой. На 7 день опытов производился первый замер биомассы дафнии, который показал, что в чистой культуре *S. quadricauda* 1.2 г./м^3, в смешанной культуре 1.4 г./м^3. При замерах численности дафнии на 10 день ее количество составляло соответственно для моно и поликльтуры: 3.2 г./м^3, 8.6 г./м^3. Количество биомассы на 14 в монокультуре сценодемуса составила 5.2 г./м^3, в поликультуре на сценодемусе и гематококусе 10,34 г./м^3. Морфология особей дафнии отличалась в различных культурах. Так при культивировании в смешанной культуре размер особей достигали 6 мм, в то время как в монокультуре их размер не превышал 4,5 мм. Дафния в смешанной культуре отличалась более выпуклым карапаксом, меньшей длинной антенн и выраженным темно-красным цветом. Культура, питающаяся только сценодесмусом была имела серо-зеленый оттенок, выпеклось карапакса была выражена меньше, а длинна антенн была схожей дафний из поликультуры. Более чем двухкратное биомассы дафнии в поликультуре водорослей может быть объяснено с двух основных гипотез. Более высокой питательной ценностью клеток гематококуса и лучше посещаемостью за счет более мелких размеров [4]. Ценодии *S. quadricauda*, обладая большими размерами и имея каудальные выросты, поедались дафнией хуже. Вторая гипотеза, заключатся в стимуляции размножения дафнии биологически активными веществами, содержащимися в клетках *H. pluvialis*, в момент формирования вегетативной клетки.

По итогам исследования выявлено, что использования поликультуры водорослей для выращивания дафнии магна более обоснованно, так как дает больший выход биомассы (за 14 дней 10,34 г./м^3), по сравнению с монокультурой (за 14 дней 5.2 г./м^3). Лучший рост культуры дафнии обоснован морфологическими особенностями водорослей *H. pluvialis* и более высокой его питательной ценностью. Для объяснения результатов было выдвинуто две гипотезы, наиболее вероятная из которых вторая. Однако авторы предполагают, что результат эксперимента подтверждает обе из них.

ЛИТЕРАТУРА

Лукьянов В.А., Стифеев А.И., Горбунова С.Ю. Научно обоснованное культивирование микроводорослей // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – №. 9.

Давтян М.С. Плодовитость и чувствительность дафний к модельным токсикантам при биотестировании в искусственной культивационной среде: дис. – Сибирский федеральный университет, 2019.

Тарасенко О. Выращивание живого корма в лабораторных условиях // 55 Р 64. – 2013. – С. 31.

Чермашенцева Э.В. Воздействие биомассы токсичных цианобактерий на daphnia magna straus // Медико-биологические аспекты химической безопасности. – 2018. – С. 93–94.

Доненов Б.К. и др. Культивирование промышленно важных одноклеточных культур на базе альтернативных ресурсов.

Glebova I.A. et al. Investigation of the Presence of Mutagens in the Coastal Part of Lake Senezh near the Highway //Ekoloji. – 2019. – Т. 28. – №. 107. – С. 385–390.

УДК 602.6 : 635.054

ЭФФЕКТИВНЫЙ И НЕТОКСИЧНЫЙ СПОСОБ ЭКСТРАКЦИИ СУММАРНОЙ ДНК ИЗ ХВОИ *PINUS SYLVESTRIS* L.

М.Ю. Петюренко, И.И. Камалова, А.П. Сердюкова

ВНИИЛГИСбиотех, Воронеж, Россия

Геномные исследования хвойных древесных растений с использованием молекулярно-генетических маркёров с успехом используют для целей генетической идентификации и изучения популяционно-генетической структуры. Среди них особое место занимают высокополиморфные микросателлитные локусы. Однако для проведения таких исследований, на первом этапе необходимо получить чистый препарат ДНК без признаков деградации и примесей. Для депротеинизации ДНК часто используют различные токсичные органические растворители (фенол, хлороформ и др.).

Для исследования были отобраны 30 образцов вегетативных тканей сосны обыкновенной на юге ареала в ЦФО (Кантемировский р-н Воронежской обл.). Экстракция ДНК из хвои выполнялась с использованием ЦТАБ, включающего применение токсичного хлороформа для депротеинизации [1] и коммерческого набора diaGene (ДИАМ) для выделения ДНК из растительной ткани на спин-колонках с сорбирующей мембраной, в состав которой входит диоксид кремния (выделение проводили согласно инструкции Производителя). Чистоту выделенной ДНК оценивали, используя электрофоретическое разделение полученных препаратов в агарозном геле, спектрофотометрическое определение концентрации – на приборе Quibit 2.0., а также – ПЦР. В качестве примера для сравнения двух методов выделения ДНК использовали EST-SSR праймер, подобранный к локусу lw_isotig00081 [2]. Тестирование микросателлитного локуса ядерной ДНК сосны осуществляли путем проведения ПЦР в амплификаторе Real-time CFX96 Touch BIO-RAD. В реакции использовали *Taq* полимеразу фирмы Евроген (Россия). Результаты амплификации визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в 2,5 % агарозном геле.

Электрофореграмма ДНК выделенной двумя разными методами из хвои деревьев сосны представлена рис. 1. Сравнительный анализ разделения ПЦР-продуктов показал незначительные различия по концентрации полученных ампликонов. На рис. 2 даны результаты электрофореза ДНК из хвои 30 деревьев сосны обыкновенной, полученных с использованием двух методов экстракции. Как видно из рис. 2, величина продуктов амплификации данного праймера соответствует ожидаемой для двух методов выделения согласно литературному источнику [2].

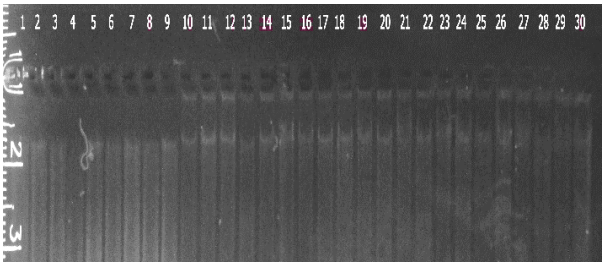


Рисунок 1. Электрофореграмма образцов ДНК *Pinus sylvestris* L., выделенных с помощью набора diaGene (1-9) и с помощью ЦТАБ-метода (10-30)

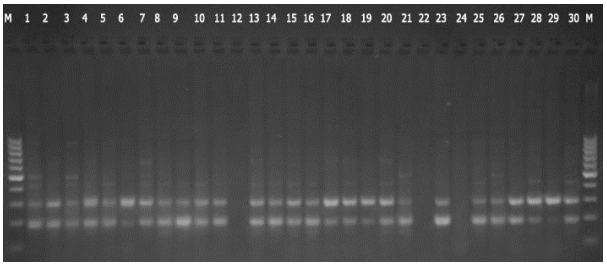


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов амплификации в образцах ДНК 30 деревьев сосны с праймером lw_isotig00081 в 2,5%-ном агарозном геле (обозначение как на рис.1)

Таким образом, отсутствие токсичных органических соединений, скорость выделения и оптимальное количество получаемой ДНК позволяют предложить технологию её выделения из хвои *Pinus sylvestris* L. с использованием набора diaGene для выделения ДНК из растительной ткани на базе спин-колонок как альтернативу традиционного метода с ЦТАБ. Этот способ выделения ДНК может быть использован при оценке полиморфизма SSR-локусов в популяционных исследованиях *Pinus sylvestris* L.

ЛИТЕРАТУРА

1. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
2. Fang, Pan et.al. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica*(Pinaceae) // Applications in Plant Sciences. – 2014. – 91. Vol. 2 (1).

УДК 66.047

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПРОВЕРКИ ХАЛЯЛЬНОСТИ ПРОДУКТОВ

О.Д. Гендрикон, Е.А. Зверева, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

В настоящее время проблема фальсификации мясных пищевых продуктов стоит достаточно остро, что связано с расширением технологических возможностей в процессе их производства [1]. Присутствие в продуктах компонентов, непредусмотренных рецептурой, может принести вред физическому здоровью людей и иметь серьезные этические последствия (нарушения халяльности, кошерности).

Для эффективного контроля мясных продуктов высокочувствительные аналитические методы (ВЭЖХ, ПЦР и др.), реализуемые в специальных лабораториях, должны дополняться тест-системами для массового экспрессного скрининга на любом этапе производства пищевой продукции [2]. Эффективным инструментом для решения этой задачи являются характеризующиеся высокой чувствительностью и специфичностью иммуноаналитические методы, прежде всего – иммуноферментный (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА). По сравнению с ИФА, ИХА имеет такие преимущества, как экспрессность (время анализа составляет 10–15 мин), простота реализации, отсутствие необходимости в сложном оборудовании и квалифицированном персонале. Кроме того, результаты анализа могут быть оценены как качественно (на наличие примесей несанкционированных сортов мяса), так и количественно (концентрация таких примесей), что позволяет использовать иммунохроматографические тест-системы для самых различных целей.

Идентификация видов сырого мяса иммуноаналитическими методами обычно проводится с использованием белковых маркеров и антител с определенной селективностью, а также видоспецифичных олигонуклеотидных зондов [3]. Ряд мышечных и сывороточных термостабильных белков используются в качестве биомаркеров для определения источника мяса [4–6]. При этом термостабильность белков обеспечивает сохранение конформации специфически антителами распознаваемых антигенных структур. Чувствительность анализа в представленных в литературе исследованиях позволяла детектировать до 0,01–2,5 % мясных добавок с пределами обнаружения маркеров 0,5 пг/мл – 0,5 мкг/мл. Основным недостатком использования термостабильных белков для выявления мясных фальсификатов и несанкционированных добавок является длительность пробоподготовки, обусловленная применением высокотемпературной обработки проб.

Альтернативным подходом для распознавания источников и оценки общего содержания мясного сырья является обнаружение иммуноглобулинов (Ig) – глобулярных гликопротеинов, которые присутствуют в плазме всех позвоночных и могут быть легко экстрагированы из мышечной ткани. Пригодность иммуноглобулинов для иммунохимической детекции примесей свинины в мясных продуктах была показана в работах [7, 8].

В настоящем исследовании разработана тест-система для иммунохроматографического определения иммуноглобулинов свиньи в полуфабрикатах и готовых мясных пищевых продуктов. ИХА реализован в «сэндвич» – формате, основанном на использовании антител кролика, полученных к иммуноглобулинам свиньи (здесь и далее – антивидовые антитела), их конъюгатов с наночастицами золота в качестве маркера и колориметрической детекции (как визуальной, так и инструментальной) результатов анализа. Разработана простая и быстрая методика пробоподготовки, исключающая нагревание проб, что позволило значительно сократить продолжительность анализа в целом.

Свойства используемых в анализе антивидовых антител (аффинно очищенные иммуноглобулины кролика против иммуноглобулинов свиньи) характеризовали методом ИФА в «сэндвич» – формате. Для этого в лунках микропланшета иммобилизовали антивидовые антитела, которые затем последовательно инкубировали с определяемыми иммуноглобулинами свиньи и м антивидовыми антителами, меченными ферментной меткой (пероксидазой), активность которой регистрировали фотометрически. Предел обнаружения IgG свиньи в «сэндвич» – ИФА составлял 2 нг/мл.

Полученные результаты позволили перейти к разработке иммунохроматографической тест-системы для детекции IgG свиньи. Маркер для ИХА – наночастицы золота (НЧЗ) – получали, восстанавливая золотохлористоводородную кислоту цитратом натрия. Характеристика НЧЗ методом просвечивающей электронной микроскопии показала, что их средний диаметр составляет 30.5±4.3 нм (рис. 1). Конъюгаты антивидовых антител получали методом физической адсорбции. Используемая при этом концентрация антивидовых антител была выбрана на основании флоккуляционной кривой.

ИХА был также реализован в «сэндвич» – формате. Для этого в аналитическую зону тест-полоски наносили антивидовые антитела. Контрольную зону формировали путем адсорбции антител козы к иммуноглобулинам кролика. Для проведения анализа в буфере в лунки микропланшета добавляли серию разведений IgG свиньи и конъюгат антивидовые антитела–НЧЗ и инкубировали 5 мин. В полученную смесь опускали тест-полоски и инкубировали еще 15 мин. Сформировавшиеся в растворе комплексы состава IgG свиньи – антивидовые антитела–НЧЗ с током жидкости достигали аналитической зоны, связывались с антивидовыми антителами и образовывали первую окрашенную полосу. Избыток комплекса концентрировался в контрольной зоне с образованием второй окрашенной полосы (рис. 2). Для обеспечения высокого аналитического сигнала и низкого предела обнаружения подобраны концентрации иммунореагентов в контрольной и аналитической зонах тест-полоски, время инкубации, состав реакционной среды и другие параметры. Предел обнаружения иммуноглобулинов свиньи в оптимизированном ИХА составил 0,5 нг/мл.

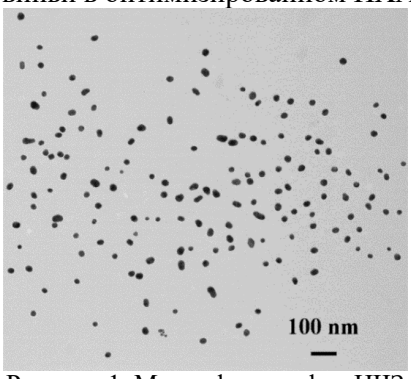
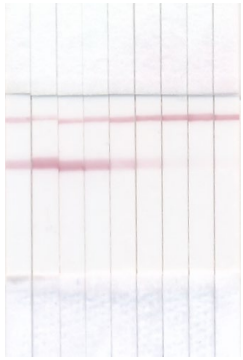


Рисунок 1. Микрофотография НЧЗ


Рисунок 2. Вид тест-полосок после ИХА IgG свиньи (концентрации IgG 10000, 1000, 370, 123, 41, 13.7, 1.5, 0.2, 0 нг/мл)

Для детекции примесей свинины в продуктах питания (в том числе халяльных) разработана простая пробоподготовка, которая заключалась в гомогенизации мясных проб, экстракции IgG буфером специально подобранного состава и центрифугировании. Для определения чувствительности ИХА были приготовлены говяжий, бараний и куриный фарши с добавлением свиного фарша в известном количестве (0,05–10 % по массе). После пробоподготовки экстракты анализировали с использованием изготовленных тест-полосок. Показана возможность детектировать до 0,1 % свинины во всех видах фарша. Высокая чувствительность определения IgG свиньи позволила перейти к анализу примеси свининей в различной мясной продукции.

В панель анализируемых мясных изделий и полуфабрикатов входила продукция, маркированная производителями как халяльная, а именно – пельмени разного состава (говядина, баранина), колбасы и сырой фарш – приобретенная в специализированных супермаркетах г. Москвы. Показано, что во всей проанализированной продукции IgG свиньи достоверно не детектировались.

Таким образом, разработанная тест-система позволяет провести быструю (20 мин) и чувствительную (до 0,1 %) детекцию примесей свинины в мясной продукции и может быть рекомендована для быстрого внелабораторного скрининга состава мясных продуктов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 19–16–00108 Российского научного фонда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bansal S., Mangal M., Mangal A., Kumar S. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. Crit Rev Food Sci Nutr (2017). 57(6):1174–1189.
2. Vlachos A., Arvanitoyannis I.S., Tserkezou P. An updated review of meat authenticity methods and applications. Crit Rev Food Sci Nutr (2016). 56(7):1061–1096.
2. Ali M.E., Razzak M.A., Hamid S.B.A., Rahman M.M., Amin M.A., Rashid N.R.A., Asing. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. Food Chem (2015). 177:214–24.
4. Zvereva E.A., Kovalev L.I., Ivanov A.I., Kovaleva M.A., Zherdev A.V., Shishkin S.S., Lisitsyn A.B., Chernukha I.M., Dzantiev B.B. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. Meat Sci (2015). 105:46–52.
5. Masiri J., Benoit L., Barrios-Lopez B. Development and validation of a rapid test system for detection of pork meat and collagen residues. Meat Sci (2016). 121:397–402.
6. Hsieh Y. – H.P., Ofori J.A. Detection of horse meat contamination in raw and heat-processed meat products. J Agric Food Chem (2014). 62(52):12536–12544
7. Kuswandi B., Gani A.A., Ahmad M. Immuno strip test for detection of pork adulteration in cooked meatballs. Food Biosci (2017). 19:1–6.
8. Mandli J., Fatimi I.E., Seddaoui N., Amine A. Enzyme immunoassay (ELISA/immunosensor) for a sensitive detection of pork adulteration in meat. Food Chem (2018). 255:380–389.

УДК 66.047

МЕТАГЕНОМНЫЕ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ СНЕЖНОЙ ПЛЕСЕНИ ЗЛАКОВ И «ЧЕРНОЙ НОЖКИ» ПАСЛЕНОВЫХ

Ю.В. Гоголев[1], М.А. Сайганова[2], М.Д. Бойцова[2], А.С. Балкин[3], В.Ю. Горшков[1]

[1] Казанский научный центр Российской академии наук, Казань, Россия
[2] Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия
[3] Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, УрО РАН, Оренбург, Россия

Инфекционные заболевания растений приводят к большим потерям урожая в РФ и во всем мире. К числу основных причин этого относятся следующие: 1) слабая характеристика патокомплексов, вызывающих многие инфекционные заболевания растений; 2) недостаток знаний о генетических основах устойчивости растений; 3) снижение эффективности фитопротекторных препаратов вследствие появления пестицид-резистентных штаммов патогенов; 4) недостаточная изученность для многих фитопатогенов механизмов патогенеза, что, в частности, затрудняет создание препаратов, специфичных к «мишеням» патогена.

Разработка современных геномных технологий открывает новые возможности для решения многих задач фитопатологии. Для внедрения и отработки данных технологий нами были взяты в качестве объекта «снежные плесени» озимых зерновых культур и «черная ножка» картофеля. Изучение снежных плесеней становится все более актуально по следующим причинам: 1) в последние годы значительно увеличились как вредоносность грибов-возбудителей этих заболеваний, так и спектр поражаемых ими культур; 2) ключевые этапы патогенеза при поражении снежной плесенью в основном проходят до схода снега, что делает многие фунгицидные препараты не эффективными; 3) возбудители снежной плесени, несмотря на огромную вредоносность, относятся к наименее исследованным фитопатогенам; 4) сотрудниками ФИЦ КазНЦ РАН создана уникальная экспериментальная площадка – инфекционный питомник, который в течение 20 лет ежегодно экзогенно обогащается патокомплексами, содержащими разные возбудители снежной плесени, для оценки селекционного материала и генетических ресурсов злаковых культур.

Первостепенной задачей данного исследования явилась характеристика патокомплекса возбудителей и выявление его мажорных детерминант. Для этого был использован метод метагеномного баркодинга растений ржи, пораженной снежной плесенью в полевых условиях на экспериментальных площадках ФИЦ.

Анализ филогенетического положения грибов представителей микробиома образцов проводили по результатам секвенирования участков межгенного спейсера рибосомального оперона ITS2. Целевой фрагмент нарабатывали с помощью полимеразной цепной реакции с праймерами ITS3_KYO2 (5'-GAT GAA GAA CGY AGY RAA-3 ') и ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') с добавлением служебных последовательностей по протоколу «Illumina, Inc.» (США), содержащих линкеры и баркоды. Для определения таксономического состава сообщества бактерий были использованы праймеры Bakt_341F (5′-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3′) и Bakt_805R (5′-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3′) фланкирующие V3-V4 вариабельные регионы гена бактериальной 16S рРНК. ПЦР проводили с использованием Q5 Hot Start High-Fidelity 2× Master Mix (BioLabs, США). Высокопроизводительное секвенирование выполняли на платформе Illumina с использованием набора MiSeq v2ReagentKit (Illumina).

Проведенный анализ позволил нам выделить изоляты грибов, являющихся кандидатами основных возбудителей снежной плесени злаков в исследуемом регионе. Большинство выделенных изолятов, предварительно отнесенных к роду *Microdochium* (на основании морфологических и цитологических характеристик, а также ПЦР-анализа со специфичными праймерами), было вторично проанализировано с помощью метабаркодинга области межгенного спейсера рибосомального оперона. Для этого из изолятов выделяли индивидуальные препараты ДНК, используемой для амплификации ITS2 и последующего секвенирования амликонов.

В результате проведенного анализа было показано, что 18 изолятов относились к трем генетическим группам, две из которых (7 изолятов), соответствовали *Microdochium nivale*, и одна группа (представленная 11 изолятами) соответствовала *Microdochium majus*. Эти два вида являются филогенетически близкими, однако ранее с развитием снежной плесени связывали только *M. nivale* (Hasegawa, 1985). Для представителей этих групп проведено полногеномное секвенирование с использованием платформ Illumina HiSeq 2500 и Oxford Nanopore MinION. Анализ полученных последовательностей позволит получить информацию о фитопатогенном потенциале данных микроорганизмов.

Бактериозы относятся к наиболее вредоносным заболеваниям растений. По данным продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН они вызывают до 50 % потери урожая. Особую опасность представляют мягкие гнили плодовых и «черная ножка» картофеля. Основным фактором патогенности вызывающих заболевание пектолитических бактерий (пектобактерий) служат гидролитические ферменты, разрушающие клеточную стенку растений, что приводит к некрозу тканей.

Пектобактерии обычно рассматриваются как патогены грубой силы, которые разрушают клетки и ткани растений, что приводит к симптомам “мягкой гнили”. Тем не менее, во время взаимодействия с хозяином эти фитопатогены могут применять сложные долговременные стратегии благодаря тому, что геномы пектобактерий содержат гены, которые кодируют системы секреции III-го и VI-го типа, эффекторные белки, а также фитотоксины – оружие биотрофных «стелс» – патогенов. Эти инструменты используются для манипулирования макроорганизмом и провокации специфических ответов, повышающих его чувствительность и благоприятных для микробной колонизации. Однако, подобные ответы растений на пектобактерии, связанные с восприимчивостью к этим патогенам, остаются плохо изученными. Используя технологию высокопроизводительного секвенирования (RNA-Seq) нами были детально проанализированы транскриптомы бактериального и растительного компонентов патосистемы при различных сценариях инфицирования. Это позволило нам описать общую картину физиологии паразита и хозяина в ходе развития мягкой гнили.

В результате транскриптомного анализа было выявлено более восьми тысяч дифференциально экспрессированных генов (DEG) у зараженных и контрольных растений. Чтобы интерпретировать большое количество транскриптомных данных с точки зрения общей физиологии, кДНК выявленных DEG были функционально классифицированы в соответствии с различными общими (UniProt, KEGG, GenBank, Gene Onthology) и специфичными для растений базами данных (TAIR, SolGenomics, PlantPAN, PlantProm) с использованием BLASTX. Для классификации DEG по функциональным категориям и оценки повышающих и понижающих регулировок были написаны пользовательские сценарии на языке программирования R. Эти скрипты в настоящее время находятся в свободном доступе на сайте GitHub (https://github.com/RimGubaev). Поскольку автоматическая классификация имеет множество погрешностей, она была проверена вручную и дополнена согласно литературным данным, чтобы избежать потери информации. Для представления сложной транскриптомной информации были выполнены общепринятые схемы и графики, для чего использовалось программное обеспечение KEGG Mapper, MapMan, BioCyc, а также пользовательские сценарии на языке R.

Применение различных баз данных и вычислительных подходов позволило нам выполнить достаточно подробное описание транскриптома инфицированного растения. Было выявлено, что экспрессия генов, относящихся к категориям, связанным с такими гормональными системами, как жасмонат-зависимая (JA) и этилен-опосредованная, а также отвечающим за модификацию клеточной стенки, вторичный метаболизм, дыхание, деградацию белка и крахмала были значительно повышены во время инфекции. В свою очередь, процессы, которые контролируют клеточный цикл, развитие растений, ауксин- и гиббереллин-опосредованные ответы, а также фотосинтез были подавлены после инвазии патогена.

Имеются основания полагать, что изменения экспрессии генов нескольких функциональных категорий имеют отношение к модуляции восприимчивости растений. Например, индукция генов, связанных с жасмонатной системой, представляет собой восприимчивый ответ.

Салициловая (SA) и жасмоновая (JA) кислоты являются ключевыми регуляторами защитных реакций растений на инвазию патогенов. Однако, есть примеры, указывающие на то, что индукция этих систем приводит к восприимчивости растений. Принято полагать, что SA- и JA-индуцированные пути являются взаимоисключающими.

В свою очередь, патогены обладают различной степенью чувствительности к SA- и JA-индуцированным ответам растений и могут активировать тот тип ответа, который в меньшей степени влияет на их жизнеспособность. Например, биотрофные псевдомонады продуцируют фитотоксин коронатин, который активирует JA-зависимые реакции растений и подавляет SA-зависимые. В некротрофическом *Pectobacterium atrosepticum* (*Pba*) был обнаружен кластер генов, которые кодируют ферменты для биосинтеза коронафуциновой кислоты (*cfa*) – структурного компонента коронатина. Несмотря на то, что *Pba* обычно рассматривается как возбудитель “грубой силы”, вызывающий мягкие гнили, он может обитать в хозяине без видимых повреждений в качестве биотрофного патогена. Ранее нами было высказано предположение, что различные типы взаимодействия могут быть связаны с изменениями баланса JA / SA у инфицированных растений.

Прежде всего, нами был проведен анализ активности JA- и SA-зависимых гормональных систем во время латентной и типичной инфекции у растений картофеля и табака путем анализа уровней экспрессии маркерных генов. Мы также оценили влияние предварительной обработки JA и SA на устойчивость растений к пектобактериям. Экспрессия генов JA-маркера активировалась во время типичной инфекции у растений табака и картофеля. Во время латентной инфекции экспрессия генов JA-маркера либо не отличалась от таковой у интактных растений, либо была значительно ниже, чем при острой инфекции. Типичная инфекция не была связана с активацией экспрессии SA-регулируемого гена PR1, однако во время скрытой инфекции содержание транскрипта этого гена увеличивалось. Таким образом, развитие заболевания с типичными симптомами связано с активацией JA-зависимой системы, которая не угнетает развитие патогенного организма в растении. Напротив, скрытая инфекция связана с индукцией SA-зависимой системы и снижением размножения патогена. Для подтверждения различного влияния JA- и SA-зависимых систем на развитие заболевания нами была проведена прединфекционная обработка растений экзогенным метилжасмонатом (MeJA) и SA. Было показано, что предварительная обработка SA ингибировала развитие симптомов заболевания, в то время как обработка MeJA не вызывала значительного эффекта.

Среди дифференциально активируемых генов бактерий в состоянии вирулентности ожидаемо были выявлены такие факторы вирулентности, как ферменты деградации клеточной стенки растений (PCWDE) и эффекторы систем внутриклеточной секреции.

Большинство генов, связанных с разрушением гомогалактуронана (12 из 17), были активированы в растениях по сравнению с условиями *in vitro*. В свою очередь, 5 из 8 генов, связанных с деградацией рамногалактуронана, были подавлены при бессимптомной инфекции.

Одним из выявленных феноменов было то, что гены бактериального локуса *cfa*, отвечающие за продукцию коронатина, показали активацию в условиях, предшествующих мацерации растительных тканей. В связи с этим, нами была предпринята попытка определения роли *cfa* при взаимодействии растений с пектобактериями. Были сравнены стратегии колонизации растений диким типом *Pba* и cfa-мутантом. Было показано, что как *cfa*-мутантные бактерии, так и бактерии дикого типа способны размножаться внутри хозяина с той же эффективностью, формировать бактериальную эмболию и колонизировать первичные сосуды ксилемы. Однако, мутант не был способен колонизировать паренхиму и не вызывал мацерацию ткани. Это согласуется с данными о меньшей вирулентности cfa-мутанта для растений картофеля (Bell *et al*., 2004).

Чтобы проверить, может ли коронатин активировать JA-ответы, мы сравнили экспрессию уровня гена JA-маркера (LOX) в инфицированных растениях. Уровень экспрессии гена LOX в растениях, зараженных *cfa*-мутантом, был выше по сравнению с интактными растениями, но значительно ниже по сравнению с растениями, зараженными пектобактериями дикого типа.

Благодаря применению новых подходов в транскриптомных исследованиях (Ettwiller *et al*., 2016) нам удалось провести анализ дифференциальной экспрессии некодирующих РНК бактерий в инфицированных растениях. Было выявлено не менее 37 малых РНК, из которых 4 показывали дифференциальную транскрипционную активность в растениях по отношению к бактериальным культурам. Два транскрипта, *frnS* и *ASpks* заслуживают особого внимания. Первый из них кодируется антисмысловой цепью в непосредственной близости от промотора гена цинкового транспортера *zntB*.

Известно, что транспорт ионов железа, марганца, цинка и магния является критичным фактором для патогенеза бактерий. Транскрипт *ASpks* аннотирован по гомологии с малой РНК *Mycobacterium tuberculosis*, которая у микобактерий транскрибируется навстречу гену *pks12*, кодирующему поликетидсинтазу, необходимую для биосинтеза сложных липидов, вовлеченных в патогенез (Arnvig and Young, 2012). Картирование *ASpks* на геном *P. atrosepticum* показало, что эта РНК транскрибируется навстречу помотору гена *cfa7*. Активность его в клетках бактерий, инфицирующих растения, возрастает более чем в 30 раз.

Активация некодирующей РНК в локусе оперона *cfa* подтверждает его функциональную значимость в патогенезе и указывает на участие процесса РНК-интерферренции в регуляторно-сигнальном каскаде, отвечающем за контроль синтеза коронатина. Многоступенчатая иерархическая регуляция активности генов свидетельствует об их ключевой роли в важнейших физиологических процессах.

Работа по аннотации некодирующих РНК *P. atrosepticum* начата сравнительно недавно (Kwenda *et al*., 2016) и в этом направлении еще многое предстоит сделать. В частности, в базе данных не представлена обнаруженная нами малая некодирующая РНК, транскрибируемая дивергентно гену регулятора кворум-сенсинга *expR*. Результаты показали высокую транскрипционную активность антисмысловой цепи в области *expR*-промотора. Ранее участие в регуляции кворум-сенсига аналогичной РНК *yenS* было показано для *Yersinia enterocolitica* (Tsai, Winans, 2011). Была также показана дивергентная транскрипция малой РНК *esaS* с промотора гена кворум-регулятора *esaR* у *Pantoea stewartii* (Schu *et al*., 2009).

Таким образом, в проведенном исследовании были выявлены гены табака и *P. atrosepticum* SCRI1043, экспрессия которых различается у интактных растений и растений, инфицированных возбудителем мягкой гнили, при латентной инфекции и развитии симптомов заболевания. В результате проведенных исследований высказанное ранее предположение, что развитие симптомов заболевания, вызванного *Pba*, связано с балансом JA- и SA-зависимых ответов было подтверждено на уровне транскриптомного анализа инфицированных растений. Показано, что SA ингибирует размножение пектобактерий и определяет развитие бессимптомного взаимодействия патогена с хозяином. Развитие типичной инфекции связано с индукцией JA-опосредованных реакций, которые определяются продукцией коронатина клетками бактериального фитопатогена. Многоступенчатая иерархическая регуляция активности генов вирулентности *Pba* включает использование процесса РНК-интерференции, в том числе, с участием антисмысловой цис-транскрибируемой РНК. Полученные данные предоставляют новую информацию о маркерах вирулентности возбудителей мягкой гнили растений и возможных способах контроля данного вредоносного заболевания.

Биоинформатическая часть работы поддержана грантом РНФ 19–14–00194, работы по секвенированию грантом РНФ 17–14–01363, полевые исследования грантом РФФИ №20–34–70043.

ЛИТЕРАТУРА

Arnvig K, Young D. Non-coding RNA and its potential role in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. RNA Biol. 2012; 9(4):427–36.

Bell, K.S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M.T.G., Hyman, L.J., Holeva, M.C., et al. (2004). Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen Erwinia carotovora subsp. atroseptica and characterization of virulence factors. Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America, 101(30), 11105–11110.

Ettwiller L., Buswell J7, Yigit E., Schildkraut I. A novel enrichment strategy reveals unprecedented number of novel transcription start sites at single base resolution in a model prokaryote and the gut microbiome. BMC Genomics. 2016; 17:199.

Hasegawa M., Kishino H., and Yano T. (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution 22:160–174.

Kwenda S., Gorshkov V., Ramesh A., Naidoo S., Rubagotti E., Birch P., Moleleki L. Discovery and profiling of small RNAs responsive to stress conditions in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. BMC Genomics. 2016; 17:47.

Schu D., Carlier A., Jamison K., Bodman S., Stevens A. Structure/Function Analysis of the *Pantoea stewartii* Quorum-Sensing Regulator EsaR as an Activator of Transcription. J Bacteriol. 2009; 191(24):7402–7409.

Tsai C., Winans S. The quorum-hindered transcription factor YenR of *Yersinia enterocolitica* inhibits pheromone production and promotes motility via a small non-coding RNA. Mol Microbiol. 2011; 80(2):556–571.

УДК 664.002.35

ЧЕЧЕВИЧНОЕ МОЛОКО, ОБОГАЩЕННОЕ ЙОДОМ

А.О. Дарьин, Л.В. Антипова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

На сегодняшний день заболевания алиментарно-зависимого характера имеют устойчивые темпы роста. В основном это заболевания эндокринной, костно-мышечной, сердечно-сосудистой систем, сахарный диабет, целиакия. Отдельно следует выделить рост возникновения заболеваний щитовидной железы из-за недостатка йода в рационах питания.

Цель работы состоит в получении чечевичного молока с последующим обогащением йодидом калия для снижения риска развития болезней, а также повышения биологической ценности и улучшения качества белкового молока. Для алиментарной коррекции таких состояний организма зарекомендовали себя нетрадиционные сырьевые источники и новые формы пищи, где целенаправленное обогащение нутриентами имеет особое значение. Технология получения чечевичного молока включает промывку в холодной воде зерен чечевицы от посторонних загрязнений, предварительное замачивание в питательном растворе йодида калия с концентрацией соли 10 г./л. Проращивание зерен в подобранных условиях до достижения длины ростков не более 1 см. После повторной промывка и измельчения проросших зерен до частиц размером не более 1 мм. Проводили экстрагирование водой при температуре 35–40 °С с гидромодулем 1:3–1:5. После отделения белковой суспензии от нерастворимого осадка, молоко пастеризовали в течение 5–10 мин при температуре 80–95 °С с последующим охлаждением и упаковыванием. Замачивание зерен чечевицы в растворе йодида калия с последующим проращиванием приводит к формированию устойчивой йодированной системы. Йод из неорганического состояния переходит в органическую форму, что повышает его биоусвояемость и достигаемость органа-мишени (щитовидной железы). В таблице 1 представлены результаты определения содержания йода в пророщенных зернах чечевицы [1].

Таблица 1. Содержание йода в пророщенных зернах чечевицы

Содержание йода в питательном растворе (г/л)	Содержание йода пророщенной чечевице, мкг/кг
контроль	0
2	50–55
5	140–150
10	270–290

В ходе проведенного опыта установлено, что при добавлении в питательный раствор 10г соли йодида калия, содержание йода в зерне составляет от 270–290 мкг, при суточной норме потребления йода 150 мкг. Из этого следует, что использование полученной чечевицы в объеме равной 500 грамм способствует удовлетворить суточную потребность человека в йоде. Дополнительно в ходе проращивания зерен образуются витамины группы В, С, Е, Н, К, РР, укрепляющие организм от воздействия внешних факторов. В результате проращивания образуют и увеличивают массовую долю свободные аминокислоты – метионин и цистеин. Таким образом можно констатировать широкие возможности создания продуктов питания для алиментарной коррекции физиологических состояний путем придания пищевым системам заданного статуса.

ЛИТЕРАТУРА

Антипова Л.В. Растения как источники пищевого белка: монография / Л.В. Антипова, И.Н. Толпыгина, Л.Е. Мартемьянова. – Воронеж: Воронежский ЦНТИ, 2013(Воронеж).

УДК 640

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОИНОКУЛЯЦИИ МИКРОКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП В УСЛОВИЯХ *INVITRO*

Н.В. Евсеева[1], Г.Л. Бурыгин[1,2], О.В. Ткаченко[2], А.А. Старчиков[2], М.А. Григорян[2]

[1] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия
[2] Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

Стратегия создания биопрепаратов в настоящее время сместилась в направлении разработки биотехнологий на основе ассоциаций микроорганизмов с разными экологическими функциями, которые дополняют друг друга и оказывают синергетический эффект на растения. Предварительными исследованиями было показано, что бактерии рода *Azospirillum* активизируют развитие корневой системы микроклонов картофеля *invitro*, стимулируют адаптацию полученных регенерантов к условиям *exvitro*, а также способствуют увеличению урожая мини-клубней. Кроме того, были выделены PGPR других таксономических групп, положительно влияющие на рост микрорастений картофеля в культуре *invitro*. Целью данного исследования являлось выявление и оценка эффективных комбинаций бактерий *Azospirillumbrasilense* Sp245 с ризосферными бактериями других таксономических групп из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Коллекционные штаммы *Azospirillumbrasilense* Sp245, *Ochrobactrumcytisi* IPA7.2, *Enterobacterludwigii* K7 и *Kocuriarosea* T1Ks19 были использованы для инокуляции микрочеренковкартофеля (*Solanumtuberosum* L.) сорта Невский из коллекции микроклонов картофеля *invitroФГБОУ* ВО Саратовского ГАУ, культивируемых на безгормональной питательной среде Мурасиге-Скуга. В соответствии с установленными ранее особенностями бактериальных штаммов растения при черенковании инокулировали совместно штаммами *A. brasilense* Sp245 и *Kocuriarosea* T1Ks19 или при черенковании монокультурой *A. brasilense* Sp245, а затемна 14 сутки культивирования штаммом *O. cytisiIPA*7.2 или *Enterobacterludwigii* K7. Контролем служили стерильно выращиваемые растения без бактеризации. Анализ проводили на 30 сутки культивирования. Результаты морфометрического анализа растений, инокулированных *бактериямиA.brasilense* Sp245 *uO.cytisi* IPA7.2, показали достоверное стимулирование роста микрорастений ризосферными штаммами по отдельности и совместно в сравнении с контролем. По параметру длина побега установлено стимулирующее действие в сравнении с контролем *бактерийA. brasilenseSp245* на 11 %, *O. cytisiIPA*7.2 на 16 %, а двух штаммов одновременно на 34 %, что существенно превышает действие каждого штамма по отдельности. По количеству узлов инокулированные растения превышали контрольные примерно в равной степени во всех вариантах инокуляции на 9–14 %. Максимальный положительный эффект от коинокуляциимикрорастений картофеля *бактериямиA. brasilense* Sp245 в сочетании с *O.cytisi* IPA7.2, *E.ludwigii* K7 и *K.rosea* T1Ks19наблюдали в последнем варианте. У бактеризованных растений увеличивались длина корней на 21 %, сырая и сухая масса корней в 1,9и 1,3 раза соответственно. В вариантах *коинокуляцииA. brasilense* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2 и *A. brasilense* Sp245 + *E.ludwigii* K7 наблюдалось достоверное стимулирование растяжения побега соответственно на 27 % и 34 % при одновременном уменьшении числа узлов на побеге соответственно на 36 % и 41 %. Таким образом, эффект коинокуляциимикрорастений картофеля одновременно двумя штаммами *A. brasilenseSp245* и *O. cytisi* IPA7.2 в целом соответствовал действию каждого штамма ризосферных бактерий по отдельности. Синергический эффект коинокуляции наблюдался только по параметру длина побега. Наиболее эффективным штаммом-компаньоном для *A. brasilenseSp245* из трех изученных бактерий оказался штамм *K. rosea* T1Ks19.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фондафундаментальных исследований (проект № 19–016–00116).

УДК 66.047

ОСОБЕННОСТИ ЭТАПА ПРОБОПОДГОТОВКИ В КУЛЬТУРЕ МИКРОСПОР *IN VITRO* РЕДИСА ЕВРОПЕЙСКОГО.

Е.В. Козарь, Е.А. Домблидес, А.В. Солдатенко

Федеральный научный центр овощеводства, п. ВНИИССОК, Россия

Редис (*Raphanus sativus* L.) – перекрестноопыляемая, экономически значимая корнеплодная культура семейства Brassicaceae. Традиционно сорта редиса создаются с помощью скрещивания чистых линий, полученных путем длительного инбридинга. Для ускорения селекционного процесса в настоящее время применяются биотехнологические методы. Получение удвоенных гаплоидов (DH-растений) в культуре микроспор *in vitro* является передовой технологией создания выровненного материала для селекции и генетических исследований. Особенно этот метод актуален для перекрестноопыляемых сельскохозяйственных культур, ввиду сокращения временных и экономических затрат в несколько раз по сравнению с традиционными методами селекции (Forster, Thomas, 2005; Ferrie, Möllers, 2011).

На данный момент клеточная технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro* разработана (Lichter, 1982; Pechan, Keller, 1988; Dunwell, 2010) и активно применяется в селекционных программах многих культурных растений, но для ряда культур, в том числе для редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) она все еще не доступна.

Род *Raphanus sativus* L. является самым неотзывчивым к эмбриогенезу в семействе Brassicaceae и в литературе нет данных об успешном получении удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro* для редиса европейского. На базе института ФГБНУ ФНЦО в лаборатории репродуктивной биотехнологии сельскохозяйственных растений впервые удалось завершить полный цикл получения DH-растений редиса европейского (Kozar et al., 2020). Благодаря чему появилась возможность исследовать причины его низкой эмбриогенной способности и искать пути ее преодоления для разработки эффективной технологии получения удвоенных гаплоидов этой культуры.

Протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор in vitro состоит из большого числа этапов, каждый из которых имеет большое влияние на конечный результат (Maluszynski et al., 2003; Forster et al., 2007; Turaev et al., 2009; Ferrie, Caswell, 2011). Одним из таких этапов является пробоподготовка. Для индуцирования эмбриогенеза подходят микроспоры на поздней вакуолизированой и ранней двухклеточной стадиях развития, которые способны переходить с гаметофитного пути развития на спорофитный (Pechan, Keller, 1988). На других стадиях развития микроспоры не изменяют свой путь развития и погибают при культивировании, выделяя токсины, что оказывает пагубное воздействие на развитие эмбриогенных структур (Chun et al., 2011; Шмыкова и др., 2015). Поэтому для успешного результата важна высокая доля содержания микроспор на стадиях, восприимчивых к индукции эмбриогенеза, введенных в культуру *in vitro*.

Ввиду высокой корреляции между линейным размером бутона и стадиями развития микроспор в них, при пробоподготовке производится рекогносцировочный анализ бутонов различной длины на предмет оценки концентрации в них микроспор на необходимых стадиях развития (Kozar et al., 2020). После чего определяется диапазон линейных размеров бутонов, подходящих для выделения из них микроспор для введения в культуру *in vitro*. Этот этап стандартен и достаточен для культур семейства Brassicaceae с уже разработанной технологией получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro*, поскольку в таких культурах присутствуют бутоны с высокой концентрацией (до 80 %) микроспор на оптимальных стадиях развития в диапазоне варьирования линейного размера бутонов около 1 мм (Bhatia et al., 2018).

Однако редис европейский отличается спорадическим развитием микроспор в бутонах, ввиду чего процент восприимчивых к эмбриогенезу микроспор в бутоне редко превышает 50 % и значительно снижается при изменении длины бутона уже на 0.3–0.5 мм. относительно оптимума (Kozar et al., 2020). Причем эти параметры нестабильны и могут отличаться даже в пределах индивидуальных растений, а также смещаться в большую сторону в процессе цветения. Это является одной из причин низкой отзывчивости микроспор редиса европейского к эмбриогенезу и усложняет процесс отбора бутонов. Поэтому стандартный процесс пробоподготовки в культуре микроспор *in vitro*, который используется в технологиях получения удвоенных гаплоидов в других культурах семейства Brassicaceae, для редиса европейского недостаточен и требует доработки.

Для решения поставленных вопросов в исследования были включены сорок сортообразцов редиса европейского отечественной и зарубежной селекции из коллекции лаборатории столовых корнеплодов ФГБНУ ФНЦО. Как показал сравнительный анализ достаточно широкого набора образцов, на данный момент наиболее эффективным способом максимизирования содержания необходимых стадий микроспор в препарате является введение в культуру микроспор из бутонов сразу нескольких фракций для каждого опыта с ранжированием длины бутонов шагом не более 0.3 мм. Это позволяет повысить вероятность попадания в нужную стадию развития микроспор в культуре. Также по литературным данным проблему фракционирования микроспор можно решить с помощью отработки техники градиентного центрифугирования в растворе перколла, которая позволяет разделить микроспоры на фракции по стадиям развития еще до введения в культуру. В литературе описаны работы, в которых применялось градиентное центрифугирование для культур Brassicaceae (Takahata et al., 1993; Bhowmik, 2011), в том числе для разновидности китайского редиса (Takahata et al., 1996) и в настоящее время проводится работа по адаптации этой методики для редиса европейского. Предварительные исследования показали, что диапазон поиска эффективных концентраций перколла для разделения микроспор редиса европейского можно сузить до диапазона 30–40 %.

Помимо погибших микроспор, загрязняющими и токсичными агентами являются любые другие органические элементы, попадающие в препарат при пробоподготовке. Для культур семейства Brassicaceae выделение микроспор производится путем их разбивки в бюксах с магнитами на магнитной мешалке (Домблидес и др., 2016), или путем сжатия бутонов поворотным движением с помощью поршня (Custers, 2003). При выделении микроспор редиса такими способами, в препарат попадает много органических остатков разрушенных соматических клеток за счет механического воздействия. Поскольку такие элементы меньше по размеру, чем микроспоры, при фильтрации полученной суспензии они не задерживаются нейлоновыми фильтрами и попадают в препарат, оказывая токсическое воздействие. Ввиду этого, общепринятые техники выделения микроспор для редиса европейского не подходили и требовалось усовершенствование этого этапа технологии. В результате многочисленных экспериментов, нам удалось разработать наиболее приемлемый способ выделения микроспор для редиса, который минимизирует попадание продуктов разрушения соматических клеток в препарат. Этот способ заключается в индивидуальном препарировании бутонов поперечным разрезом скальпеля, после чего половинки бутонов погружаются в стерильные пробирки с промывочной средой NLN-13 и взбалтываются на центрифуге-вортекс «Микроспин» FV-2400. При таком выделении микроспор элементы органических продуктов разрушенных соматических клеток в препаратах практически отсутствуют, что способствует улучшению условий для прохождения эмбриогенеза.

В результате проведенной работы удалось усовершенствовать этап пробоподготовки в культуре микроспор *in vitro* для редиса европейского. Разработанные технологические модификации позволят продвинуться в разработке эффективной технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ
в рамках научного проекта № 19–316–90034

ЛИТЕРАТУРА

Домблидес Е.А., Шмыкова Н.А., Шумилина Н.А., Заячковская Т.В., Минейкина А.И., Козарь Е.В., Ахраменко В.А., Шевченко Л.Л., Кан Л.Ю., Бондарева Л.Л., Домблидес А.С. Технология полу – чения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства капустные (методические рекомендации). М.: ВНИИССОК, 2016.

Шмыкова Н.А., Шумилина Д.В., Бондарева Л.Л.. Совершенствование DH-технологии получения удвоенных гаплоидов капусты брокколи. Селекция и семеноводство овощных культур. 2015; 46:601–608.

Bhowmik P., Dirpaul J., Polowick P., Ferrie A.M.R. A high throughput Brassica napus microspore culture system: influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2011; 106, 359–362. DOI 10.1007/s11240–010–9913–3.

Chun C., Park H., Na H. Microspore-derived embryo formation in ra – dish (Raphanus sativus L.) according to nutritional and environmental conditions. Hort. Environ. Biotechnol. 2011; 52(5):530–535. DOI 10.1007/s13580–011–0080–1.

Custers J.B.M. Microspore culture in rapeseed (Brassica napus L.). In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants. Springer, Dordrecht. 2003; 185–193. DOI 10.1007/978–94–017–1293–4_29.

Dunwell J.M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J. 2010; 8:377–424. DOI 10.1111/j. 1467–7652. 2009.00498.x.

Актуальная биотехнология

№3 (34), 2020

УДК 66.047

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОДЛИННОСТИ И СОСТАВА МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ

Е.А. Зверева, О.Д. Гендриксон, Н.И. Смирнова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, Россия

В современном обществе важное значение имеет достоверность информации о составе и качестве сырья при производстве мясной продукции. Это связано прежде всего с тем, что некоторые технологически процессы предусматривают частичную замену мясного сырья белок-содержащими добавками животного или растительного происхождения [1]. Кроме того, известны случаи фальсификации продуктов, когда предусмотренное технологией мясо частично заменяли на мясо других видов животных [2]. В связи с этим актуален контроль состава на всех стадиях производства мясных продуктов (сырья, промежуточных изделий, готовой продукции). Для эффективности этого контроля необходимы достоверные и производительные методы анализа, которые позволят количественно и качественно идентифицировать отдельные ингредиенты, а также эффективные молекулярные идентификаторы, отражающие содержание разных видов сырья в готовом продукте.

Микроструктурные или гистологические методы анализа не подходят для анализа готовых мясных продуктов, прошедших все стадии технологического процесса. Молекулярно-генетические методы, электрофорез, различные виды хроматографии могут рассматриваться лишь в качестве подтверждающих методов, поскольку для их реализации необходимы специализированные лаборатории, обеспеченные соответствующим оборудованием и квалифицированным персоналом [3].

Иммуноаналитические методы имеют несомненные преимущества как средства скринингового анализа, обусловленные сравнительной дешевизной и большой производительностью измерений при работе с сериями проб [4]. В качестве основных методов в работе были рассмотрены микропланшетный иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА). ИФА обеспечен серийно производимым недорогим оборудованием и позволяет количественно характеризовать целевые соединения с высокой точностью. ИХА основан на использовании мультимембранного композита с иммобилизованными специфическими реагентами, поэтому для проведения анализа достаточно контакта тест-полоски с пробой, а для характеристики результатов – оценки наличия и интенсивности окрашивания определенных зон на тест-полоске.

Принципиальное значение имеет выбор молекулярного идентификатора, контролируемого иммунометодом. Такой биомаркер должен быть уникальным, характеризоваться стабильным высоким содержанием в мышечной ткани, иметь отличия в строении антигенных детерминант у разных животных. Кроме того, требуется стабильность маркера при различных видах обработки, которым подвергается мясное сырье. С учетом установленных критериев в качестве биомаркеров были охарактеризованы скелетный тропонин I, миоглобин, иммуноглобулины G, а также белок сои – соевый ингибитор трипсина (СИТ), поскольку именно соевое сырье чаще всего добавляют в мясные изделия для обеспечения требуемых пищевых и функциональных качеств готового продукта [5, 6].

В качестве основного формата проведения анализа был реализован «сэндвич» – формат, который подходит для оценки сохранения нативной структуры белка и используется для анализа антигенов, на поверхности которых существуют по крайней мере две антигенные детерминанты. К иммобилизованным на поверхности планшета или мембраны антителам добавляли раствор, содержащий анализируемый биомаркер; в результате чего образовывался комплекс антиген-антитело. Затем в систему вносили специфические антитела, конъюгированные с биотином (ИФА) или наночастицами золота (ИХА).

На основании проведенного скрининга отобраны пары антител, характеризующиеся максимальной амплитудой аналитического сигнала и минимальным пределом обнаружения. Разработаны методики иммуноферментного анализа скелетного тропонина I и СИТ, а также иммунохроматографические тест-системы для детекции скелетного тропонина I и миоглобина.

Данные методики позволили детектировать скелетный тропонин I с пределами определения 4.8 нг/мл в ИФА [7] и 25 нг/мл в ИХА. Показано, что использование в анализе моноклональных антител определенной специфичности позволяет с близкой эффективностью выявлять тропонин I в пробах мяса млекопитающих (говядина, свинина, баранина, конина). При этом тропонин I, присутствующий в мясе птицы (курица, индейка), разработанные системы ИФА и ИХА не детектируют. Иммунохроматографическая тест-система позволяет выявлять добавки говядины вплоть до 1 % в курином фарше.

ИХА миоглобина характеризовался пределом определения 5 нг/мл. Тест-система специфически выявляет свиной миоглобин и не взаимодействует с миоглобинами других видов млекопитающих и птиц. Продолжительность иммунохроматографического тестирования составила 15 мин.

Для контроля наличия соевого сырья в мясных продуктах была разработана методика конкурентного ИФА с применением антител к соевогмуингибитору трипсина. Анализ основан на конкурентном взаимодействии с антителами антигена, содержащегося в пробе, и иммобилизованного на поверхности лунок микропланшета. Использование конкурентной схемы было обусловлено тем, что в результате ферментативной и высокотемпературной обработки продуктов происходит нарушение нативной структуры СИТ, приводящее к его фрагментации [8]. Чувствительность детекции СИТ – 3.5 нг/мл, диапазон определяемых концентраций – 7.7–110 нг/мл. Общая продолжительность анализа была сокращена с 2 ч 30 мин до 1 часа за счет уменьшения продолжительности конкурентной стадии и стадии взаимодействия с антивидовыми антителами, меченными пероксидазой. Потери в чувствительности и амплитуде аналитического сигнала при этом не наблюдалось. Разработанная методика ИФА позволяет проводить выявление сои в мясных продуктах, прошедших все стадии технологической обработки.

Таким образом, выбранные белки – скелетный тропонин I, миоглобин, соевый ингибитор трипсина – могут быть использованы в качестве биомаркеров в тест-системах для контроля состава мясных продуктов. Разработанные методики иммуноферментного и иммунохроматографического анализа представляются эффективным средством проверки аутентичности и заявленного состава мясных продуктов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 19–16–00108 Российского научного фонда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Olmedilla-Alonso B., Jimenez-Colmenero F., Sanchez-Muniz F.J. (2013). Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. Meat Science, 95(4), 919–930.
2. Ballin, N.Z. (2010). Authentication of meat and meat products. Meat Science, 86(3), 577–587.
3. Chernukha I.M., Vostrikova N.L., Khvostov D.V., Zvereva E.A., Taranova N.A., Zherdev A.V. (2019). Methods of identification of muscle tissue in meat products. prerequisites for creating a multi–level control system. Theory and Practice of Meat Processing. 4(3):32–40.
4. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. (2014). Immunochromatographic methods in food analysis. TRAC – Trends in Analytical Chemistry, 55, 81–93.
5. Chen F. – C., Hsieh Y-H.P. Porcine troponin I: a thermostable species marker protein. (2002). Meat Science. 61, 55–60.
6. Kotoura S., Murakami-Yamaguchi Y., Kizu K., Nakamura M., Fuchu H., Miake K., Sugiyama M., Narita H. Establishment of a sandwich ELISA for the determination of beef content in processed foods by using monoclonal antibodies to myoglobin. (2012). Food and Agricultural Immunology. 23(3), 289–230.
7. Zvereva E.A., Kovalev L.I., Ivanov A.V., Kovaleva M.A., Zherdev A.V., Shishkin S.S., Lisitsyn A.B., Chernukha I.M., Dzantiev B.B. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. (2015). Meat Science, 105, 46–52.
8. Smirnova N.I., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of immunoenzyme assay for detection of soybean raw material in food products Applied Biochemistry and Microbiology. (2020), 56(4), 483–487.

УДК 604

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА ОРГАМИКА Ф В КАРТОФЕЛЕВОДСТВЕ

Д.Д. Зиганшин[1], М.А. Лукьянцев[2], А.А. Егоршина[2], А.С. Сироткин[1]

[1] Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Россия
[2] ООО «Органик парк», Казань, Россия

Для получения высококачественной растениеводческой продукции в сочетании с высокими урожаями необходимо создание оптимальных фитосанитарных условий при выращивании культурных растений. Выполнения данной задачи можно добиться применением биологических средств защиты растений, которые позволяют снизить нагрузку химических средств защиты растений на агроценоз хозяйственных растений. Это актуально как с хозяйственной точки зрения, так и в плане окружающей среды [1].

Наиболее перспективным направлением в создании биологических средств защиты является создание биофунгицидов на основе микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью по отношению к фитопатогенам растений. Так, многие грибные культуры рода *Trichoderma* отличаются эффективностью их использования против болезней культурных растений, вызываемых грибами и бактериями, что обусловливает целесообразность создания биопрепаратов на основе микромицетов р. *Trichoderma* [2–4].

Так, на основе штамма *T. asperellum* ВКПМ F-1323 компанией ООО «Органик парк» производится биофунгицид Оргамика Ф, представляющий собой суспензию конидий грибной культуры, полученной в процессе культивирования. Заявленный титр культуры составляет не менее 1×10^8 конидий/мл на момент окончания срока годности препарата при температуре хранения в диапазоне от +5 до +15 °С. Пестицид выпускается по ТУ 20.20.15–005–38272416–2017.

Препарат Оргамика Ф имеет свидетельство о государственной регистрации для использования на следующих культурах: картофель, горох, соя, томаты и огурцы защищенного грунта.

Данный пестицид используется для борьбы с такими заболеваниями как ризоктониоз, фитофтороз, корневые гнили, аскохитоз, септориоз, серая гниль, мучнистая роса, пероноспороз.

Норма расхода препарата варьируется в пределах 0,2–5,0 л/га при кратности обработки 1–2 раза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве тестовой культуры для испытания эффективности биофунгицида был выбран картофель сорта Удача. Испытания проводились в Гатчинском районе Ленинградской области, в почвенно-климатической зоне, относящейся к подзолистым и дерново-подзолистым почвам таежно-лесной области.

Клубневой анализ посадочного материала картофеля показал, что среди 100 учтенных клубней 8 % было поражено ризоктониозом (*Rhizoctonia solani*), 86 % серебристой паршой (*Helminthosporium solani*), 19 % обыкновенной паршой (*Streptomyces scabies*).

Норма высадки клубней составила 35 ц/га, предшественником были овощные культуры, почва подзолистая тяжелосуглинистая с содержанием гумуса 3,5 %, pH 5,5. В качестве удобрений в почву вносилась азофоска при посадке из расчета 5 ц/га.

Эксперимент проводился в четырехкратной повторности с размером делянок 25 м^2. Было проведено однократная обработка при протравливании опытным препаратом с двукратной обработкой в фазе вегетации. Для обработки использовался ручной опрыскиватель Solo 462 (SOLO Kleinmotoren GmbH, Германия). Расход рабочей жидкости составил 10 л/т, 300 л/га. В качестве стандарта использовался препарат Трихоцин, СП (ООО "АгроБиоТехнология", Россия) – биологический почвенный фунгицид на основе полезного почвенного гриба *Trichoderma harzianum*, штамм Г-30 ВИЗР с заявленным титром культуры 1×10^{10} конидий/г.

Схема опыта представлена в таблице 1.

Таблица 1. Схема обработки биопрепаратами картофеля сорта Удача

Вариант/препарат	Норма применения	Схема применения
Вариант 1 / Оргамика Ф, Ж (1×10^8 КОЕ/мл)	2,5 л/т + 2,0 л/га	Протравливание + опрыскивание (2-кратно)
Вариант 2 / Оргамика Ф, Ж (1×10^8 КОЕ/мл)	2,5 л/т + 4,0 л/га	Протравливание + опрыскивание (2-кратно)
Стандарт / Трихоцин, СП (1×10^{10} КОЕ/г)	20 г./т + 80 г./га	Протравливание + опрыскивание (2-кратно)
Контроль (без обработки)	–	-

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного эксперимента представлены в таблицах 2–5.

Экспериментально было выявлено, что опытный препарат не оказал существенного влияния на всхожесть посевного материала на 22-е и 40-е сутки (92–100 %) как по сравнению со стандартом (90–100), так и по сравнению с контролем (80–96 %). В фазе образования листьев и стеблей на 50-е сутки после обработки стимулирующий эффект по сравнению с контролем на высоту растений оказывал как опытный препарат, так и стандартный препарат (табл. 2).

Отмечено, что против ризоктониоза на стеблях на 55-е сутки по эффективности оба варианта опытного препарата превзошли стандарт на 36–40 % при развитии болезни в контроле 10,7 % (табл. 3). На столонах и клубнях опытный препарат также оказался эффективнее стандарта на 37–39 % и 28–32 %, соответственно, при развитии болезни в контроле 19,4 % и 3,8 % соответственно.

Далее, против фитофтороза наиболее эффективно проявил себя вариант 2 (табл. 4). На 73-е сутки он оказался на 14 % эффективнее варианта 1 и на 29 % по сравнению со стандартом при развитии заболевания в контроле более чем на 90 %. При этом урожайность в обоих исследуемых вариантах опытного препарата была выше по сравнению с контролем на 61 и 89 %, соответственно. Урожайность стандартного варианта практически не отличалась от контроля.

По выходу товарной продукции, представленной продовольственной и семенной фракциями, опытный препарат в двух нормах применения также оказался эффективнее стандартного образца.

В процессе хранения картофеля также была показана эффективность опытного препарата против ризоктониоза (табл. 5). Через месяц хранения наиболее предпочтительным был вариант 2: он был эффективнее варианта 1 на 11 %, стандарта – на 36 % при развитии заболевания в контроле 6,9 %.

Таблица 2. Влияние препарата Оргамика Ф на всхожесть и развитие растений картофеля сорта Удача

Вариант опыта	Всхожесть, %		Средняя высота растений, см	
	22-е сутки	40-е сутки	40-е сутки	50-е сутки
Вариант 1	94	100	10	38,8
Вариант 2	92	100	9,6	37,2
Стандарт	90	100	11,2	43,2
Контроль	80	96	8,8	31,3

Таблица 3. Эффективность препарата Оргамика Ф против ризоктониоза на картофеле сорта Удача

Вариант опыта	40-е сутки		55-е сутки		80-е сутки			
	Стебли				Столоны		Клубни	
	Р, %	Э, %	Р, %	Э, %	Р, %	Э, %	Р, %	Э, %
1	1,0	66	4,3	60	10,0	49	2,0	47
2	1,0	66	4,0	63	9,7	50	1,9	50
Стандарт	1,7	41	6,6	38	13,5	30	2,5	34
Контроль	2,9	-	10,7	-	19,4	-	3,8	-
* Р – Развитие; Э – Эффективность								

Таблица 4. Эффективность препарата Оргамика Ф против фитофтороза на картофеле сорта Удача

Вариант опыта	На ботве*						Урожайность		Выход клубней по фракциям, %		
	55-е сутки		62-е сутки		73-е сутки						
	Р, %	Э, %	Р, %	Э, %	Р, %	Э, %	т\га	% к контролю	Продовольственный	Семенной	Не стандарт
1	7,1	65	13,9	57	50,5	44	48,9	161	66,7	26,8	6,5
2	3,3	84	8,8	73	44,2	51	57,9	189	68,3	29,3	2,4
Стандарт	10,0	50	18,1	44	57,8	36	31,1	102	56,7	30,3	13,0
Контроль	20,1	-	32,4	-	90,1	-	30,2	100	41,0	38,9	20,2
* Р – Развитие; Э – Эффективность											

Таблица 5. Влияние препарата Оргамика Ф на пораженность ризоктониозом клубней картофеля сорта Удача

Вариант опыта	Во время уборки		Через 1 месяц хранения	
	Развитие, %	Эффективность, %	Развитие, %	Эффективность, %
Вариант 1	2,9	43	4,2	39
Вариант 2	2,7	47	3,9	44
Стандарт	3,6	29	5,0	28
Контроль	5,1	–	6,9	–

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Испытание препарата Оргамика Ф в двух нормах применения для предпосевной обработки клубней картофеля и обработки вегетирующих растений картофеля сорта Удача показало целесообразность применения данного препарата с целью борьбы с такими болезнями как ризоктониоз, фитофтороз, а также для повышения урожайности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов А.И. Стратегии интегрированной защиты и широкомасштабного контроля (единство и противоречия) // Материалы 2 Всеросс. съезда по защите растений. – Том I. «Фитосанитарное оздоровление экосистем», Санкт-Пет., 2005. – С. 245–247.
2. Srivastava M., Kumar V., Shahid M., Pandey S., Singh A. Trichoderma-a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review //African Journal of Agricultural Research. 2016, vol. 11, no. 5, pp. 310–316. DOI: 10.5897/AJAR2015.9568
3. Waghunde R.R., Shelake R.M., Sabalpara A.N. Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment //African journal of agricultural research. 2016, vol. 11, no. 22, pp. 1952–1965. DOI: 10.5897/AJAR2015.10584
4. Vos C.M., De Cremer K., Cammue B.P., De Coninck B. The toolbox of Trichoderma spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease // Molecular plant pathology. 2015, vol. 16, no. 4, pp. 400–412. DOI: 10.1111/mpp.12189

УДК 636.03

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ В ВОСПРОИЗВОДСТВЕ

Б.С. Иолчиев, О.Э. Бадмаев, П.М. Кленовицкий, А.В. Таджиева, Н.А. Комбарова

ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская область, п. Дубровицы, Россия

Одним из главных глобальных проблем человечества является продовольственная безопасность. В решении данной проблемы важнейшую роль играет сельское хозяйство, в частности животноводство. Отрасль является не только одним из основных источников продуктов питания, о также обеспечивает ряд отраслей легкой промышленности сырьем. Увеличивается спрос на белок животного происхождения, при этом сокращаются площади сельхозугодий (1). Решение проблемы требует совершенствования существующих и разработку более эффективных методов разведения сельскохозяйственных животных. Спектр использования методов биотехнологии в животноводстве охватывает воспроизводство, ветеринарию и производство продукции (2). Использование методов биотехнологии позволяет увеличить темп и эффективность селекции. Искусственное осеменение и криоконсервация являются наиболее широко применяемыми биотехнологическими методами, используемыми в животноводстве. Данные методы позволяют осуществить бессрочное сохранение генетического материала и его распространение.

Биологический материал при использовании вспомогательной репродуктивной технологии подвергается различной технологической обработке, что может оказать отрицательно влияние на его качество. Мужская генеративная плазма должна отвечать высоким требованиям, на практике часто требуется проводить процедуру подготовки генеративной плазмы.

Генеративная плазма является разнородной, в ней содержатся клетки, отличающиеся активностью, морфометрическими параметрами, степенью фрагментации ядерной ДНК в хроматине. В популяции не все сперматозоиды имеют прямолинейное поступательное движение, часть клеток бывают мертвыми, неподвижными или имеют непрямолинейное движение. Продукты распада мертвых сперматозоидов оказывают негативное влияние на живые клетки. Разрабатываются различные методы дифференцировки сперматозоидов на две популяции: с прямолинейным прогрессивным движением, с манежным движением и неподвижные (3,4). Единого мнения об эффективности использования методов и протоколов подготовки генеративной мужской плазмы не существует (5–8).

На современном этапе наиболее часто используемым методом является флотации «swim-up» (всплытие). Метод основан на способности сперматозоидов мигрировать в половых путях, для этого была разработана биологическая жидкость близкая по параметрам цервикальной слизью. Исследования показывают, что каждый из используемых методов для разделения сперматозоидов на различные популяции имеют недостатки и преимущества. Метод «swim-up» является наиболее эффективным для отбора сперматозоидов с нормальной ядерной ДНК (9). Недостатком метода считается то, что с его помощью невозможно отделить микроорганизмы от спермы (10).

Цель – использование метода флотации (swim-up) для улучшения репродуктивных показателей быков-производителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены в лаборатории клеточной инженерии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста». Объектом исследования являлись свежеполученной спермы быков-производителей голштинской породы (n=3). Процедуру «swim-up» выполняли с использованием среды для подготовки сперматозоидов фирмы «ПанЭко».

Для оценки биологической полноценности спермы использовали комплекс методов: активность сперматозоидов и морфологию определяли с помощью программы компьютерной оценки качества спермы CASA (computer-assisted semen analysis) «ArgusSoft»; для оценки морфологии и состояния акрасом сперматозоидов препараты окрашивали с помощью набора «Дифф-Квик»; фрагментацию ядерной ДНК в сперматозоидах изучали с помощью акридин-оранжевого теста (АОТ); для микроскопию использовали микроскоп «Nikon Eclipse Ni», оснащенный камерой «Nikon DS-Qi2» с высоким разрешением (4908½3264) («Nikon», Япония); для статистического анализа полученных данных использовали программу «SPSSv.15.0». Проводили многомерный статистический анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В свежеполученной сперме содержание сперматозоидов с прогрессивно-поступательным движением в среднем составило 76,12±5,3 %, более 13 % сперматозоидов имели непрогрессивное движение, и 10,82±2,1 % были неподвижными (табл. 1). Содержание сперматозоидов с анормальной морфологией в этих образцах в среднем составило 11,34±0,86 %, индекс фрагментации яДНК -8 %.

Таблица 1 Спермограмма быков-производителей в зависимости от процедуры обработки

Показатели	Свежеполученная сперма	Сперма после процедуры «swim up»
Содержание сперматозоидов: прогрессивно-подвижные, %	76,12±5,30	98,43±3,1**
непрогрессивно подвижные, %	13,06±1,02	1,57±0,05**
неподвижные, %	10,82±2,10	-
с патологической морфологией, %	11,34±0,86	5,27±0,12**
с интактными акросомами, %	90,7±5,3	88,3±1,8
Индекс фрагментации яДНК, %	8,5±1,5	4,0±0,5**

В образцах, полученных после процедуры «swim-up», содержание прогрессивно-подвижных сперматозоидов составило 98,43 %, разница между свежеполученной спермой и после процедуры «swim-up» статистически достоверна на уровне (P<0,01). Содержание клеток с патологической морфологией уменьшилось в 2,15 раза ((P<0,01). После процедуры «swim-up» в исследуемых слайдах содержание сперматозоидов с нарушением генетического материала в хроматине составило 4,0 %, что меньше более чем в 2 раза до процедуры «swim-up».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показывают, что использование метода флотации (всплытие живых сперматозоидов) позволяет улучшить фертильности самцов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № РФФИ № 18–016–00128 А

ЛИТЕРАТУРА

1. О.К. Суховольский. Значение биотехнологии в современном животноводстве // Известия СПбГАУ. 2019. № 1.с. 102–107.
2. Мамонтова Т.В., Айбазов А.М., Русакова О.С. Современные тенденции развития мирового и российского рынка биотехнологий в животноводстве // Сборник научных трудов ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. 2014. Т.2. № 7. с. 292–300.
3. Сингина Г.Н., Тарадайник Т.Е., Шедова Е.Н., Данч С.С. Оценка эффективности получения эмбрионов крупного рогатого скота in vitro с использованием спермы, разделенной по полу // Достижения науки и техники АПК Т.29. № 12. 2015 г. – С. 95–97.
4. Volpes A., Sammartano F., Rizzari S., Gullo, Marino A., and Allegra A. The pellet swim-up is the best technique for sperm pre S.paration during in vitro fertilization procedures // J Assist Reprod Genet. 2016 Jun; 33(6): 765–77.
5. Barroso G, Chaya M, Bolaños R, Rosado Y, García León F, Ibarrola E. Prognostic value on recovery rates for the application of sperm preparation techniques and their evaluation in sperm function. Ginecol Obstet Mex. 2005; 73 (5):221–228.
6 .Brandeis VT, Manuel MT. Effects of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology, and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. J Assist Reprod Genet.1993; 10 (6):409–416.
7. Плосконос М.В., Николаев А.А. Апоптоз и мужская фертильность // Врач. – 2014. – № 3. – С. 23–25.
8. Плосконос М.В. Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека // Клин. лаб. диаг. – 2014. – Т. 59, № 11. – С. 22–25.
9. Воробьёва О.А., Воскресенская А.В., Одинцов А.А. и др./ Мужское бесплодие и нарушение структурной организации хроматина сперматозоидов. Существует ли связь? // Пробл. репрод. – 2005. – № 6. – С. 56–62.
10. Tomlinson M.J., Moffatt O., Manicardi G.C. et al. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception // Hum. Reprod. – 2001. – Vol. 16. – № 10. – P. 2160–2165.

УДК 613.6, 664

АНТИМУТАГЕННЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ P. LACTOBACILLUS

С.В. Китаевская, О.А. Решетник

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

В промышленной биотехнологии наметилась тенденция применять стартовые культуры молочнокислых бактерий с комплексом функционально-технологических свойств, обеспечивающих целенаправленное протекание процесса выработки ферментированных пищевых продуктов, в том числе со сложным сырьевым составом. В настоящее время имеется огромная доказательная база механизмов и причин проявления терапевтических свойств молочнокислыми бактериями, что и позволяет рассматривать их в качестве функциональных компонентов пищи [1–5].

Традиционной микрофлорой ферментированных пищевых продуктов являются представители рода *Lactobacillus*, в связи с чем данная группа молочнокислых бактерий находится в центре особого внимания ученых и практиков всего мира.

В ходе многолетней работы по поиску функционально-активных штаммов МКБ, проводимой на кафедре ТПП нашего университета, из различных пищевых источников растительного и животного происхождения было нами отобрано 15 перспективных штаммов, принадлежащих к различным видам *p. Lactobacillus*.

Температурный оптимум штаммов лежит в диапазоне 30–37 °С, некоторые штаммы хорошо размножаются при 45 °С, но способны расти и при 15 °С. Оптимальное значение pH составляет 5,5 – 6,2, штаммы устойчивы к щелочной реакции среды (pH 9,2), а многие из них способны расти в кислой (pH 2) среде (таблица).

Цель работы – изучение антимутагенных свойств новых штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus*.

Для изучения антимутагенных свойств и выяснения вкладов систем репараций в исправление повреждений ДНК клетки применяли суспензионный метод ДНК-повреждающего теста, при исполнении которого индикаторные клетки бактерий инкубируют в жидкой питательной среде. В качестве индикаторных бактерий в работе применяли тест – штаммы *Escherichia coli*, имеющие дефекты по следующим системам репарации: *wp* – дикий тип; *uvrA*- – с нарушениями в эксцизионной репарации; *polA*- – с нарушениями в репарации ДНК-полимеразы 1; *recA*- – с нарушениями в пострекомбинационной репарации [6].

Наибольший интерес с точки зрения исследования метаболитов бактерий представляет фаза замедленного роста (конец логарифмической фазы), поскольку именно в этот период наблюдается максимальный уровень выделения продуктов жизнедеятельности клетки во внешнюю среду.

Экспериментально установлено, что конец логарифмической фазы (фаза замедленного роста) у исследуемых культур молочнокислых бактерий наступает после 4–10 ч в зависимости от штамма, стационарная – после 24 ч культивирования в жидкой питательной среде.

Для оценки биоантимутагенных свойств метаболитов молочнокислых бактерий, клетки тест-штаммов *E. coli* и культуральные жидкости молочнокислых бактерий, отобранные в логарифмическую фазу роста, предварительно инкубировали в мясо-пептоном бульоне в течение 100 мин., а затем бактерии отмывали физиологическим раствором, после чего инкубировали совместно с мутагеном – фурацилином (100 мкг/мл).

Результаты исследования антимутагенной активности продуктов жизнедеятельности новых штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus* представлены на рисунке.

Изучение антимутагенных свойств культуральной жидкости штаммов молочнокислых бактерий показало, что продукты жизнедеятельности исследуемых бактерий проявляют значительный биоантимутагенный эффект, что указывает на внутриклеточный механизм протекторного действия культуральной жидкости молочнокислых бактерий. По видимому, метаболиты лактобактерий приводят к снижению восприимчивости клеток тест-штаммов *E.coli* к действию ДНК-повреждающего соединения – фурацилина, либо активизируют альтернативные системы репараций, исправляющие повреждения в структуре ДНК.

Таблица – Характеристика штаммов молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus*

Штамм	Микроскопическая картина	Рост при температуре, °С		Рост в присутствии NaCl, %			Рост в присутствии желчи, %		Рост при различных значениях pH		
		15	46	2	4	6,5	20	40	2	3	9,2
Lmb. casei 1 (Пр)	Палочки средней длины, расположенные преимущественно в цепочках	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Lmb. casei 7 (Пр)		+	-	+	+	+	+	+	-	±	+
Lmb. casei 16 (Д)	Палочки средней длины, одиночные и в коротких цепочках	-	+	+	±	-	+	+	+	+	+
Lmb. casei 23 (Д)	Толстые палочки средней длины в виде отдельных или двойных клеток	±	+	+	+	±	+	+	±	+	+
Lmb. casei 32 (Д)		±	+	+	+	±	+	±	±	±	+
Lmb. casei 36 (Д)	Прямые палочки, расположенные преимущественно попарно или в коротких цепочках	+	-	+	+	+	+	+	-	±	+
Lmb. fermentum 10 (Пр)	Палочки средней длины, расположенные преимущественно в цепочках	+	-	+	+	+	+	+	±	±	+
Lmb. fermentum 12 (Пр)		+	±	+	+	+	+	+	±	±	+
Lmb. fermentum 13 (Д)	Изогнутые палочки средний длины, одиночные и в коротких цепочках	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+
Lmb. fermentum 24 (Д)	Палочки средней длины, расположенные преимущественно в цепочках	+	±	+	+	+	+	+	±	±	+
Lmb. plantarum 1 (Пр)		+	-	+	+	+	+	±	-	±	+
Lmb. plantarum 21 (Д)	Прямые палочки, расположенные попарно или в коротких цепочках	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Lbm. acidophilum 9 (Пр)	Толстые палочки средней длины одиночные и в коротких цепочках	±	+	+	+	±	+	+	±	+	+
Lmb. bavaricus 6(Д)		±	+	+	+	±	+	+	±	±	+
Lmb. brevis 3 (Д)	Толстые короткие палочки с закругленными концами	+	-	+	+	±	+	±	-	±	+

Примечание: «+» – 90 % и более случаев тест положителен; «–» – 90 % и более случаев тест отрицателен; «±» – 11–89 % случаев тест положителен.

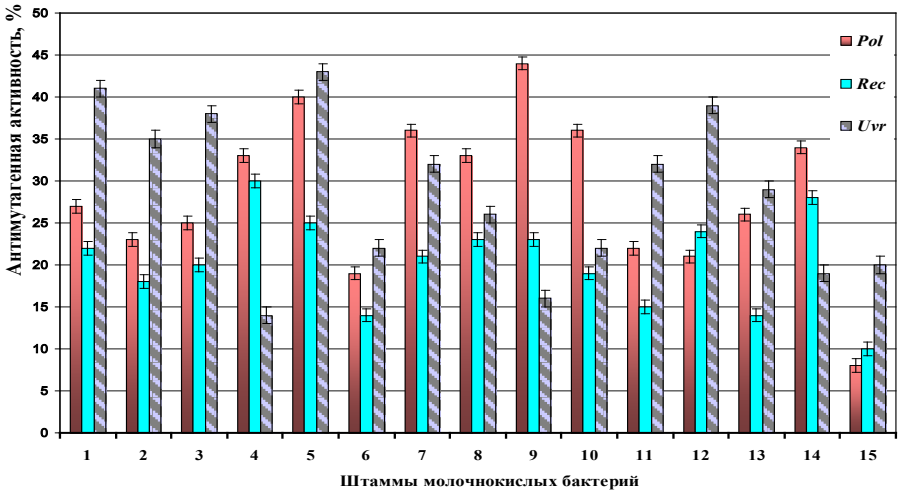


Рисунок 1 – Антимутагенная активность культуральной жидкости молочнокислых бактерий *p. Lactobacillus*

Следует отметить, что во всех экспериментальных вариантах в присутствии культуральной жидкости молочнокислых бактерий не наблюдался прирост биомассы клеток *E.coli*, таким образом она не приводит к стимуляции роста тест-штаммов *E.coli*, следовательно, более активный рост бактерий в присутствии антимутагена обусловлен только генопротекторными свойствами культуральной жидкости молочнокислых бактерий.

Сравнительное изучение влияния культуральной жидкости на мутагенность фурацилина у штаммов *E. coli* показало, что ее антимутагенное действие зависит от вида и штамма молочнокислых бактерий.

У большинства штаммов *L. casei* и *L. fermentum* пик антимутагенной активности приходится на штамм *pol*, дефектный по ДНК-полимеразе 1, из чего можно предположить, что метаболиты данных штаммов способны активизировать системы до- и постреплекативной репарации, в процессе которой устраняются «бреши» во вновь синтезируемой цепи ДНК.

Для штаммов *Lmb. plantarum* картина не однозначная, пик активности наблюдается, как на штамме *uvr*, с нарушенной экцизионной репарацией (*Lmb. plantarum* 1 *(Пр)*, так и на штамме *pol*, у *Lmb. plantarum 21 (Д)*.

Из мутагенных по репарации штаммов наибольший эффект проявили *pol* и *uvr*, более чувствительность к мутагену демонстрировал мутантный штамм *rec*, у которого практически полностью отсутствует процесс пострепликативной репарации, также на этом штамме наблюдается минимальный защитный эффект. Вероятно, подобные расхождения обуславливаются различными механизмами возникновения мутаций в клетках тест-штаммов под действием фурацилина.

Таким образом, результаты, полученные в ДНК-повреждающем тесте, показывают, что метаболиты, синтезируемые исследуемыми штаммами молочнокислых бактерий, проявляют значительный биоантимутагенный эффект, действуя на внутриклеточном уровне. По полученным экспериментальным данным выявлены штаммы молочнокислых бактерий, метаболиты которых проявили наибольший генопротекторный эффект от повреждающего действия фурацилина – *L. casei 32(Д), L. fermentum 13 (Д), L. bavaricus 6 (Д) и L. plantarum 21 (Д)*. Следует отметить, что два из обозначенных штаммов *L. casei 32 (Д)* и *L. bavaricus (Д)* ранее нами отмечены как лучшие с точки зрения функционально-технологических свойств [7]. Таким образом, антимутагенная активность штаммов *L. casei 32 (Д)* и *L. bavaricus 6(Д)* наряду с другими полезными свойствами делают их перспективными для создания функциональных пищевых продуктов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 20–016–00025.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюхова, С.И. Использование пробиотиков и пребиотиков в биотехнологии производства биопродуктов: монография / С.И. Артюхова, Ю.А. Гаврилова. – Омск: Изд-во ОмГТУ, 2010. – 112 с.
2. Soccol, C.R. The potential of probiotics: a review / C.R. Soccol [et all] // Food technol. biotechnol. – 2010. – № 48. – P. 413–434.
3. Lankaputhra W.E. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids / W.E. Lankaputhra, N.P. Shan // Mutat Res. – 1998. – Vol. 397, № 2. – P. 169–182.3. Polak, B.M. Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by lactobacillus rhamnosus E/N cultivated on different carbon /Polak B.M., Wasko A., Szwajgier D. and Choma A. // Sources Polish Journal of Microbiology. -2013. – V. 62. – № 2. – P.181–189.
4. Liu, C. – F. Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides /C. – F. Liu [et all] // J. Sci. Food Agric. -2011. – № 91. – P. 2284–2291.
5. Liong, M.T. Roles of probiotics and prebiotics on cholesterol: the hypothesized mechanisms / Liong M.T., Shah N.P. // Nutrafood. – 2005. – № 4. – P. 45–57.
6. Китаевская, С.В. Продукты метаболизма молочнокислых бактерий, как вещества снижающие действие генотоксикантов / С.В. Китаевская, Т.А. Ямашев, О.Б. Иванченко О.А. Решетник // Вестник технологического университета. – 2015. – Т.18, № 4 – с. 283–286.
7. Agafonova, A.N. Study of the influence of lactic acid bacteria on hydrolytic and oxidation processes in stuffed meat / A.N. Agafonova, T.V. Bagaeva, S.V. Kitaevskaya, N.K. Romanova, O.A. Reshetnik // Helix Vol. 9 (5). – P. 5318–5322

УДК 639.313:664.959.2

КОЛЛАГЕНОВЫЕ СУБСТАНЦИИ РЫБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ОТРАСЛЯХ ЭКОНОМИКИ

Л.В. Антипова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Коллаген – основной белок соединительной ткани животных организмов, один из самых распространенных и в настоящее время достаточно изученный на уровне молекулярной структуры и функций. Это способствовало его широкому применению в пищевой промышленности, медицине, косметологии. Однако коллагеновые белки рыбного происхождения изучены недостаточно, что ограничивает их применение в отраслях экономики. В то же интерес к этим белкам устойчиво растет ввиду наличия огромного ресурсного потенциала, особенностей структуры и физико-химических свойств.

Цель работы – обоснование получения и изыскании возможных путей рационального и целенаправленного использования коллагена.

Объект исследования – рыбный коллаген, полученный в результате глубокой переработки отходов рыбоперерабатывающего производства (пресноводные, прудовые). В результате реализации разработанной и запатентованной технологии получена жидкая субстанция, в состав которой входит белковый компонент, преимущественно коллаген. На основе исходной жидкой субстанции обоснованы параметры и режимы стабильности белка, определены условия денатурации, структурообразования, получения губчатых субстанций. Результаты исследования легли в основу технологий дисперсий различных концентраций коллагена, пленочных материалов и губок с высокой пористостью, обеспечивающей значительную влагоемкость полученных материалов. В ходе экспериментальных исследований установлена безопасность и отсутствие аллергических реакций в опытах invivo. Разработаны лабораторно-технологические регламенты получения коллагеновых субстанций различных форм, оценены их физико-химические и микробиологические показатели, определены условия и сроки их хранения. Сравнительные исследования доказали преимущества технологий коллагеновых субстанций различных форм рыбного происхождения: интенсивность процессов возросла в 4 раза, влагоемкость составляет 1 г на 40 г. воды, высокий репаративный эффект, более низкая стоимость, сырьевая доступность.

Коллагеновые субстанции различных форм апробированы в составе косметических средств для омоложения, лечения волос, заживления ран, в качестве средств личной гигиены, пищевых подложек для мясных полуфабрикатов широкого спектра, специализированных напитков, основ для иммобилизации йода, селена, меди, серебра с получением материалов и средств с заданными свойствами.

УДК 573.6.086.835:579.8; 573.6.086.835

ОЦЕНКА ПЕПТИДНОГО ПОТЕНЦИАЛА СТАРТОВЫХ КУЛЬТУР, А ТАКЖЕ ИХ КОМПОЗИЦИИ, В МЯСНОМ СЫРЬЕ

Д.А. Афанасьев[1], И.М. Чернуха[1], Н.Г. Машенцева[2]

[1] ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия
[2] Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

В последние годы активно проводятся исследования по изучению веществ белковой и пептидной природы, содержащихся в мясном сырье и готовых мясных продуктах. Эти соединения образуются, в том числе, в процессе ферментативной обработки мясного сырья стартовыми культурами, которые обусловливают качественные и функциональные характеристики, а также безопасность готовых мясных продуктов [1, 2]. Способность штаммов продуцировать биоактивные пептиды основана на гидролитических реакциях, происходящих под действием протеолитических ферментов микроорганизмов. Ферменты, непосредственно участвующие в образовании биоактивных пептидов, представляют собой протеиназы, связанные с клеточной стенкой (семейство PrtP) молекулярной массой приблизительно 200 кДа, и которые также могут быть внеклеточными. Гены PrtP могут быть обнаружены как в составе хромосомы, так и на плазмиде. На экспрессию протеиназ PrtP влияют различные факторы в зависимости от штамма Различия, обнаруженные в протеиназах молочнокислых бактерий, объясняют разнообразие образующихся биоактивных пептидов, даже когда используется один и тот же белковый матрикс, и их состав зависит от аминокислотной специфичности, в которой проводится гидролитическая ферментативная реакция [3].

Различными научными коллективами были проведены исследования протеолитической активности стартовых культур в отношении саркоплазматических и миофибриллярных белков мяса. Так, протеолиз миофибриллярных белков штаммом *L. plantarum* CRL 681 приводил к увеличению содержания лизина, аргинина и лейцина, в то время как из саркоплазматических белков в основном высвобождался аланин [4]. Для штаммов *Lactobacillus curvatus* CECT 904 и *Lactobacillus sakei* CECT 4808 отмечена активность протеиназы в отношении саркоплазматических белков [5]. Штаммы *Lactobacillus sakei* DSM 6333, *Lactobacillus plantarum* B21 и *Lactobacillus farciminis* DSM 201 84 продемонстрировали протеолитическую активность в отношении изоформы мышечной гликогенфосфорилазы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [6]. Половина из исследованных штаммов *Staphylococcus xylosus* показала изменения белкового профиля свинины при исследовании методом электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом [7]. При использовании в качестве композиции *Staphylococcus xylosus* и *Pediococcus pentosaceus* в турецких сосисках сукука основные изменения в протеолитических характеристиках происходили на стадии ферментации с увеличением содержания небелкового азота и снижением растворимости белка [8]. Ряд стартовых культур, например, *Lactococcus lactis, Lactobacillus helveticus*, образовывают биоактивные пептиды в процессе ферментации белкового, в т. ч. мясного сырья, за счет различных внутриклеточных пептидаз, включая эндопептидазы, аминопептидазы, дипептидазы и трипептидазы [9].

Цель работы – сравнение пептидного потенциала стартовых культур лактобактерий *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. и денитрифицирующих стафилококков для образования биологически активных пептидов, а также оценка влияние бактериальной композиции на протеолитические изменения в мясном сырье.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ фракционного состава белков исследуемых образцов проводили методом одномерного электрофореза в 12,5 % SDS-PAGE в ПААГ в камере «VE-10» (Helicon, США) при постоянном напряжении 160 В. По достижению фронтом разделяющего геля увеличивали напряжение до 180 В и продолжали разделение в течение 4–5 ч. Количество внесенного белка в гель составляло 20 мкг для всех образцов. В качестве стандарта для электрофореза использовали маркер (Thermo, США), представляющий собой смесь 11 рекомбинантных белков. Окрашивание проводили с использованием красителя Кумасси G-250. Белковый состав анализировали с помощью базы данных UniProtProteinDataBase (http://www.uniprot.org/) и «Протеомика мышечных органов» (http://mp.inbi.ras.ru).

В качестве объектов исследования были использованы стартовые культуры: *Pediococcus acidilactici* 25, *P. acidilactici* 8, *P. pentosaceus* 39, *P. pentosaceus* 31, *P. acidilactici* 38, *Lactobacillus. plantarum* 100, *L. sakei* 105, *L. sakei* 103, *L. curvatus* 2, *L. sakei* 45, *Staphylococcus xylosus* 45, *Staphylococcus xylosus* P-1, *Staphylococcus carnosus* 111–2, *Staphylococcus carnosus* 108 из коллекции ФГБОУ ВО МГУПП. Бактериальная композиция была составлена из штаммов *Lactobacillus sakei* 103, *Pediococcus pentosaceus* 39 и *Staphylococcus carnosus* 108.

Образец мышечной ткани *longissimus dorsi* крупного рогатого скота (КРС) инъецировали бактериальной суспензией с содержанием клеток 1×10^9 КОЕ/мл (по стандарту мутности McFarland) и ферментировали при температуре +4±2 °С в течение 12 суток в условиях вакуума с целью предотвращения внешней контаминации. Опытные пробы отбирались на 3, 6, 9 и 12 экспериментальные сутки. При приготовлении бактериальной композиции бактериальная суспензия каждой отдельной культуры с концентрацией клеток 10^9 КОЕ/мл смешивалась в соотношении 1:1:1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлен белковый профиль мышцы *longissimus dorsi* КРС, ферментированной стартовыми культурами рода *Pediococcus*. Под действием ферментных систем исследуемых культур происходит накопление белковых фрагментов в области расположения тяжелых цепей миозина (245–249 кДа). Данные фрагменты, вероятно, образуются в ходе гидролиза нативного миозина (>500 кДа). Исключение составляет штамм *Pediococcus pentosaceus* 39, по-видимому, обладающий недостаточной для деструкции миозина ферментативной активностью. Изменения коснулись и диапазона молекулярной массы, соответствующего саркоплазматическому белку миогену (~150 кДа) – к 12 суткам эксперимента существенно увеличивается интенсивность окраски белковой полосы в образцах со штаммами *P. acidilactici* 25, *P. pentosaceus* 39 и *P. acidilactici* 38. Отличны изменения в области расположения α-актинина (103–104 кДа). Так, в образцах с *P. acidilactici* 25 и *P. pentosaceus* 39 происходит значительное увеличение интенсивности окраски белковой полосы к 12 суткам эксперимента, что свидетельствует о накоплении продуктов деструкции на этом уровне молекулярных масс. В остальных образцах, напротив, происходит уменьшение интенсивности окраски белковой полосы. Содержание белковых фрагментов на уровне расположения аконитазы (~80 кДа) во всех образцах на протяжении всего исследования практически не изменяется, а в области расположения пируваткиназы (~58 кДа) и десмина (53–55 кДа) наиболее интенсивно уменьшается в образцах с *P. acidilactici* 8 и *P. pentosaceus* 39. К 9 суткам эксперимента начинается снижение интенсивности окраски белковой полосы в месте локации актина (~45 кДа) во всех образцах. Это наиболее заметно в образцах с культурами *P. acidilactici* 8 и *P. pentosaceus* 39. На промежутке молекулярных масса 41,5–41,7, что предположительно соответствует β-енолазе, начиная с 3 суток, увеличивается интенсивность окраски белковой полосы в образце с *P. acidilactici* 8, а в образцах с *P. pentosaceus* 39 и *P.acidilactici* 38 напротив уменьшается.

Интенсивность окраски белковых полос на уровне 32–37 кДа, где могут находиться тропомиозин Т1 и тропонин Т быстрого типа, снижается на 3 сутки эксперимента и, в дальнейшем, практически не изменяется. Фрагменты белков в области нахождения карбоангидразы 3 (29,5 кДа), фосфоглицератмутазы 2 (29 кДа) и смеси глутатион-S-трансферазы Р и триозофосфатизомеразы (24 кДа) подвергаются наибольшей деструкции под действием ферментных систем штаммов *P. acidilactici* 25 (начиная с 9 суток) и *P. acidilactici* 38 (начиная с 12 суток), о чем свидетельствует явное размытие границ белковых полос. Незначительным изменениям подвергаются белковые фрагменты в месте расположения β-хемокинов (~12 кДа) во всех образцах, кроме образцов с культурами *P. acidilactici* 8 и *P. pentosaceus* 31, где происходит постепенное увеличение интенсивности окраски белковой полосы, что свидетельствует о накоплении белковых фрагментов в данном диапазоне молекулярных масс. Следует отметить, что такое увеличение наиболее заметно в образце с *P. acidilactici* 8 уже на 3 сутки эксперимента, в то время как в образце с *P. pentosaceus* 31 оно фиксируется лишь на 12 сутки.

Abbasilias et. al., 2017, показали наличие сильной пептидазы (лейцин-ариламидазы) в штамме *P. acidilactici* Kp10 [10]. У *Pediococcus pentosaceus* OA1 обнаружена интенсивная протеолитическая активность на тестах из пшеничной муки [11]. Исследован протеолиз в сосисках из белого карпа, инокулированных *Lactobacillus plantarum* ZY40 и *Pediococcus pentosaceus* GY23. Протеолитический процесс был более интенсивным в колбасах, инокулированных *P. pentosaceus* GY23[12].

Действие бактерий рода *Lactobacillus* схоже с действием бактерий рода *Pediococcus*, однако имеет ряд отличий. Также, как и в случае с педиококками, под действием ферментных систем лактобацилл происходит накопление белковых фрагментов на уровне расположения тяжелых цепей миозина (245–249 кДа). Начиная с 6 суток эксперимента в образцах с культурами *L. sakei* 105 и *L. curvatus* 2 начинается изменение миогена (~150 кДа) – значительно уменьшается его содержание. В остальных образцах его содержание начинает уменьшаться лишь с 9 суток. Значительным изменениям подверглись белковые фракции на уровне α-актинина (103–104 кДа) – во всех образцах их содержание резко падает уже на 3 сутки эксперимента. К 9 суткам белковые полосы на уровне α-актинина и аконитазы (80 кДа) едва уловимы, что говорит о значительной деструкции белковых фрагментов в этой области. Исключение составляет образец с культурой *L. sakei* 45 – фрагменты белков в области α-актинина частично подвергаются деструкции, а в области аконитазы интенсивность окраски белковой полосы практически не изменяется по сравнению с этой же полосой в контрольном образце. Содержание фрагментов в области расположения актина (~45 кДа) изменяется незначительно по сравнению с контролем, кроме образцов с культурами *L. sakei* 103 и *L. curvatus* 2, где деструкция ярко выражена. На промежутке молекулярных масса 41,5–41,7 кДа, что предположительно соответствует β-енолазе, белковая полоса практически полностью разрушается, начиная с 6 суток эксперимента. К 9 суткам данная белковая полоса отсутствует во всех образцах. Наиболее интенсивно деструкция белковых фрагментов в этой области идет в образце с *L. curvatus* 2. Области расположения карбоангидразы 3 (29,5 кДа) и фосфоглицератмутазы 2 (29 кДа) остаются практически неизменными. Смесь глутатион-S-трансферазы P и триозофосфатизомеразы (24 кДа) подвергается практически полной деструкции во всех образцах. Белковые фрагменты в области легких цепей миозина 1/3 (21–21,5 кДа) подвергаются значительной деструкции уже с 3 суток эксперимента. Исключение составляет образец с *L. sakei* 45, где деструкция прошла незначительно. В области расположения миоглобина (18 кДа) наблюдается повышение интенсивности окраски белковой полосы, что свидетельствует о накоплении белковых фрагментов в данной области. Наиболее ярко выражено накопление белковых фрагментов к 12 суткам эксперимента в образцах с *L. sakei* 103 и *L. sakei* 45. Фиксируется накопление белковых фрагментов во всех образцах на уровне 17 кДа (предположительно, в этой области располагается одна из изоформ легкой цепи миозина 1/3). Наиболее интенсивно накопление идет в образце с *L. sakei* 103. В области α- и β-гемоглобина (15,7–15,9 кДа) наблюдается увеличение интенсивности окраски белковых полос во всех образцах по сравнению с контрольным, что также свидетельствует о накоплении белковых фрагментов в этой области. Следует отметить, что это накопление идет лишь до 9 суток, далее наблюдается деструкция. В диапазоне молекулярных масс 10–15 кДа, где предположительно определяются α- и β-хемокины, идет накопление белковых фрагментов во всех опытных образцах. В контрольном образце белковые полосы в данной области отсутствуют.

В работе Almeida et. al., 2018, инокуляция *L. curvatus* CRL705 приводила к образованию 56 низкомолекулярных пептидов, при внесении *Lactobacillus plantarum* и *L. sakei* высвобождалось большое количество аминокислот [13]. В работе Benito et. al., 2007, из 192 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из естественно ферментированных сухих колбас, только 3 штамма *P. acidilactici* проявляли слабую протеолитическую активность в отношении миофибриллярных или саркоплазматических белков [14].

Стафилококки *Staphylococcus xylosus* 45, *Staphylococcus xylosus* P-1, *Staphylococcus carnosus* 111–2, *Staphylococcus carnosus* 108 показали протеолитическую активность как в отношении саркоплазматических, так и миофибриллярных белков. Отмечалось снижение интенсивность окраски белковых полос в диапазоне молекулярных масс примерно 10–50 кДа. Также деструкции подверглись тяжелые цепи миозина (245–249 кДа). В работе Mauriello et. al., 2002, из 27 исследованных штаммов *Staphylococcus xylosus* 18 показали протеолитическую активность методом SDS-PAGE: 12 штаммов были способны гидролизовать саркоплазматические белки, 12 – миофибриллярные белки и 6 штаммов были способны гидролизовать и те, и другие. Электрофоретические профили, полученные в результате действия штаммов BS5 и ES1, показали снижение интенсивности белковых полос примерно на 48, 41, 22 и 20 кДа. Эти же белковые полосы были полностью гидролизованы под действием штамма AS27. Штаммы ES2 и BS5 показали свою активность полностью гидролизовав миозин (220 кДа), актин (45 кДа) и тропомиозин T1 (35 кДа), и появлением полос примерно на 100 и 25 кДа. Такая же белковая картина была получена и после действия штамм ES1, за исключением исчезновения тропомиозина T1 [7]. Показана протеолитическая активность педиококков *Pediococcus pentosaceus* и стафилококков *Staphylococcus xylosus* при производстве ферментированной колбасы. Небелковый азот увеличивался в процессе созревания в результате протеолитической активности штаммов [15].

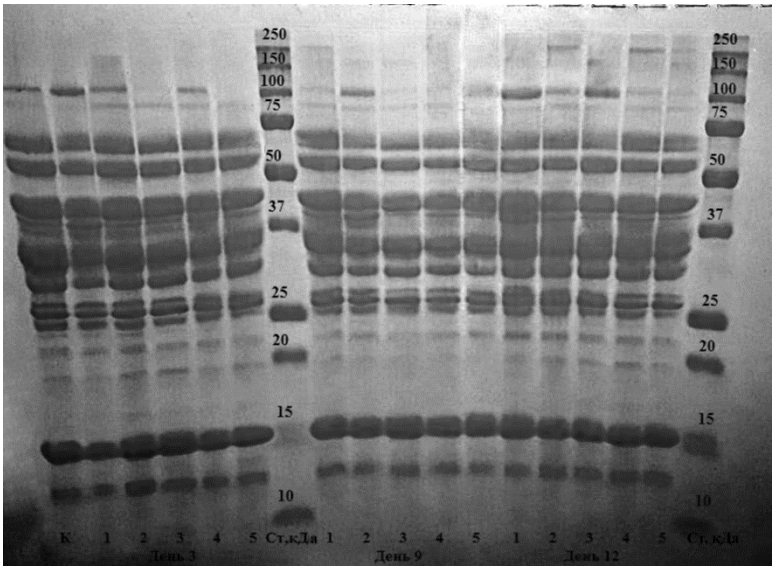


Рис. 1. 1ДЭ-электрофореграмма образцов мышечной ткани КРС, ферментированной бактериями рода Pediococcus. Ст, кДа – стандартный белковый маркер, К – контроль, 1 – P. acidilactici 25, 2 – P. acidilactici 8, 3 – P. pentosaceus 39, 4 – P. pentosaceus 31, 5 – P. acidilactici 38

Сравнивая действие штаммов трех видов на белковый профиль мышечной ткани, можно отметить следующие сходства: и *Lactobacillus* spp., и *Pediococcus* spp., и *Staphylococcus* spp., в первую очередь, оказывают значительное воздействие на такие белки, как тяжелые цепи миозина, миозин, актин и тропомиозин Т1. Существенное сходство для всех трех культур – видовая специфичность, т. е. каждый вид гидролизует белки в разной мере, либо вообще не гидролизует. Говоря о различиях, следует отметить наиболее явное воздействие на белки мышечной ткани *Lactobacillus* spp. Их действие распространяется практические на все мажорные белки и носит деструктивный характер. В образцах с культурами *Lactobacillus* spp. отмечается существенное накопление белковых фрагментов с молекулярной массой менее 20 кДа. Наибольшей протеолитической активностью отличился штамм *L. sakei* 103. Действие *Pediococcus* spp. оказалось более мягким по сравнению с действием *Lactobacillus* spp. – в разной мере подвергаются деструкции белки в узком диапазоне молекулярных масс – 75–250 кДа. Белки с меньшей молекулярной массой практически не изменяются, а белковые фрагменты локализуются практически по всей электрофоретической картине, о чем свидетельствует увеличение интенсивности окраски белковых полос. Наиболее эффективными в отношении протеолиза оказались штаммы *Pediococcus pentosaceus* 39 и *Pediococcus acidilactici* 25. Бактерии рода *Staphylococcus* spp. преимущественно оказывают воздействие на белки, находящиеся в диапазоне молекулярных масс 10–50 кДа. В литературных данных отмечается их существенное воздействие на такие мажорные белки как миозин, актин и тропомиозин. Представленные данные показывают, что молочнокислые бактерии и денитрифицирующие стафилококки влияют на протеомную картину ферментированных мясных субстратов, обладая как видоспецифической, так и штаммоспецифической протеолитической активностью. Образование биоактивных пептидов зависит от ферментативной активности микроорганизмов, а факторы, влияющие на их продукцию, специфичны для каждого штамма.

На основании приведенных результатов электрофоретических исследований были выбраны штаммы, оказывающие наиболее существенное воздействие на мышечные белки, и на их основе была составлена бактериальная композиция. Результаты исследования белкового профиля мышцы *longissimus dorsi* КРС, ферментированной композицией стартовых культур (рис. 2), показали, что совместное действие бактерий родов *Lactobacillus, Pediococcus и Staphylococcus* способствует более полному гидролизу мышечных белков. Так, значительному гидролизу подверглись белки в диапазоне молекулярных масс 150–300 кДа. Белковые полосы в этом диапазоне практически отсутствуют во всех опытных образцах. Фрагменты в области α-актинина подвергаются постепенной деструкции на протяжении всего эксперимента. Аналогичная ситуация наблюдается и в областях молекулярных масс, соответствующих расположению пируваткиназы (58 кДа), десмину (53–55 кДа), α-актину, тропонинам Т быстрого и медленного типов (32–37 кДа), миоглобину (18 кДа) и гемоглобину (15 кДа).

В работе Sánchez-Rivera et al., 2014, было установлено, что комбинация стартовых культур *Lactobacillus curvatus* CRL705 и *Staphylococcus vitulinus* GV318 значительно усиливает протеолиз по сравнению с отдельным использованием каждого штамма: с помощью двумерного гель-электрофореза был установлен гидролиз актина, легкой цепи миозина 1/3, легкой цепи миозина 2 и тяжелой цепи миозина, а с помощью LC-MS/MS идентифицировали в общей сложности 33 пептида, возникающих из тропонина Т, легкой цепи миозина 2 и актина [16]. Инокуляция мясной системы *S. xylosus* и *L. plantarum* приводила к уменьшению концентрации пептидов с молекулярными массами выше 3 кДа и увеличением количества пептидов с молекулярными массами ниже 3 кДа [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

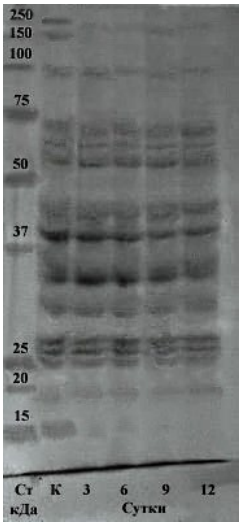


Рис. 2. 1ДЭ-электрофореграмма образцов мышечной ткани КРС, ферментированной бактериальной композицией. Ст, кДа – стандартный белковый маркер; К – контрольный образец (0 день, фон); 3, 6, 9, 12 – экспериментальные сутки

Стартовые культуры рода *Pediococcus* вызывают наиболее явные протеомные изменения в диапазоне молекулярных масс 75–250 кДа – наблюдается увеличение количества белковых фрагментов в области расположения таких белков как тяжелые цепи миозина, миоген, α-актинин. Белки с меньшей молекулярной массой подвергаются незначительной деструкции. Наиболее интенсивно белковый субстрат меняют штаммы *Pediococcus pentosaceus* 39 и *Pediococcus acidilactici* 25. Бактерии рода *Lactobacillus*, напротив, вызывают стабильную деструкцию белков мышечной ткани КРС с накоплением белковых фрагментов с молекулярной массой ниже 20 кДа, что может обусловливаться наличием у *Lactobacillus* более активной протеолитической системы, чем у рода *Pediococcus*. Наиболее эффективным деструктуром по результатам проведенного исследования выступает штамм *Lactobacillus. sakei* 103. Бактерии рода *Staphylococcus* также оказывают заметное воздействие на белковый профиль мышцы *longissimus dorsi* КРС, в разной мере подвергая гидролизу и саркоплазматические, и миофибриллярные белки. Значительное влияние данный род бактерий оказывает на миозин, актин и тропонины.

На основании наиболее эффективных в отношении протеолиза штаммов была сформирована бактериальная композиция, которую также использовали для ферментации мышечной ткани *longissimus dorsi* КРС. Анализ протеома показал усиливающий эффект от совместного применения бактерий рода *Pediococcus, Lactobacillus* и *Staphylococcus* – наиболее полно происходила деструкция всех мышечных белков, что, в свою очередь, будет способствовать улучшению органолептических и функциональных свойств мясных продуктов, в т. ч. образованию биопептидов.

Показано, что молочнокислые бактерии и денитрифицирующие стафилококки стартовых культур влияют на протеомную картину ферментированных субстратов, обладая как видоспецифической, так и штаммоспецифической протеолитической активностью. Для выбора стартовых культур, потенциально способных образовывать биологически активные пептиды в мясной системе, необходимо осуществить следующие этапы: подтвердить идентификацию штамма биохимическими и молекулярно-генетическими методами; определить протеолитическую активность стартовых культур; определить наличие генов семейства Prt, ответственных за протеолитическую активность штаммов; провести ферментацию мясного сырья; провести протеомные исследования ферментированного мясного сырья; провести анализ результатов и отбор перспективных стартовых культур.

The study was financed by the grant of the Russian Scientific Foundation (Project No.16–16–10073П)

ЛИТЕРАТУРА

1. D.A. Afanas'ev, N.G. Mashentseva, I.M. Chernukha, *Food Industry*. 4, 20–22 (2019).
2. M. Chernukha, N.G. Mashentseva, D.A. Afanas'ev, *Meat Technologies*. 2, 42–46 (2020).
3. M.G. Venegas-Ortega et al. Nev´arez-Moorill´on, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 18, 1039–1051 (2019).
4. S. Fadda, et al., *Applied and Environmental Microbiology*. 65(8), 3540–3546 (1999).
5. S. Fadda, et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(2), 578–584 (1999).
6. A.L. Basso, et al. *Journal of Food Biochemistry*. 28, 195–212 (2004).
7. G. Mauriello, A. Casaburi, F. Villani, *J Appl Microbiol*. 92(3), 482–490 (2002).
8. U. Dalmış, A. Soyer, *Meat Sci*. 80(2), 345–354 (2008).
9. M. Chernukha, et al. IOP Conf. Ser.: *Earth Environ. Sci*. 333, 012049 (2019).
10. S. Abbasiliasi, et al. *BMC Microbiol*. 17(1), 121 (2017).
11. M. Montemurro, G. Celano, M. De Angelis, M. Gobbetti, C.G. Rizzello, E. Pontonio, *Food Microbiol*. 90, 103491 (2020).
12. X. Nie, S. Lin, Q. Zhang. *Food Chem*. 145, 840–4 (2014).
13. M.A. de Almeida, et al. *Food Res Int*. 109, 368–379 (2018).
14. M.J. Benito, A. Martín, E. Aranda, F. Pérez-Nevado, S. Ruiz-Moyano, M.G. Córdoba, *J Food Sci*. 72(6), M193–201 (2007).
15. G. Johansson, J.L. Berdagué, M. Larsson, N. Tran, E. Borch, *Meat Sci*. 38(2), 203–18 (1994)
16. Sánchez-Rivera, Martínez-Maqueda D., Cruz-Huerta E., Miralles B., Recio I. Food Res. Int. 63, 170–181 (2014).
17. L. Mejri, R. Vásquez-Villanueva, M. Hassouna, M.L. Marina, M.C. García, *Food Res Int*. 100(1), 708–716 (2017).

УДК 663:665.939.358

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ НАПИТКИ И ДЕСЕРТЫ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТСОДЕРЖАЩЕГО БИОГЕЛЯ ИЗ ЛАМИНАРИИ «ВИТАЛЬГАР КАРДИО»

Л.Х. Котельникова[1], А.В. Подкорытова[1], А.Н. Рощина[1], И.А. Шашкина[2]

[1] ЦА ВНИРО, Москва, Россия,
[2] ООО НПК «Вита-Ли», Дмитров, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Экологическая нагрузка на природу и человека возрастает с каждым годом, при этом качество пищевых продуктов снижается, что связано с ухудшением качества сырья. В связи с этим становится необходимым использовать в пищу натуральные пищевые продукты, сбалансированные по микронутриентам, содержащие БАВ различного спектра действия, положительно влияющие на функции органов и тканей человека [1]. Употребление такой продукции способствует не только нормальной жизнедеятельности организма, но и его эффективному восстановлению от возрастающих нагрузок, стрессов и последствий заболеваний. В этом ключе специализированные продукты питания (СПП) – биогели из ламинарии очень перспективны. Они имеют только натуральный состав (полное отсутствие ароматизаторов, красителей и консервантов), все компоненты, входящие в состав биогелей, находятся в биодоступной – органической форме, что крайне важно для полноценного усвоения комплекса полезных веществ организмом, так как это является определяющим фактором эффективности любого продукта [4]. Лечебно-профилактические биогели из ламинарии являются высокоэффективным средством, обладающим сорбционным, обволакивающим, антацидным свойствами, содержат органически связанный йод, альгинаты и др. [3, 4].

В настоящее время на предприятии ООО НПК «Вита-Ли» выпускают продукцию – биогели из ламинарии 8-ми наименований, но особое место среди них занимает «Витальгар Кардио» с магнием и калием, так это СПП диетического профилактического питания с полифункциональными свойствами [2, 3]. Изготавливают этот биогель из воздушно-сухих ламинарий (*Saccharina japonica)*. Этот продукт обладает биологически активными свойствами водорослевого биогеля, но является и источником микроэлементов калия и магния, важных для солевого баланса, нормальной деятельности опорно-двигательного аппарата, сердечной мышцы. Эти элементы необходимы для поддержания устойчивости структуры клетки в процессе их роста и регенерации, функционирования легких, полноценной работы ферментативных реакций организма и мн. др.

Биогели «Витальгар Кардио» с магнием и калием участвовали в проведении клинических исследований на базе ФГБУ «Государственного научного центра РФ Федерального медицинского биофизического центра имени А.И. Бурназяна». По результатам медицинских исследований установлено, что ежедневное употребление «Витальгар Кардио» в виде водных коктейлей (масса биогеля 50 г., воды 150 мл) в составе комплексного терапевтического лечения кардиологических больных с нарушениями сердечного ритма различного генеза дважды в день через два часа после завтрака и ужина в течение 30 календарных дней приводит к улучшению работы сердца, лучшему восстановлению больных после перенесенных заболеваний и в целом улучшает состояние организма. Курс употребления может доходить до 3 месяцев.

В связи с этим целесообразно изготавливать и выпускать серийно на основе «Витальгар Кардио» ассортимент напитков или десертов, которые удобны в употреблении и не выходят за рамки традиционного питания населения. Это позволит обеспечить население низкокалорийными, диетическими профилактическими, обогащенными БАВ продуктами, органолептические свойства которых улучшены натуральными вкусовыми добавками и не отличаются от традиционных, сбалансированных по биологически активным веществам [5].

Очевидно, что новые виды и формы продукции могут быть рекомендованы к употреблению широким массам детерминированных групп населения и сыграют определённую положительную роль в улучшении здоровья, качества жизни и увеличении её продолжительности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При разработке рецептурных композиций для получения водорослевых напитков и десертов использовали натуральные вкусо- и ароматообразующие компоненты: биогель «Витальгар Кардио» с калием и магнием (СПП диетического профилактического питания), изготовленный по ТУ 9284–004–42233132–16 на ООО НПК «Вита-Ли»; пищевые кондитерские ароматизаторы «Baker Flavors»: «Груша», «Персик», «Малина», «Манго», «Банан», «Земляника», «Клубника», «Зелёное яблоко»; пищевой кондитерский натуральный ароматизатор "Dolce Inside": «Апельсин»; натуральный «фруктовый» сахар (Фруктоза), изготовленный по ТУ 9197–010–72315488–2011; кислота лимонная пищевая (5 % – й раствор); вода питьевая. свежие ягоды и фрукты (манго, голубика, клубника); сахар; сливки 20 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Водорослевый биогель «Витальгар Кардио» с калием и магнием представляет собой гелеобразный продукт зеленовато-бурого цвета, имеющий запах свойственный свежедобытым водорослям. Его получают посредством модификации структуры альгинатов, находящихся в связанном состоянии в клеточных стенках и межклеточном пространстве тканей ламинарии. В таблице 1 показан химический состав, пищевая и энергетическая ценность водорослевого биогеля «Витальгар Кардио».

Таблица 1 – Химический состав, пищевая ценность и энергетическая ценность специализированного пищевого продукта «Витальгар Кардио» с калием и магнием

Пищевая ценность	г/100 г. готового продукта	г/50 г. готового продукта (рекомендуемая доза)	% РСП*
Белок	менее 0,5	менее 0,3	менее 0,3 %
Жир	менее 0,1	менее 0,1	менее 0,5 %
Углеводы (усвояемые)	1,2–1,4	0,6–0,7	-
Растворимые пищевые волокна (альгинаты)	2,4–2,6	1,2–1,3	50–65 %
Йод, не более	1000 мкг	500 мкг**	50–100 %***
Калий	400–1600 мг	200–800 мг	от 10 до 40 %
Магний	80–320 мг	40–160 мг	от 10 до 40 %
Энергетическая ценность	около 57,2 кДж/15,2 ккал	около 28,6 кДж/7,6 ккал	менее 0,2 %
% РСП* – процент от рекомендованного уровня суточной потребности согласно ТР ТС ЕАЭС 022/2011 и ** – «Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащем санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)»; *** – с учётом частичной усвояемости йода (15 %).			

Кроме того, «Витальгар Кардио» содержит клетчатку (до 3 %), минеральные микро- и макроэлементы, маннит, фукоидан, ламинаран и др., которые обладают рядом биологических активностей и благотворно влияют на организм человека.

Для получения ароматного и вкусного продукта было принято решение использовать натуральные ароматизаторы, в связи с тем, что свежие фрукты и ягоды трудно зафиксировать в цвете (темнеют), что искажает потребительскую привлекательность продукта. Предполагалось сделать следующие продукты готовые к непосредственному употреблению: вязкой текучей консистенции (наподобие киселя) – напитки и десерты (муссы) – с консистенцией сметаны (вязкой, не текучей).

Технология получения напитков из биогеля «Витальгар Кардио»

Экспериментально были подобраны соотношение биогеля и воды для получения требуемой консистенции, ГМ составил – 1:3 (биогель: вода), а также соотношения остальных компонентов подбирались дозированно. В работе применялись натуральные ароматизаторы: зеленое яблоко (1), персик (2), малина (3), манго (4), апельсин (5), банан (6), земляника (7), клубника (8), груша (9). Ароматизаторы добавлялись в минимальном количестве для обеспечения устойчивого приятного аромата. Расчётные данные, используемые при составлении рецептурных композиций, представлены в таблице 2.

Технология приготовления напитков представлена на рисунке 1. Технологический процесс состоит из следующих операций: 1. Подготовка необходимого количества биогеля комнатной температуры. 2. Подготовка необходимого количества питьевой воды и фруктозы. 3. Приготовление раствора фруктозы. 4. Смешивание компонентов и их гомогенизация. 5. Термообработка при температуре не ниже 75ºС не менее 30 мин. Фасование готового продукта.

Фасовку проводили в полимерные бутылки объемом 200 мл, pH готового продукта 4,5–5,0.

Таблица 2 – Рецептуры водорослевых напитков из биогеля «Витальгар Кардио»

Наименование компонента	Содержание компонента, г/200 г. продукта в рецептуре напитка								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Биогель «Витальгар Кардио»	45,76	45,51	45,14	45,08	44,86	45,12	42,39	45,40	42,94
Фруктоза	7,02	7,03	7,02	7,01	7,06	7,01	7,00	7,07	7,00
Вода питьевая	146,8	147,1	147,4	147,4	147,5	147,3	150,1	147,1	149,6
Кислота лимонная пищевая (5 %)	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,3	0,4
Ароматизатор «Зелёное яблоко»	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
Ароматизатор «Персик»	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-
Ароматизатор «Малина»	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-
Ароматизатор «Манго»	-	-	-	0,075	-	-	-	-	-
Ароматизатор «Апельсин»	-	-	-	-	0,05	-	-	-	-
Ароматизатор «Банан»	-	-	-	-	-	0,075	-	-	-
Ароматизатор «Земляника»	-	-	-	-	-	-	0,09	-	-
Ароматизатор «Клубника»	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-
Ароматизатор «Груша»	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04
ИТОГО	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0

Таблица 3 – Рецептуры водорослевых десертов на основе биогеля *«Витальгар Кардио»*

Наименование компонента	№ рецептуры		
	1	2	3
	Массовая доля компонентов, г / 200 г.		
Биогель «Витальгар Кардио»	32,65	34,04	31,87
Манго	75,21	-	-
Клубника	-	73,46	-
Голубика	-	-	74,48
Сахар	3,51	6,80	6,82
Вода	63,31	61,22	62,02
20 % сливки	25,32	24,48	24,81
Итого	200,0	200,0	200,0

Оценивали органолептические характеристики после хранения напитков в течение 3 недель при температуре +5ºС на рабочем заседании дегустационного совета лаборатории ВНИРО. Предварительно была установлена безопасность продуктов по микробиологическим показателям. Органолептические свойства напитков оценивали по показателям: внешний вид, цвет, вкус, запах, консистенция. Напитки «Витальгар Кардио» в ассортименте имеют буро-зеленый цвет, свойственный водорослевому биогелю; однородную, слабовязкую, киселеобразную консистенцию; приятный аромат (кол-во ароматизатора минимально допустимое), свойственный соответствующим фруктам и доброкачественный, свойственный свежим водорослям вкус с легким привкусом соответствующих фруктов.

Технология получения десертов из биогеля «Витальгар Кардио»

Экспериментальным путём были подобраны рецептуры десертов (муссов) из биогеля «Витальгар Кардио». Результаты вычислений массовых долей компонентов, входящих в состав рецептурной смеси, представлены в таблице 3.

Технологический процесс состоит из следующих операций: 1. Подготовка необходимого количества биогеля комнатной температуры. 2. Подготовка необходимого количества ягод и фруктов (мойка, очистка, перетирание с сахаром). 3. Смешивание компонентов и гомогенизация. 4. Фасование готового продукта. Схема технологического процесса десертов из биогеля представлена на рис. 2.

Для получения заданной консистенции десертов серией опытов определено соотношение биогеля и воды равное 1:3. Сливки жирностью 20 % или молоко вливают тонкой струйкой холодными при непрерывном перемешивании.

Полученные десерты представляют собой гомогенную воздушную массу цвета, свойственного добавляемым ягодам и фруктам, приятного аромата и внешнего вида. Продукция получила одобрение на рабочем заседании дегустационного совета.

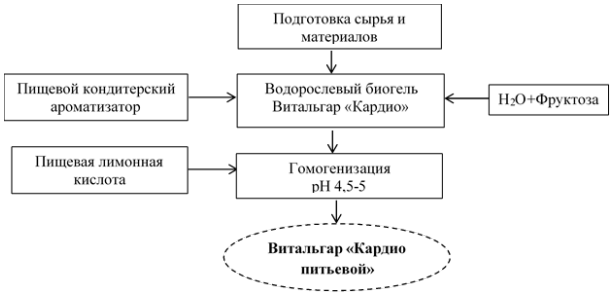


Рисунок 1. Схема технологического процесса напитков из биогеля

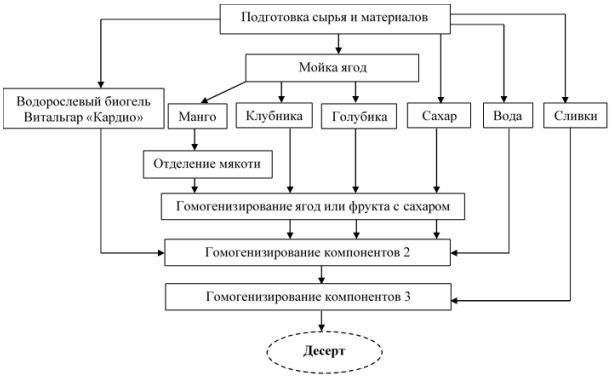


Рисунок 2. Схема технологического процесса десертов из биогеля

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные нами напитки и десерты с «Витальгар Кардио» имеют высокие органолептические показатели и рассматриваются как перспективные продукты для серийного производства. Напитки и десерты планируется выпускать небольшими объемами в упаковке (не более 200 мл), соответствующими разовому употреблению. Очевидно, что такая продукция, обладающая лечебно-профилактическими свойствами, должна пользоваться спросом населения. Применение натуральных вкусовых добавок, а также ягод и фруктов позволит расширить ассортимент пищевой продукции при производстве биогеля и его реализации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вафина Л.Х. Обоснование комплексной технологии переработки бурых водорослей (PHAEOPHYTA) при получении функциональных пищевых продуктов. автореф. дис. канд. техн. наук. – Москва, 2010. – 24 с.
2. Способ получения геля из ламинарии с экстрактом боярышника для диетического лечебно-профилактического питания: пат. 2620639 РФ / Подкорытова А.В., Вафина Л.Х., Шашкина И.А. и др. – опуб.:29.05.2017, Бюл. № 16.
3. Витальгар Кардио – новый специализированный пищевой продукт для применения в комплексной терапии больных при нарушении сердечного ритма / А.В. Подкорытова, А.А. Аветисян, И.А. Шашкина, В.Ю. Фирсакова, О.В. Дорохова // «Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры», 2019, Т. 96 (2), С. 130–131.
4. Официальный сайт Центра передовых технологий "ВИТА-ЛИ" // Электрон. дан. Режим доступа UNR: https://vita-li.ru (дата обращения 29.07.2020).
5. Вафина Л.Х, Подкорытова А.В. Новые продукты функционального питания на основе биоактивных компонентов бурых водорослей / Известия ТИНРО. – 2009. – Т. 156 – С. 348–356.

УДК 636.085

ОСОБЕННОСТИ СОЗДАНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ КОРМОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

М.В. Лукьяненко

Краснодарский НИИ хранения и переработки сельскохозяйственной продукции, Краснодар, Россия

Актуальным вопросом животноводства в условиях современной России является создание кормов и кормовых добавок, способствующих поддержанию здоровья сельскохозяйственных животных и повышению их продуктивности. При этом, формирование комплексных кормовых продуктов предполагает расчёт их сбалансированности по питательным веществам [1, 2].

Например, белковым обогатителем для зерна сои при производстве экструдированных кормов для разных видов и возрастов животных является кукуруза [3]. Кроме традиционных способов обогащения кормов белком существуют способы применения микробной биомассы [4]. Питательной средой для производства кормового белка может служить молочная сыворотка [5].

Следует отметить, что создание сбалансированного кормового рациона ещё не обеспечивает его эффективное использование, что может зависеть от степени усвояемости кормов. Так, если корма заражены плесневыми грибами, то наряду с питательными веществами в организм животных попадают и контаминанты, снижающие общее состояние, вызывающие аллергические реакции, псевдо пневмонию, расстройство пищеварительной и репродуктивной систем, снижение иммунитета и другие. Не стоит забывать, что в кормах могут присутствовать не только плесневые грибы, но ряд других вредных веществ. Именно поэтому, создание комплексных кормовых концентратов, действие которых направлено на нейтрализацию негативных последствий вредных веществ имеют особую значимость.

Основным барьерным органом, участвующим в обезвреживании поступающих в организм токсинов является печень. Снижение нагрузки на печень позволяет не только улучшить её состояние, но и оказать общее укрепляющее действие на организм, так как именно в печени вырабатывается большое число гормонов и других регуляторных веществ. Другими словами, при создании комплексных кормовых концентратов необходимо применять вещества, обладающие гепатопротекторными свойствами.

Помимо печени в достаточной степени нагрузка ложится на желудочно-кишечный тракт, посредством диффузии загрязнителей и поступления в организм патогенной микрофлоры [6]. Естественным образом решить вопрос заселения организма патогенной микрофлоры можно введением в рацион пробиотической микрофлоры, такой как *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheneformis*, способной выживать в условиях желудка [7, 8].

Новорожденные поросята, пищеварительный тракт которых считается менее зрелым, ввиду отсутствия амилолитических ферментов и соляной кислоты и низкого содержания пепсина особо нуждаются в поддержании желудочно-кишечного тракта. При введении в рацион поросят-отъёмышей в возрасте двух месяцев пробиотиков «Олин» и «Ветом 1.1», в состав которых входят указанные выше микроорганизмы, всего за 10 кормления заметно повышается содержание полезной микрофлоры на фоне снижения патогенной [7].

Если предположить, что комплексный кормовой концентрат, позволяющий повысить эффективность применения сбалансированных кормов, будет содержать в своём составе одновременно гепатопротекторные компоненты и пробиотики, то для разработки рецепта необходимо учитывать оптимальные условия жизнедеятельности микроорганизмов и достижение сохранности готового продукта.

В Краснодарском НИИ хранения и переработки сельскохозяйственной продукции был разработан кормовой витаминно-минеральный концентрат «Тетра+» («Тетра+»), чьи гепатопротекторные свойства неоднократно доказаны при кормлении разных видов сельскохозяйственных животных. Эти свойства достигаются за счёт синергетического эффекта составляющих – биологически активных веществ (витаминов С и Е, бета-каротина, растительных фосфолипидов и селена).

При разработке комплексного кормового концентрата за основу был взят «Тетра+». Поскольку указанные биологически активные вещества растворены в растительном (подсолнечном) масле, что препятствует свободной аэрации в слое «Тетра+», а также снижению воздухопроницаемости комплексного кормового концентрата, это обстоятельство необходимо учитывать при выборе пробиотиков. Растворение биологически активных веществ в масле происходит при нагреве до 60–80 °С. В дальнейшем охлаждённая смесь наносится на прошедшие термическую обработку пшеничные отруби – носитель. Получаемый «Тетра+» имеет однородную сыпучую консистенцию.

Пробиотики подбирали из уже апробированных на сельскохозяйственных животных, реализуемых в торговой сети, кормовых пробиотических добавок, содержащих как один, так и несколько штаммов микроорганизмов. Для решения узких задач, например, «разгон» рубца у телят можно применять пробиотики, включающие один штамм микроорганизмов. В случае решения сразу нескольких задач, например, для повышения естественной резистентности организма животных, нормализация деятельности желудочно-кишечного тракта, стимуляции обменных процессов, повышения усвояемости кормов, нейтрализация поступающих в организм токсинов и других, потребуется уже пробиотики, состоящие из нескольких штаммов микроорганизмов.

В своей работе мы остановили выбор на кормовой пробиотической добавке «Целлобактерин+», в которой содержится *Enterococcus faecium* ВКПМ В-3491, наполнителем при этом может являться отруби пшеничные, шрот подсолнечный или цеолит. Энтерококки являются естественной микрофлорой сельскохозяйственных животных и птицы, факультативными анаэробами, оптимальная для жизнедеятельности температура 37–45 ℃, могут выдерживать нагревание до 60 ℃ в течение 30 минут, осуществляют метаболизм бродильного типа с образованием, преимущественно молочной кислоты, понижая, при этом, кислотность до 4,2–4,6 [9].

Нами была выбрана пробиотическая добавка «Целлобактерин+», в качестве наполнителя в которой, применялись пшеничные отруби (фото на рисунке 1).



Рисунок 1. Внешний вид пробиотической добавки «Целлобактерин+»

Ввиду того что, наполнителем как «Тетра+», так и пробиотической добавки «Целлобактерин+» являются пшеничные отруби, в качестве наполнителя при производстве комплексного кормового концентрата можно применять пробиотическую добавку «Целлобактерин+». В таком случае растворённые в растительном масле биологически активные вещества будут напрямую соприкасаться живыми бактериями *Enterococcus faecium* ВКПМ В-3491. Маслянистая фракция, обволакивая частицы пробиотической добавки «Целлобактерин+», образует на поверхности плёнку, препятствующую доступу кислорода.

Тот факт, что энтерококки могут выживать при малых количествах кислорода, говорит о возможности их применения в производстве комплексного кормового концентрата, содержащего маслянистую фракцию.

При смешивании указанных компонентов в диапазоне соотношений 1:1 ÷1:5 (маслянистая фракция биологически активных веществ: пробиотическая добавка «Целлобактерин+») оказалось, что выживаемость микроорганизмов наблюдается при любом соотношении компонентов в заданном диапазоне. С технологической точки зрения, важно получить продукт, имеющий стабильную консистенцию. С этой целью были исследованы образцы комплексного кормового концентрата, которые сразу после его приготовления имели однородную рассыпчатую консистенцию. Оптимальными, при этом, для свежеприготовленного комплексного кормового концентрата оказались соотношения – 1:1 и 1:2. Для проверки стабильности консистенции наблюдения проводили в течение 1 часа, результат зафиксирован на фото (рисунок 2).

Структура образца комплексного кормового концентрата с соотношением 1:2 спустя 1 час оставалась стабильной, в то время как из образца комплексного кормового концентрата с соотношением 1:1 выделялось масло. Таким образом, для производства комплексного кормового концентрата увеличение доли маслянистой фракции больше, чем соотношение 1:2 не целесообразно.

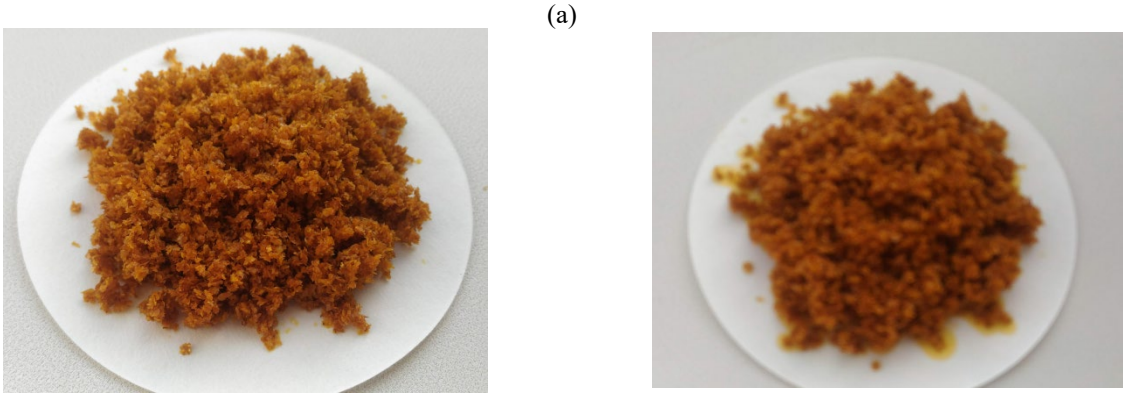
На основании представленного выше, можно сделать вывод о том, что при создании комплексных кормовых концентратов в первую очередь необходимо озадачиться тем, какую функцию будет выполнять получаемый продукт. В случае, если основной функцией комплексного кормового концентрата является повышение усвояемости пищевого рациона, что необходимо определиться какие механизмы буду использованы для этого: будет ли использована пробиотическая микрофлора с целью расщепления грубых кормов или, наряду с повышением доступности пищевых компонентов, необходимо повысить защитные силы организма. Во втором случае тоже может быть использована пробиотическая микрофлора, так как в процессе своей жизнедеятельности она вырабатывает витамины, органические кислоты и ряд других физиологически важных компонентов, является естественным антагонистом патогенной микрофлоры.

Однако, наиболее эффективным будет использование и пробиотической микрофлоры, и биологически активных веществ, обладающих гепатопротекторными свойствами. В таком случае, при разработке комплексного кормового концентрата важным является выявить сочетаемость выбранных компонентов и оптимальные их соотношения.



1 2

(а)



1 2

(б)

Рисунок 2. Внешний вид комплексного кормового концентрата, приготовленного при разных соотношениях масляной композиции и «Целлобактерин+»: а) ККК, приготовленный при соотношении МК:«Целлобактерин+» 1:1 б) ККК, приготовленный при соотношении МК:«Целлобактерин+» 1:2; 1 – свежеприготовленный; 2 – через 1 час после приготовления

ЛИТЕРАТУРА

1. Разработка научно-обоснованной рецептуры кормовой добавки лечебно-профилактического действия для сельскохозяйственных животных / Ж.С. Алимкулов, и др. // Вестник ЮУрГУ. 2020. Т. 8, № 2. С. 5–12.
2. Об эффективности организации кормовой базы молочного скотоводства в Краснодарском крае / Кремянская Е.В., Кремянский В.Ф., Кремянский В.В. и д.р. // Вестник алтайской академии экономики и права. – 2019. – № 4. – С. 66–71.
3. Влияние значимых факторов на критерии оптимизации процесса производства соево-кукурузного кормового концентрата / Шишкин В.В., и др. // Дальневосточный аграрный вестник. 2018. № 1(45). С. 88–93.
4. Биотехнология получения микробного белка на комплексном растительном сырье / К.М. Омарова, М.С. Омаров // Наука и образование Большого Алтая. – 2016. – Вып. 2. – С. 65–69.
5. Пат. РФ 2652155 Способ производства функционального кормового продукта для сельскохозяйственных животных / Неронова Е.Ю., и д.р // заяв. И патентообл. Вологодская государственная молочнохозяйственная академия им. Н.В. Верещагина, Опубл. 25.04.2018, Бюл. 12., 10 с.
6. Никифорова, Н.Г. и др. Основы эндоэкологии [Текст] : учебно-методическое пособие , 2012. – 29 с.
7. Влияние пробиотиков на количественный и качественный состав кишечной микрофлоры у поросят-отъемышей / Шулепова И.И., Железняк М.П. // Аграрный вестник Приморья. – 2018. – № 3(11). – С. 50–53.
8. Механизмы действия пробиотических препаратов на организм, перспективы использования в свиноводстве / И.В. Аникиенко, О.П. Ильина, Л.Н. Карелина, И.И. Силкин // Вестник ИрГСХА. – 2018. – Вып. 84. – С. 126–135.
9. Разработка пробиотического препарата для животных с использованием ассоциации *Bacillus subtilis* и *Enterococcus faecium* / Н.А. Ушакова, и др. // Успехи современной биологии. – 2011. – Том 131. – № 1. – С. 95–101.

УДК 664.6

ВЛИЯНИЕ ПОРОШКА ИЗ ВЁШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ НА БРОДИЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ

А.В. Маслов, З.Ш. Мингалеева, О.В. Старовойтова, Л.И. Агзамова, О.А. Решетник

Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия

Качество хлебобулочных изделий определяется способностью хлебопекарных дрожжей усваивать моно- и дисахариды с выделением диоксида углерода, разрыхляющего тесто, этанола и других продуктов, формирующих вкус и аромат готовых продуктов [1]. Предварительная активация дрожжей повышает активность их бродильных ферментов, что позволяет уменьшить время брожения тестового полуфабриката и повысить качество готовых хлебобулочных изделий [2].

Цель настоящей работы состояла в исследовании возможности применения порошка из вёшенки обыкновенной в составе питательной среды для проведения предварительной активации прессованных хлебопекарных дрожжей на основе определения их бродильной активности.

Порошок получали путем сушки грибов вёшенок в вибрационной вакуумной сушилке-мельнице [3]. Дрожжи активировали в питательной среде, содержащей измельченные прессованные дрожжи и порошок из вёшенки обыкновенной в соотношении 1,0:0,5, 1,0:1,5 и 1,0:2,5. Влажность питательной среды составляла 70 %. Выдержку дрожжей в питательной среде проводили в течение 30 мин. Данные по влиянию порошка из вёшенки обыкновенной на подъемную силу, зимазную и мальтазную активности прессованных дрожжей приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние порошка из вёшенки обыкновенной на подъемную силу, зимазную и мальтазную активности прессованных дрожжей

Наименование показателя	Соотношение дрожжей и порошка из вёшенки обыкновенной в питательной среде			
	Контроль	1,0:0,5	1,0:1,5	1,0:2,5
Подъемная сила	11,58 ± 0,15	11,24 ± 0,24	10,18 ± 0,09	9,49 ± 0,54
Зимазная активность, мин	41,30 ± 0,67	22,68 ± 0,13	19,38 ± 0,08	17,29 ± 0,19
Мальтазная активность, мин	134,35 ± 2,15	61,17 ± 2,82	46,54 ± 1,61	42,62 ± 1,27

Данные таблицы 1 демонстрируют, что при соотношениях дрожжей и порошка из вёшенки обыкновенной 1,0:0,5, 1,0:1,5 и 1,0:2,5 подъемная сила возрастала по сравнению с контролем на 2,94 %, 12,09 % и 18,05 %, зимазная активность – на 45,08 %, 53,08 % и 58,14 %, а мальтазная активность – на 54,47 %, 65,36 % и 68,28 %, соответственно. Следовательно, увеличивалась бродильная активность прессованных дрожжей, предварительно активированных в питательной среде, содержащей исследуемый порошок, что свидетельствует об интенсификации процессов энергетического обмена дрожжевых клеток. Полученные данные можно объяснить содержанием в исследуемом порошке веществ, которые необходимы дрожжам при перестройке их ферментаивного комплекса с дыхания на брожения.

Таким образом, результаты исследований показали, что порошок из вёшенки обыкновенной может быть использован в качестве компонента питательной среды для проведения предварительной активации дрожжей.

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. Старовойтова, О.В. Влияние комплексного улучшителя на хлебопекарные свойства муки и бродильную активность дрожжей / О.В. Старовойтова, Е.Л. Киляков, З.Ш. Мингалеева и др. // Вестник Казанского технологического университета. – Т. 15. – № 14. – 2012. – С. 196–198.

3. Дубкова, Н.З. Получение пищевых порошкообразных продуктов из растительного сырья [Текст]: дис. канд. тех. наук: 05.18.12. – Казань, 2001. – 154 с.

УДК 664.38: 644.53

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

И.С. Гайворонская[1], В.В. Колпакова[1], Л.В. Чумикина[2]

[1] Всероссийский научно- исследовательский институт крахмалопродуктов, Россия
[2] Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение численности населения планеты позволяет экспертам уже сегодня спрогнозировать прогрессирующий дефицит белковой пищи. Дефицит белка на планете оценивается в 10–25 млн. т в год. Приблизительно половина населения планеты страдает от недостатка белка. Нехватка пищевого белка является не только экономической, но и социальной проблемой современного мира [1]. Биотехнологические процессы с использованием микроорганизмов пока не имели успехов в получении новых, альтернативных источников обязательного и ценного компонента пищи. Это резко повышает роль природных белков, усиливает значимость наукоемких технологических процессов в их получении и использовании в виде новых форм. Растительный рацион, содержащий полноценный белок в необходимом количестве, может быть создан на основе использования белковых препаратов, полученных из белоксодержащих источников различного химического состава и биологической ценности. Большинство злаковых культур дефицитные по лизину, одной из важнейшей из незаменимых аминокислот в питании человека, в то время как бобовые содержат эту аминокислоту в достаточном количестве. С другой стороны, белки злаковых культур способны дополнять белки бобовых и пасленовых дефицитной аминокислотой метионином [2]. Наряду с соевыми белками, при соответствующих функциональных свойствах, гороховые рисовые и овсяные белки так же можно успешно использовать для обогащения и повышения биологической ценности пищевых продуктов [3]. При использовании ферментного препарата трансглютаминазы для биосинтеза композитных белковых продуктов повышенной биологической ценности с технологической точки зрения важным может быть и различное содержание свободных аминогрупп в использованных растительных препаратах. Добавление белков с высоким содержанием свободных аминогрупп, в частности лизиновых, к белкам с низким их количеством будет увеличивать реактивность последних [4] и формировать модули с заданным составом и функциональными свойствами.

Цель работы – оптимизация параметров биосинтеза мульти-белковых полимеров на основе горохового белка с подбором состава композиций на основе данных аминокислотного состава для поступления полноценного белка в организм человека и расширения использования данного белкового продукта в производстве пищевых изделий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве основных материалов использовали белковые концентраты: гороховый (Roquette, Франция), рисовый (Beneo, Бельгия), а так же овсяный (Tate&Lyle, Швеция). Химический состав белковых препаратов представлен в таблице 1. В качестве энзима использовали ферментный препарат (ФП) трансглютаминазу «классическую» (ТГ) (Novozymes, Дания).

О протекании реакции с ферментом трансглютаминазой между белками различной химической природы делали вывод по количеству выделившегося аминного азота. Аминный азот определяли методом формольного титрования. Для этого к 10 г. ферментированной смеси белковых концентратов, взятыми при определенных соотношениях, добавляли 50 $см^3$ дистиллированной воды, затем смесь диспергировали 4–5 минут при 500 $мин^{-1}$. Смесь центрифугировали при 5500 $мин^{-1}$ в течение 20 минут.

Надосадочную жидкость сливали, отбирали из нее 5 $см^3$ и переносили в стеклянный стакан для измерения pH с 20 $см^3$ дистиллированной воды. Электроды pH-метра погружали в исследуемую суспензию. Нейтрализацию свободных карбоксильных групп проводили 0,05н раствором NaOH. Щелочь добавляли при помешивании, следя за показаниями потенциометра. Когда pH раствора достигало 7, к нему добавляли 0.5 $см^3$ формольной смеси с фенолфталеином (50 $см^3$ 40 %-ного формалина + 2 $см^3$ 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина). Смесь титровали 0.05н раствором NaOH до pH 9.1–9.5, что соответствовало ярко-красному окрашиванию пробы. Все реактивы были химически чистые.

Таблица 1. Химический состав белковых продуктов

Белковый продукт	Влага, %	Белок, %	Жир, %	Клетчатка, %	Углеводы, %
гороховый	10,0	84,0	5,0	1,0	0
рисовый	12,0	79,0	5,0	3,2	6,0
овсяный	6,0	56,0	3,0	2,0	18,0

Аминный азот (в мг/%) (N) рассчитывали по формуле: N = A*0.7*100 / V, где: A – количество $см^3$ 0.05н NaOH, пошедшее на титрование; V – количество раствора для титрования; 0.7-количество азота в г, соответствующее 1 $см^3$ 0.05 н раствора NaOH.

Для приготовления двухкомпонентных ферментированных композиций навески белковых продуктов при их определенных соотношениях смешивали на мешалке со скоростью 500 $мин^{-1}$. Навески ФП трансглютаминазы помещали в микробиологическую пробирку с крышкой, добавляли количество дистиллированной воды, в соответствии с заданным гидромодулем, интенсивно перемешивали и добавляли 1 г смеси белковых продуктов. Пробирки помещали в термостат, встряхивали при 170 $мин^{-1}$ и температуре 50 °С и проводили реакцию взаимодействия белков при различном времени ее протекания и различной концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью программы, разработанной нами на основе метода подсчета Монте-Карло были составлены композиции белков с улучшенным аминокислотным профилем. При расчете использованы данные аминокислотного состава белковых продуктов для предполагаемых смесей, данные для эталонного белка базируются на рекомендациях ФАО ВОЗ 2011 г. [5]. Для концентратов горохового и овсяного белка оптимальное соотношение белков в композиции составило 1:1 (таблица 2), для концентратов горового и рисового белка – 1:0,6 (таблица 2). Данные соотношения обеспечивали оптимальный скор аминокислот и являлись экономически целесообразными.

Таблица 2. Аминокислотный скор белков композиций из белковых концентратов, %

Показатели		Белковый концентрат		Белковые композиции	
	ГОРОХ	ОВЕС	РИС	ГК/ОК	ГК/РК
Массовая доля белка, %	84.0	56,3	79.5	70.2	81.8
Аминокислоты	Скор, %				
Валин	125	65	137	132	157
Лейцин	134	62	124	135	158
Изолейцин	156	62	113	149	170
Треонин	152	56	176	142	196
Лизин	148	33	147	117	141
Триптофан	151	103	136	181	177
Метионин+ цистин	47	82	147	101	105
Фенилаланин+ тирозин	224	113	176	234	256
Примечание: ГК-гороховый концентрат, ОК-овсяный концентрат, РК-рисовый концентрат					

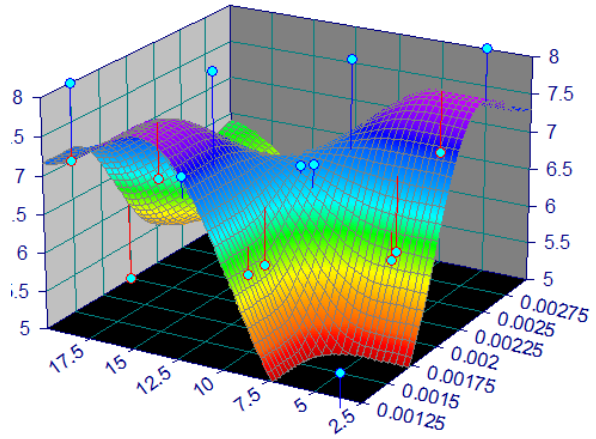
Данные показывают, что самые высокие значения аминокислотного скора всех кислот имел рисовый концентрат, самые низкие – овсяный, у горохового концентрата недостаточное количество серусодержащих аминокислот, что не противоречит литературным данным. Аминокислотный состав белковых композиций с гороховым белком, по сравнению с индивидуальными образцами, значительно улучшался за счет рисового и овсяного концентратов. Особенно ценно это увеличение у всех двухкомпонентных композитов для метионина и цистеина [6]. Наиболее сбалансированными явился композит состава ГК/РК, наименее – композит состава ГК/ОК.

Учитывая, что в реакциях с участием трансглютаминазы происходит перенос аминогрупп – NH_2 между молекулами с образованием новых ковалентных связей, то количество аминного азота в исследуемых системах уменьшается, поэтому по количеству непрореагировавших аминогрупп можно судить о протекании процесса синтеза между различными видами белков. Для получения результатов по влиянию различных факторов на содержание аминного азота для композиции гороховый белок – овсяный белок использованы методы математического планирования эксперимента. pH – 6.8–7.0 (const), температура 50 °C (const). Время экспозиции (X3) изменяли в интервале 5÷20 мин, гидромодуль (X1) – в диапазоне 1: до 1:8, концентрацию ФП (X2) – от 0.0015 до 0.003 U/g белка.

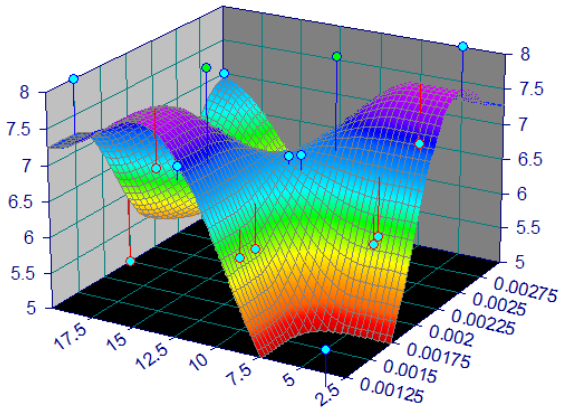
По данным эксперимента с помощью программы TableCurve 3D построены поверхности отклика для аминного азота (рис. 1). Обработка данных в программах Matematika и Table Curve 3D

Для получения результатов по влиянию различных факторов на содержание аминного азота для композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат использованы методы математического планирования эксперимента. С учетом данных, полученных в ходе эксперимента гороховый концентрат – рисовый концентрат выбраны наиболее эффективные параметры реакции: pH – 6.8–7.0 (const), температура 50 °C (const). Время экспозиции (X3) изменяли в интервале 5÷20 мин, гидромодуль (X1) – в диапазоне 1:5 до 1:8, концентрацию ФП (X2) – от 0.0015 до 0.003 U/g белка.

По данным эксперимента с помощью программы TableCurve 3D построены поверхности отклика для аминного азота (рис. 2). Обработка данных в программах Matematika и Table Curve 3D.



$Y = 7.4865 + 149X_1 + 0.0335X_2\text{-}0.1145X_3$



$Y = 7.5775 + 567X_1 + 0.0245X_2\text{-}0.2555X_3$

где x – концентрация ФП U/g белка; y – время экспозиции, мин; z – обратный гидромодуль

Рисунок1 Зависимость количества аминного азота от параметров реакции для композиции гороховый концентрат-овсяный концентрат

Рисунок 2 Зависимость количества аминного азота от параметров реакции для композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат

Для композиции горохового концентрата с овсяным белком закономерности изменения количества аминного азота в процессе реакции были аналогичные закономерностям, характерным для композиции гороховый концентрат-рисовый концентрат. Минимальное количество аминного азота после реакции с ТГ в композиции гороховый концентрат – овсяный белок наблюдалось в реакционной среде при концентрации 0.0015 г./г белка, времени экспозиции 15 минут и гидромодуле 1:7. Минимальное количество аминного азота после реакции с ТГ в композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат наблюдалось в реакционной среде при концентрации 0.0015 г./г белка, времени экспозиции 20 минут и гидромодуле 1:8.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТГ благодаря своим уникальным свойствам достаточно широко применяется в мясной и молочной промышленности для агрегации белковых молекул при производстве реструктурированных продуктов из сырья различного качества [7–9]. Фермент безопасный, продуцируется недорогими источниками биосинтеза, что делает широким его применение.

Значительно меньше ТГ используется в производстве выпеченных изделий (хлеб, печенье) [4,10,11] и единичные исследования известны для получения композиций из растительных белков [12].

С помощью программы, разработанной на основе метода подсчета Монте-Карло составлены композиции белковых концентратов с улучшенным аминокислотным составом. С учетом массовой доли белка и аминокислотного состава концентратов определены их соотношения и аминокислотный скор для композитов состава белок-белок, полученных из различных видов растительного сырья (гороха, овса, риса). Композиты обогащены лизином, треонином, серосодержащими аминокислотами относительно зерновых и зернобобовых культур. С использованием биотехнологической реакции при участии фермента класса трасфераз (трансглютаминазы) получены биокомпозиты состава: гороховый концентрат – овсяный концентрат, гороховый концентрат – рисовый концентрат Экспериментальным путем с применением метода формольного титрования по данным количества аминного азота, остающегося в реакционной среде, определены оптимальные параметры реакции: продолжительность ее протекания, гидромодуль, pH и концентрация ферментного препарата. Для композиции гороховый концентрат – овсяный концентрат минимальное количество аминного азота после реакции с ТГ наблюдалось в реакционной среде при концентрации 0.0015 г./г белка, времени экспозиции 15 минут и гидромодуле 1:7. Для композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат минимальное количество аминного азота после реакции с ТГ в композиции гороховый концентрат – рисовый концентрат наблюдалось в реакционной среде при концентрации 0.0015 г./г белка, времени экспозиции 20 минут и гидромодуле 1:8. Эти данные указывали на большую интенсивность протекания реакции синтеза новых форм белков. Композиции концентратов с гороховым белком не содержали дефицитных незаменимых аминокислот, скор максимально приближался к эталонному белку, либо был выше. Использованные растительные белки не входят в список основных аллергенов, благодаря чему представляется возможным использование полученных композиций при разработке продуктов специального и диетического питания. Дальнейшие исследования покажут какими функционально-технологическими свойствами будут обладать созданные белковые композиты и в каких пищевых изделия их можно будет использовать.

ЛИТЕРАТУРА

1. Донченко Л.В. Технология функциональных продуктов питания: учебное пособие для вузов – 2 изд, Москва, Юрайт, 2018 – стр. 101–102
2. Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N and Khan MS, Nutritional quality of important food legumes. Food Chem, 97:331–335 (2006)
3.Tömösközi S, Lásztity R, Haraszi R and Baticz O, Isolation and study of the functional properties of pea proteins. Nahrung/Food 45:399–401 (2001).
4. Marco C, Rosell CM. Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. Eur Food Res Technol. 2008; 227:1205–1213. doi: 10.1007/s00217–008–0838–6.
5. Dietary protein quantity evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation. – Rome: FAO, 2013–66pp.
6. Koehler P., Wieser H. Chemistry of Cereal Grains. In: M. Gobbetti and M. Gunzle (eds.). Handbook on Sourdough Biotechnology, 11. 2013. Chapter 2, Springer Science+Business Media New York. DOI 10.1007/978–1–4614–5425–0_2
7. Kuraishi C., Sakamoto J., Yamazaki K., Susa Y., Kuhara C., Soeda T. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. J. Food Sci. 1997. V. 62. pp. 488–490. doi: 10.1111/j. 1365–2621.1997.tb04412.x
8. Ozer B., Kirmaci H.A., Oztekin S., Hayaloglu A., Atamer M. Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. Int. Dairy J. 2007. V. 17. pp. 199–207. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.02.007
9. Lorenzen P.C., Neve H., Mautner A., Schlimme E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. Int. J. Dairy Technol. 2002. V. 55. pp. 152–157. doi: 10.1046/j. 1471–0307.2002.00065.x
10. Lorenzen P.C., Neve H., Mautner A., Schlimme E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. Int. J. Dairy Technol. 2002. V. 55. pp. 152–157. doi: 10.1046/j. 1471–0307.2002.00065.x
11. Kuraishi C., Yamazaki K., Susa Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. Food Rev. Int. 2001. V. 17. pp. 221–246. doi: 10.1081/FRI-100001258
12. Колпакова В.В., Гайворонская И.С., Гулакова В.А., Сарджвеладзе А.С., Композиция на основе растительных белков с использованием трансгютаминазы. Международная мультидисцилинарная научная гео-конференция SGEM, Албена, Болгария. 2018: 119–126

УДК 632.954

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕРБИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА

О.Д. Петровская

Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

Современное сельское хозяйство невозможно без применения средств защиты культурных растений (пестицидов). Гербициды составляют одну из самых больших групп пестицидов, используемых для защиты культурных растений от сорняков [1]. Большинство применяемых гербицидов не достигают намеченной цели, основная масса этих веществ аккумулируется в биологических объектах, загрязняет почвы, водоемы, вызывает гибель полезных организмов. Использование пестицидов для обработки сельскохозяйственных культур приводит к включению пестицидов в пищевые цепи, что определяет высокую опасность этих поллютантов для экосистем. Пестициды обладают репродуктивной токсичностью, тератогенной активностью, являются эндокринными дисрапторами, снижают активность гуморального иммунитета, обладают эпигенетической активностью [2].

В последние годы все больше внимания уделяется разработки препаратов с контролируемым выходом активного вещества за счет депонирования их в биоразрушаемые материалы [3]. Важнейшим компонентом создания таких препаратов является наличие соответствующих материалов со следующими свойствами: экологическая совместимость с окружающей средой, т. е. разлагаемость; безопасность для живой и неживой природы; длительное (недели и месяцы) присутствие в естественной среде и контролируемая деградация с последующим образованием нетоксичных продуктов; химическая совместимость с пестицидами и удобрениями; и обрабатываемость доступными методами, совместимыми с технологиями производства пестицидов и удобрений. Материалами, широко изучаемыми в качестве матриц для депонирования агрохимикатов, являются синтетические не разлагаемые полимеры или биоразлагаемыми матрицами и покрытиями. В естественной среде полимерные матрицы преобразуются почвенной микрофлорой в безвредные продукты для живой и неживой природы.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – биоразлагаемые полимеры микробиологического происхождения являются перспективными материалами для создания таких систем. Эти полимеры широко применимы в медицине, фармакологии, а также и в сельском хозяйстве, однако исследования по применению ПГА в сельском хозяйстве находятся еще на раннем этапе [4]. Свойства ПГА, такие как долгосрочная биоразлагаемость и возможность получения из них полимерных изделий в различных физических состояниях (порошки, растворы, расплавы) открывают им перспективу построения долгосрочных форм препаратов на их основе.

Цель работы – конструирование и исследование эффективности экспериментальных форм препаратов гербицидного действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы полимера П(3ГБ-со-3ГВ) были синтезированы с использованием штамма *Cupriaviduseutrophus* B10646 по авторской технологии [5].

Используемые пестициды: метрибузин [4-амино-6-трет-бутил-3-метилтио – 1,2,4 – триазин-5(4H) – OH] (далее МЕТ) является системным избирательным гербицидом из группы 1,2,4 – триазинонов. Механизм действия основан на ингибировании реакции Хилла (фотолиза воды) и фотосинтетического переноса электронов между первичным и вторичным акцепторами электронов фотосистемы II. Трибенурон-метил [метиловый эфир 2-[6-метил-4-метокси – 1,3,5 – триазин-2-ил(метил) карбомоилсульфамоил] бензойной кислоты] (далее ТРИБ) представляет собой системный селективный гербицид из группы сульфонилмочевин. Механизм действия основан на ингибировании фермента ацетолактатсинтазы, вовлечённого в биосинтез разветвленных незаменимых аминокислот, что приводит к нарушению синтеза белка и нуклеиновых кислот.

В качестве наполнителя полимераиспользовали березовые опилки, полученные измельчением древесины березы на деревообрабатывающем станке МД 250–85 («СтанкоПремьер», Россия).

Для получения форм гербицидов в виде гранул использовали сырую пасту полимера, увлажненную этанолом, смешанную с березовыми опилками и гербицидом с применением гранулятора Fimar (Италия). Соотношение компонентов вв формах было следующим: П(3ГБ)/опилки / герицид как 50/40/10 (вес.%).

Деградация гранулированных форм исследовали в почвенных микроэкосистемах. Для этого в контейнер с почвой помещали исследуемые формы в центр на глубину не более 1 см по три штуки в мешочке из органзы. Инкубировали в термостате при температуре 30 °С и при комнатной температуре (21 -23 °С) и 50 %. После инкубационного периода, гранулы изымали из почвы, очищали, и высушивали. Деградацию форм оценивали каждые две недели в течение 4-х месяцев весовым методом.

Для анализа почвенных проб использовали общепринятые микробиологические методы. Общую численность органотрофных бактерий определяли на мясопептонном агаре, численность микромицетов – на агаре Сабуро.

Гербицидную активность исследуемых форм изучали в почвенных микроэкосистемах пшеницы сорта «Новосибирская 15» (*Triticumaestivum*), засоренными Горчицей полевой (*Sinapis arvensis*). Почву помещали в пластиковые контейнеры объемом 700 см 3 и засевали семенами зерновых культур и сорных растений из расчета их всхожести. Одновременно в почву вносили гранулы с депонированным гербицидом. В качестве положительного контроля в почву вносили раствор свободных гербицидов в концентрации, рекомендованной для полевого применения. Растения выращивали в климатической камере (Фитотрон-ЛиА-2 (Россия). В ходе эксперимента регистрировали количество и высоту стебля сорняков и зерновых культур.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента были сконструированы экспериментальные формы в виде гранул (рисунок 1) содержащие П(3ГБ)/березовые опилки/ гербицид (метрибузин или трибенурон-метил) в соотношении 50/40/10 %. Масса гранул составляла 5–6 мг.



Рисунок 1 – Фото экспериментальных форм

Результаты деградации экспериментальных форм представлены на рисунке 2. Исследование биоразрушения экспериментальных форм в течении длительного эксперимента (4 месяца), показало их медленную деградацию и длительное функционирование в почве. Остаточная масса гранул составила около 75 % от изначального веса и не зависела от режима инкубации и вида депонированного гербицида.

Исследовано влияние депонированных препаратов на почвенные микроорганизмы (рисунок 3). Показано подавление органотрофных бактерий разработанными препаратами в первые 2 месяца при внесении экспериментальных форм с МЕТ более чем на 50 % независимо от режима инкубации, однако данный эффект не сохранился, и к концу эксперимента численность бактерий была на уровне контроля. Изменения численности микромицетов при обработки экспериментальными формами с МЕТ были незначительны. Внесение форм с ТРИБ практически не подавляло численность микроорганизмов в обоих вариантах эксперимента.

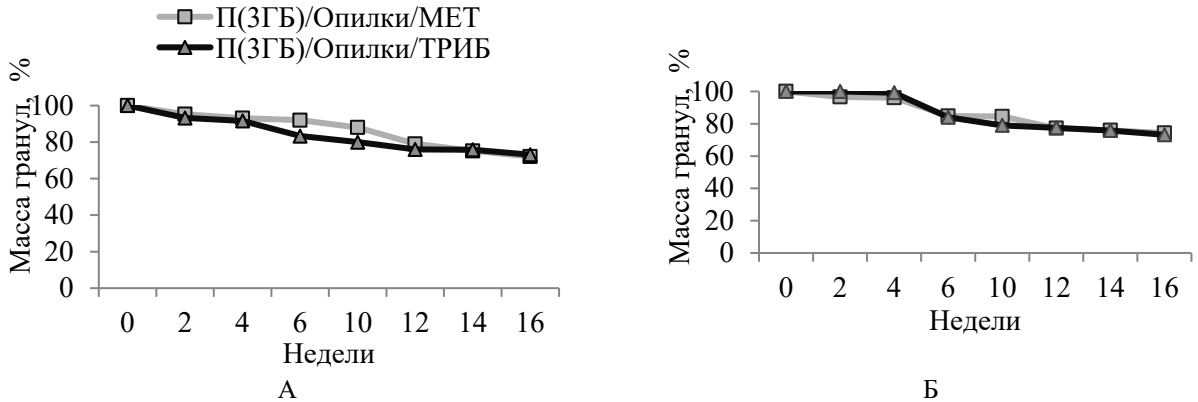


Рисунок 2 – Динамика изменения массы гранул П(3ГБ)/Опилки/МЕТ и П(3ГБ)/Опилки/ТРИБ в зависимости от условий инкубации: А- инкубирование при комнатной температуре; Б- инкубирование в термостате при 29 °С

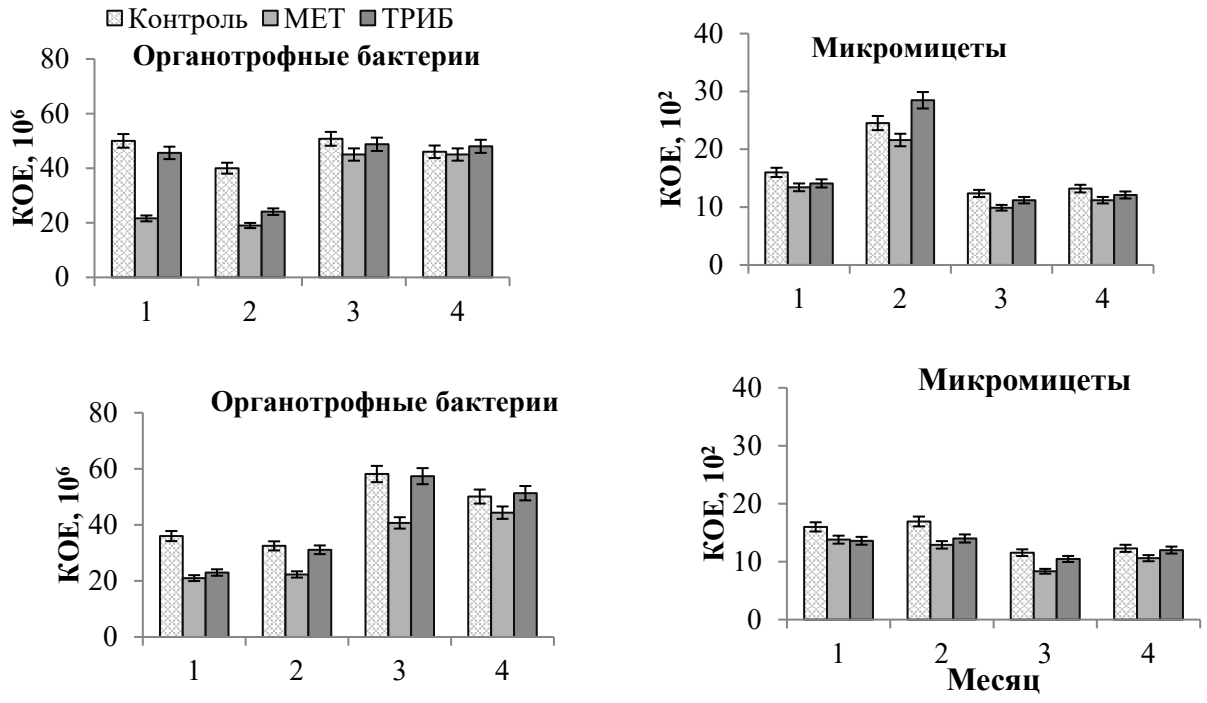


Рисунок 3 – Динамика численности органотрофных бактерий и микромицетов при внесения гранул П(3ГБ)/Опилки/МЕТ(или ТРИБ) в зависимости от условий инкубации: А- инкубирование при комнатной температуре; Б- инкубирование в термостате при 29 °С

Исследована гербицидная активность свободного и депонированного гербицида трибенурон-метила [(П(3ГБ-со-3ГВ)/березовые опилки/ТРИБ] в лабораторных посевах пшеницы сорта «Новосибирская 15», засоренных сорным растением Горчица полевая.

Общее количество Горчицы полевой в посевах яровой пшеницы без обработки гербицидными препаратами составляла около 2000 на м^2. Внесение гербицидных препаратов в обоих вариантах эксперимента снизило количество сорняков (рисунок 4А). Гербицидный эффект обеих форм ТРИБ зафиксирован уже на 7 сутки. Массовая гибель сорняков отмечена 14 сутки, при этом более значительно – под действием депонированной формы ТРИБ. Эти различия гербицидной активности форм далее проявлялись более наглядно. На 28 сутки при внесении экспериментальных форм ТРИБ количество сорняков в лабораторных посевах снизилось до 20 %. Под действием свободного ТРИБ эффект был менее значительным, остаточное количество сорняков было на уровне 40 %.

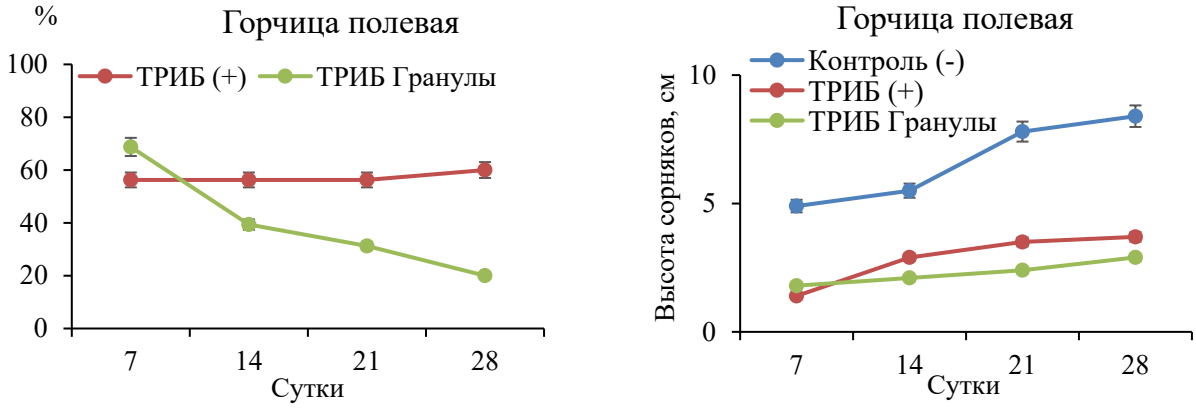


Рисунок 4 – Динамика гибели сорных растений (А) и высота Горчицы полевой (Б) (*Sinapis arvensis*) при действии свободной (контроль +) и депонированной формы трибенурон-метила в виде гранул

Таблица 1 – Влияние различных форм пестицидов на высоту стебля и плотность посевов яровой пшеницы сорта «Новосибирская 15»

Сутки	Яровая пшеница сорт "Новосибирская 15"					
	Контроль (–)		ТРИБ (+)		ТРИБ Гранулы	
	Количество, шт./м^2	Высота, см	Количество, шт./м^2	Высота, см	Количество, шт./м^2	Высота, см
7	1234	17,3	1111	16,3	1234	15,7
14	1234	29,0	1111	27,9	1234	26,1
21	1234	34,7	1111	37,3	1234	31,6

Рисунок 4Б иллюстрирует замедление роста сорняков под действием двух форм ТРИБ. Высота интактных растений возрастала в ходе опыта и к концу наблюдения составила 9 см. Ингибирование роста сорных растений обеими формами ТРИБ негативно влияло на их высоту. Высота оставшихся сорных растений под действием свободного и депонированного гербицида составила, соответственно, 4 и 3 см. В целом, действие экспериментальных форм ТРИБ, как показывают результаты эксперимента, было эффективнее его свободной формы.

В таблице 1 представлены результаты оценки состояния посевов пшеницы под действием двух форм ТРИБ по сравнению с интактными растениями.

Наблюдения за состоянием посевов пшеницы в течение 21 суток (до периода массовой гибели сорняков) существенных различий не выявило. Общее количество растений (их плотность) и высота, в общем, были сопоставимыми. Выявленные отличия в показателях на уровне 10 % свидетельствуют об отсутствии достоверного и негативного влияния пестицидов на развитие пшеницы.В результате исследований были получены экспериментальные формы препаратов на основе П(3ГБ) и древесных опилок с депонированными гербицидами метрибузином и трибенурон-метилом. Исследование разрушаемости депонированных препаратов в почвенных микроэкосистемах показало, что экспериментальные формы медленно деградируют и длительно функционируют в почве, а также существенно не влияют на численность почвенных микроорганизмов. Внесение экспериментальных форм трибенурон-метила в лабораторные посевы позволило снизить количество сорняков до 20 %, а также замедлить их рост. Таким образом предварительные результаты показали возможность применения экспериментальных форм в длительных лабораторных и полевых экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА

Wang Y., Qian C., Yan X., Liu H. Preparation and characterization of controlled-release poly (melamine-formaldehyde) microcapsules filled with 2, 4-D isooctyl ester // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. 2017. V. 66. № 18. C. 963–969.

Roy A., Singh S.K., Bajpai J., Bajpai A.K. Controlled pesticide release from biodegradable polymers // Central European Journal of Chemistry. 2014. V. 12. Is. 4.P. 453–469.

Shershneva A.M., Murueva A.V., Zhila N.O., Volova T.G. Antifungal activity of P3HB microparticles containing tebuconazole // Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2019. P. 196–204.

Lobo F., Aguirre C., Silva M., Grillo R., de Melo N., Oliveira L., Morais L., Campos V., Rosa A., Fraceto L. Poly(Hydroxybutyrate-Cohydroxyvalerate) Microspheres Loaded with Atrazine Herbicide: Screening of Conditions or Preparation, Physico-Chemical Characterization, and In Vitro Release Studies // Polym. Bull. 2011. V. 67. P. 479–495

Киселев Е.Г., Демиденко А.В., Барановский С.В., Волова Т.Г. Масштабирование технологии синтеза биодеградируемыхполигидроксиалканоатов в условиях опытного производства // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. 2014. № 7. С. 134–147.

УДК 664.6:614

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ МОЛОЧНЫХ, РАСТИТЕЛЬНЫХ И КОМБИНИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ

И.С. Полянская, О.С. Тиханова

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

Антиоксидантная теория провоцирования заболеваний и преждевременного старения является одной из подтверждённых теорий методами доказательной медицины [1, 2]. Теория базируется на теоретических и практических аспектах исследования свободнорадикальных процессов и препятствующих им антиоксидантных свойств соединений. Антиоксиданты снижают риск возникновения заболеваний сердечно-сосудистой и дыхательной систем (атеросклероз, ишемическая болезнь, бронхит, бронхиальная астма, эмфизема, ревматизм), стресса, аллергии, лучевой болезни, отравления, старения организма, сахарного диабета и других нарушений обмена веществ [3]. Известно также, что большинство антирадикальных соединений обладают двухфазным действием, поэтому первую фазу называют антиоксидантной, а вторую – прооксидантной активностью [4].

Высокими прооксидатно-антиоксидантными свойствами обладают продукты (в среднем антиоксидантных единиц/100 г. продукта): апельсины – 750; виноград красный – 739; вишня – 670; слива 493; капуста брюссельская – 980; свёкла – 840; перец красный – 710; лук – 450 и др. Особенно широко изученным классом растительных антиоксидантных веществ являются фенольные соединения, называемые также флавоноидами.

Новые исследования приводят к открытию прооксидатно-антиоксидантных свойств продуктов и конкретных соединений, которые содержатся в продукте и обуславливают это функциональное свойство. Так в зернах киноа выявлено более 20 фенольных соединений в свободной или конъюгированной форме, в небольших количествах присутствуют танины, сапонины, стеролы, фитиновая кислота и экдистероиды [5].

Среди продуктов животного происхождения молочные продукты занимают ведущую позицию по антиоксидантным свойствам. Качественная сравнительная характеристика антиоксидантов в растительных и молочных продуктах показывает, что в последних особая роль принадлежит катионным сывороточным белкам: лактоферрину, лактопероксидазе, панкреотическим рибонуклеазам, лизоциму [6].

Установлено также, что сочетанное использование прооксидатно-антиоксидантных систем может обладать синергетическим эффектом, что открывает простор для исследований и разработки комбинированных функциональных молочно-растительных продуктов этого направления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. М.: ТрансЛит, 2009. 192 с.
2. Анатолий Мканович Авидзба А.М., Кубышкин А.В., Гугучкина Т.И. и др. Антиоксидантная активность продуктов переработки красных сортов винограда "Каберне-Совиньон", "Мерло", "Саперави" // Вопр. питания. 2016. № 1. С. 99–109.
3. Волобой Н.Л., Зверев Я.С., Брюханов В.М. и др. Антиоксидантный и прооксидантный эффект арбутина и гидрохинона в эксперименте in vivo // Экспериментальные и клинические исследования, Бюллетень Сибирской медицины. № 5. 2011. С. 41–44.
4. Сидорова Ю.С., Петров Н.А., Шипелин В.А., Мазо В.К. Шпинат и киноа – перспективные пищевые источники биологически активных веществ // Вопросы питания. 2020. № 2. С. 100–106.
6. Титова М.Е., Комолов С.А., Тихомирова Н.А. Антиоксидантная активность изолята катионных сывороточных белков // Вопр. питания. 2012. № 6. С. 37–40.

УДК 58.04

СПЕЦИФИКА ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФЛОКУЛЯНТОВ НА КУЛЬТУРУ МИКРОВОДОРОСЛИ SCENEDESMUS QUADRICAUDA

А.К. Пономарев, Л.Л. Брежнев, А.В. Черенков, О.В. Горбунов

Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Успехи современных животноводческих предприятий, во многом зависят от качества кормов. В настоящее время используемые комбикорма содержат недостаточно витаминов, макро- и микроэлементов. Скорость роста, повышение иммунитета, быстрый набор веса, – это далеко не полный список преимуществ хорошо сбалансированных кормов.

Микроводоросли могут стать необходимым источником витаминов и микроэлементов, в их составе содержится большое количество полезных веществ, например в хлорелле (Chlorella). В 1г сухого вещества содержится более 100 различных макро- и микроэлементов.

Немаловажным является сам процесс культивирования штаммов микроводорослей, где особое внимание стоит уделить разработкам методов управляемого hggjkакопления биомассы. На сегодняшний день изучено монго методов флокуляции одноклеточных водорослей, в том числе химические, физические, биологические. Известен опыт использования коагулянтов, таких как сульфат магния, хлорид железа, алюминиевые квасцы [3–4].

По интенсивности накопления биомассы водоросли, хотя и уступают бактериям, синтезирующим питательные вещества, значительно превосходят сельскохозяйственные культуры. При их выращивании в культиваторах открытого типа с 1 га водной поверхности можно получать до 65 т сухой биомассы.

Содержание белка в клетке Сценедесмус составляет 45–55 % в расчёте на сухую массу [1]. Белки водоросли хорошо сбалансированы по содержанию незаменимых аминокислот. Наряду с содержанием белковых веществ в клетках водорослей довольно много синтезируется полиненасыщенных жирных кислот (являющихся, как и некоторые аминокислоты, незаменимыми) и провитамина А – каротина (до 150 мг/%). [1, 6].

Цель работы – изучить действие флокулянтов на скорость и эффективность коагуляции микроводоросли Scenedesmus quadricauda.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток микроводоросли Сценедесмус (Scenedesmus quadricauda) с плотностью 10^5 кл\мл. pH-9.3, оптическая плотность при 680нм составила 0,401нм для длинны оптического слоя 50 мм.

В качестве флокулянтов применялись 1 % растворы хлорида железа ($FeCl_3$), сульфат меди ($CuSO_4$), гидроксид магния (MgOH), карбонат кальция ($CaCO_3$) и 2 % растворы гидроксида натрия с хлоридом кальция ($NaOH+CaCl_2$) и сульфат железа ($FeSO_4$).

Для определения воздействия флокулянта на скорость осаждения измерялось количественное содержание хлорофилла.

В конические колбы отбиралось равное количество культуры водоросли. Перед началом опыта измерялась оптическая плотность и значение водородного показателя для установки исходных значений.

Все колбы ставились на магнитную мешалку со скоростью перемешивания культуры 400 об\мин, бюреткой вносилось определенное количество реагента до момента флокуляции, pH – метром фиксировалось значение водородного показателя в течении воздействия реагентом. Через 2 минуты после воздействия флокулянта колбы снимались с магнитной мешалки. Далее с интервалом в 10 мин измерялась оптическая плотность в каждой колбе, проба отбиралась в срединном слое культуры водоросли.

Количественное определение содержания хлорофилла проводилось с помощью спектрофотометра при длине волны 680 нм. Данные рассчитывались по формуле: $1-100\times A/Б$ где А – значение оптической плотности в данный момент времени, Б – значение оптической плотности в начале эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех растворах перед осаждением различными флокулянтами концентрация хлорофилла составила 99,3 мкг\см^3. В конце эксперимента у двух флокулянтов степень осаждения была практически равной и составила 81,8 % $FeCl_3$ и 83,7 % $NaOH+CaCl_2$. Немного хуже в качестве флокулянта показал себя сульфат меди, при котором концентрация хлорофилла через 30 минут составляла 32,2 мкг\см^3, что составило 67,6 %. Худший результат – у осадителей гидроксида магния и карбоната кальция (их степень осаждения составила 13–11 %), содержание хлорофилла на конец эксперимента составила 86–88 мкг\см^3 в пробе. Необходимо отметить, что через 10 минут намного быстрее осаждение происходило при использовании хлорида железа, при котором скорость осаждения хлорофилла составила 69 %, в то время как в растворах сульфата меди и $NaOH+CaCl_2$ – лишь 36,3 и 30,3 %.

В ходе исследования трех разных флокулянтов было выявлено, что флокуляция происходит при резком изменении значений pH на 2–3 единицы, после добавления 3–3,5мл раствора флокулянтов произошел скачек водородного показателя со значений pH 9,3 до pH 7,49 – 7,22 для нейтральных солей и до pH 11.26 – 11,23 для щелочных солей.

В качестве интегрального показателя скорости осаждения клеток культуры водорослей может служить количество хлорофилла на мкг\см^3. Иными словами – количественное остаточное содержание хлорофилла в срединном слое пробы за определенный момент времени.

Из графика 1 видно, что за тридцатиминутный промежуток, в котором проводился эксперимент, лучший результат по полноте осаждения показал 2 % раствор гидроксида натрия и хлорида кальция, но за короткий промежуток времени быстрее всего осаждает хлорид железа, концентрация хлорофилла в пробе упала с 99.3 мкг\см^3 до 30,4 мкг\см^3.

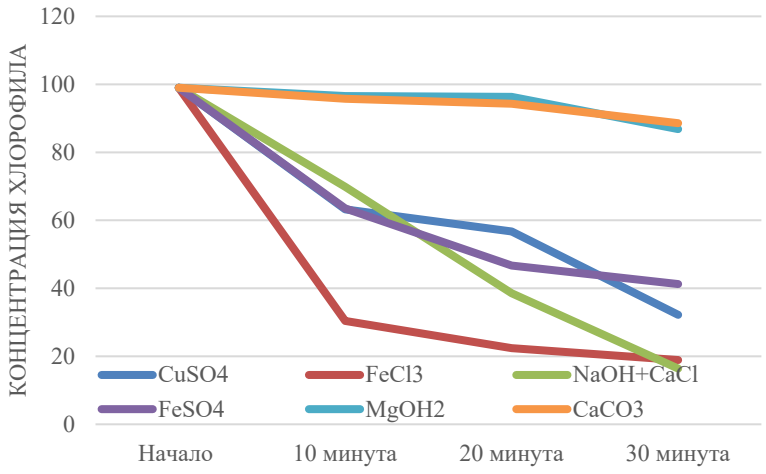


Рис. 1. Содержание хлорофилла мкг\см^3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из опытов по осаждению водорослей видно, что за 30 минутный интервал опыта смесь флокулянта гидроксида натрия и хлорида кальция показывает лучший результат (83,8 %), Схожий результат у хлорида железа (81,8 %). Сульфаты обладают равной скоростью осаждение в промежутке 20 минут, однако в конце эксперимента наблюдается расхождение в динамике осаждения в пользу сульфата меди.

Худший результат по осаждению показывают 1 % растворы гидроксида магния и карбоната кальция 13,3 % и 11,1 % соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

Шевелуха Е.А., Калашникова С.В., Дегтярев С.В., Кочиева Е.З. Сельскохозяйственная биотехнология – М.: Высшая школа, 1998. – 416 с

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.

Чернова Е.Н., Русских Я.В., Жаковская З.А. Физические и химические методы воздействия на цианобактериальное" цветение" водоемов: обзор // Региональная экология. – 2018. – №. 3. – С. 39.

Smith, B.T., & Davis, R.H. (2012). Sedimentation of algae flocculated using naturally-available, magnesium-based flocculants. Algal Research, 1(1), 32–39. doi:10.1016/j.algal.2011.12.002.

Riebesell U., Schloss I., Smetacek V. Aggregation of algae released from melting sea ice: implications for seeding and sedimentation //Polar biology. – 1991. – Т. 11. – №. 4. – С. 239–248.

Baya D.T. et al. Caractérisation des phénomènes d'auto-floculation, de bio-floculation et de co-floculation des microalgues dans un chenal algal à haut rendement (synthèse bibliographique) //BASE. – 2014.

*УДК 630*181.351*

ОТБОР ДЕРЕВЬЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR L.*) ПО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИМ КРИТЕРИЯМ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ЛЕСНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

А.А. Попова, В.Т. Попова, С.В. Кирьянова

Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова, Россия

Дуб черешчатый является оним из лесообразущих видов [1], выполняет множество экологических функции и играет важную роль в социокультурного плана. Дуб черешчатый являясь, растением долгожителем, представляет важный компонент лесных экосистем, а так же зеленых поясов крупных городов и России и мира [2–5]. Для размножения дуба черешчатого чаще всего используется семенной материал, ценные фенотипы и генотипы размножают путем прививки. Общепринято отбирать фенотипически плюсовые растения, характеризующиеся ровным стволом, приростом древесины, полнотой кроны и тд., а также дающие желуди большого объема и веса. Прививка черенками, почками позволяет создавать плантации из клонов растений, обладающими хозяйственно-ценными признаками. Целью нашей работы являлась оценка состояния дубрав г. Воронежа и его пригорода для оценки потенциальных маточных популяций дуба черешчатого.

Объектами исследования являлись 10 городских и пригородных дубрав г. Воронежа, а так же отдельные деревья дуба черешчатого. Дубравы и дубовые насаждения располагаются в нескольких районах города. Оценка состояния деревьев проводилась в 2019 при непосредственном визуальном осмотре деревьев, обилию семеношения, морфологическом, цитогенетическом анализе желудей.

В ходе фенотипического анализа древостоев дуба черешчатого, а также оценки семеношения, морфологическом анализе желудей проростков было выявлено, что большинство проанализированных популяций дуба черешчатого устойчивы, за исключением популяции дуба черешчатого «Урочище Чижовское», находящееся в городской черте. Цитогенетический анализ нарушения патологий митоза среди городских популяций показал увеличение патологий митоза в корневых меристемах проростков, особенно на территории Урочища Чижовского. Цитогенетические параметры представлены в таблице.

Цитогенетические показатели	Районы исследований						
	1	2	3	4	5	6	7
Митотический индекс, %	7,7±0,4**	8,4±0,3***	7,5±0,3***	7,2±0,9	6,2±0,3***	6,8±0,9	10,5±0,7
Митотический индекс, подсчитанный без учета профаз, %	5,9±1,2	5,2±0,3	5,1±0,3	3,9±0,6**	4,0±0,3	3,6±0,3**	4,8±0,2
Доля профаз, %	36,1±2,0***	38,3±2,6***	31,8±3,8***	47,4±3,8	40,8±3,8***	40,2±4,8	51,4±1,8
Доля метафаз, %	20,9±1,2**	20,5±1,1**	27,5±1,9***	22,1±2,9	23,5±1,9***	23,1±2,2	16,4±0,8
Доля анафаз, телофаз, %	43,0±1,5***	41,2±2,0**	40,7±1,3**	30,6±2,1	35,7±1,3**	36,9±3,4*	32,9±1,5
Патологии митоза, %	12,6±1,5***	11,6±1,0***	11,3±1,3***	13,1±1,5*	12,3±1,3***	8,9±1,1*	4,3±0,4
Патологии митоза, подсчитанные без учета профаз, %	19,3±1,1***	19,1±1,6***	16,0±2,2***	24,3±2,5***	18,0±2,2***	14,1±1,2***	8,9±0,8
Обозначения: * – различия с контролем достоверны (P < 0,05); ** – различия с контролем достоверны (P < 0,01); *** – различия с контролем достоверны (P < 0,001) Точки сбора: 1 – Дубрава поселка Задонье; 2 – ул. Московский проспект; 3 – дубрава около Воронежского государственного лесотехнического университета; 4 – дубрава Чижовского урочища; 5 – Шилово; 6 – Маклок; 7 – Воронежский биосферный заповедник							

По морфометрическим параметрам наиболее крупные желуди характерны для популяций дубов, произрастающих в Шилово и Воронежском Биосферном заповеднике, интересно отметить, что в контрольной территории п. Маклок желуди мелкие, сильно поврежденные личинками насекомых-паразитов. Так же высокими показателями обладают желуди с двух городских территорий – около ВГЛТУ (точка 3 в таблице) и дубрава на Московском проспекте (точка 2). Выявлена общая тенденция поведения цитогенетических показателей под воздействием выхлопных газов автотранспорта и общей антропогенной нагрузки.

У автодороги наблюдается увеличение митотической активности за счет возрастания доли профазных клеток, что свидетельствует о нарушениях хромосомного аппарата, не позволяющих перейти клетке на следующую стадию митоза, а также активации системы checkpoint-проверки целостности генетического материала. Показано, что цитогенетические показатели митотической активности корневых меристем более чувствительный показатель, чем морфологические критерии оценки.

Полученные данные показывают, что для отбора материала лесной биотехнологии морфологические критерии деревьев необходимо дополнять физиологическими, цитогенетическими критериями. Совокупность критериев, комплексно характеризующих биологическую систему, позволит более успешно проводить отбор маточного материала.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Воронежской области в рамках научного проекта № 19–44–363001.

ЛИТЕРАТУРА

1. Federal forestry Agency. Forest of Russia. Available online: URL https://roslesinforg.ru/atlas In Russian
2. Nickel, S.; Schröder, W.; Völksen, B. Validating the map of current semi-natural ecosystem types in Germany and their upscaling using the Kellerwald-Edersee National Park as an example. Environ Sci Eur 2019, 31, 90. https://doi.org/10.1186/s12302–019–0273–2.
3. Hill, J.G.; Barone, J.A. Survey of the woody flora of the William L. giles bur oak preserve, Mississippi state, Mississippi. Castanea 2005, 84(1), 6–12. doi:10.2179/0008–7475.84.1.6
4. Earles, A.; Wulliman, J.; Chongtoua, B.; Zivkovich, B.; Rogers, S.; Johnson, S. Oak Gulch Green Infrastructure: Scaling and Continuity Analysis from the Lot to the Watershed Level. Proceeding of the World Environmental and Water Resources Congress 2018, Water, Wastewater, and Stormwater; Urban Watershed Management; Municipal Water Infrastructure; and Desalination and Water Reuse – Selected Papers from the World Environmental and Water Resources Congress, Minneapolis, Minnesota, USA, June 3–7 2018; American Society of Civil Engineers, USA, 2018; 143–151. doi: 10.1061/9780784481431.015.
5. Kozlova, A.; Piestova, I.; Patrusheva, L.; Lubsky, M.; Nikulina, A.; Svideniuk. M. Estimation of the seasonal leaf area index in urban oak forests using Sentinel-2 time series data. Proceeding of the 18th International Conference on Geoinformatics – Theoretical and Applied Aspects, Kyiv, Ukraine, May 13–16 2019; European Association of Geoscientists & Engineers, 2019; p. 1–5. doi:10.3997/2214–4609.201902134 ISSN:2214–4609.

УДК 579.64

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АССОЦИАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С ДРОЖЖАМИ В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

В.С. Ржевская, Л.М. Теплицкая, Е.Ф. Семенова

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

Защита растений от болезней определяет стабильность сельскохозяйственного производства. Нерациональное применение агрономических приемов привело к формированию устойчивых рас возбудителей болезней, уменьшению численности практически всех эколого-трофических групп микроорганизмов и снижению биологической активности почв. Вследствие подавления автохтонной полезной микрофлоры увеличилась численность фитопатогенных видов, процесс саморегуляции и самоочищения почвы нарушен [5].

Известно, что в основе высокой антагонистической активности молочнокислых бактерий лежит генетически детерминированная способность к продукции антимикробных веществ, что позволяет им конкурировать с другими продуцентами антибиотиков. Молочнокислые бактерии, находясь в симбиотических отношениях между собой или с другими группами микроорганизмов, образуют ассоциации, которые могут обладать новыми и уникальными свойствами, в частности, антифунгальными.

Целью нашей работы является сравнение антагонистической активности молочнокислых бактерий, составленной их них и дрожжей *Pichia accidentalis* F7/20 микробной ассоциации по отношению к фитопатогенным микромицетам. Объектами исследования служили чистые культуры молочнокислых гомоферментативных стрептобактерий рода *Lactobacillus* (*L.casei* В 2/20 и *L. plantarum* В 1/20), молочнокислого гомоферментативного стрептококка *Lactococcus lactis B* 3/20 и их ассоциативная культура с дрожжами *Pichia accidentalis* F7/20. В качестве тест-культур использовали выделенные из почвы изоляты следующих видов фитопатогенных грибов: *Fusarium moniliforme, F. sulphureum, Alternaria alternata, Stachybotrys alternans*. Изучение антагонистической активности по отношению к микромицетам проводили методом агаровых блоков с отсроченным антагонизмом [1], при температуре 24 °С. Зоны отсутствия (подавления или ингибирования) роста тест-культуры рассматривали как проявление фунгицидного действия, а отклонения в развитии мицелия (задержка развития) по сравнению с контролем свидетельствовала о фунгистатическом действии [1]. Химический анализ биологически активных соединений в культуральной жидкости микробной ассоциации был проведен в Испытательном центре по контролю качества пищевой продукции "Магарач" методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и газовой хроматографии.

Результаты проведенного нами исследования показали, что по отношению к *F. moniliforme* штаммы *L. plantarum* В 1/20 и *L. casei* В 2/20 не обладают антагонистической активностью (рис. 1, табл. 1). Штамм *L. lactis* В 3/20 (рис. 1в) вызывал ингибирование роста фитопатогенного гриба в зоне до 13±0,2 мм. Ассоциация микроорганизмов образовывала зону подавления 25±0,5 мм (рис. 1г). В контрольном варианте по всей чашки Петри наблюдался рост мицелия, вплоть до блока (1д).



а б в г

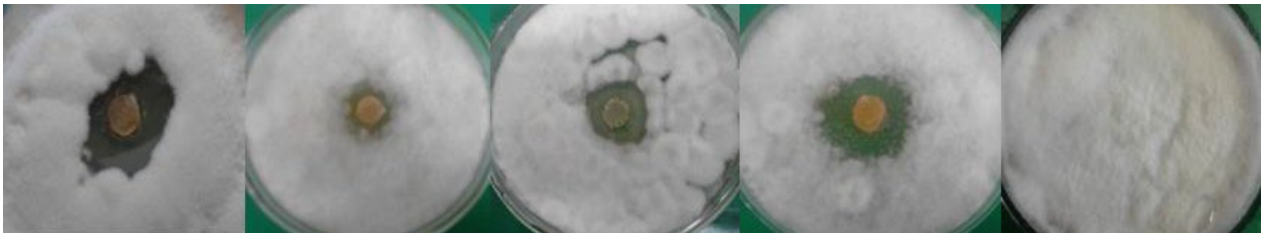
Рисунок 1. Антагонистическая активность штаммов молочнокислых бактерий и ассоциативной культуры по отношению к *F. moniliforme*: а – *L. casei* В 2/20, б – *L. plantarum* В 1/20, в – *L. lactis* В 3/20, г – микробная ассоциация, д – контроль

Таблица 1 Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Fusarium moniliforme*

Культура	Диаметр зоны отсутствия роста или задержки развития мицелия, мм	
	фунгицидная активность	фунгистатическая активность
L. casei В 2/20	0	0
L. plantarum В 1/20	0	0
L. lactis В 3/20	13±0,2	0
микробная ассоциация	25±0,5	0

Таблица 2 Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Fusarium sulphureum*

Культура	Диаметр зоны отсутствия роста или задержки развития мицелия, мм	
	фунгицидная активность	фунгистатическая активность
L. casei В 2/20	20±2,5	0
L. plantarum В 1/20	13±1	0
L. lactis В 3/20	18±1	0
микробная ассоциация	28±1,5	0



а б в г

Рисунок 2. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *F. sulphureum*: а – *L. casei* В 2/20, б – *L. plantarum* В 1/20, в – *L. lactis B* 3/20, г – микробная ассоциация, д – контроль

Таким образом, изучаемая ассоциация микроорганизмов по отношению к *F. moniliforme* обладает фунгицидной активностью, обусловленной преимущественно метаболитами *L. lactis* В 3/20 (табл. 5), и не оказывает микостатического эффекта.

Штаммы *L. casei* В 2/20 и *L. plantarum* В 1/20 по отношению к *F. sulphureum* обладали антагонистической активностью и образовывали зону подавления роста микромицета 20±2,5 мм и 13±1 мм соответственно. Штамм *L. lactis* 3/20 подавлял рост *F. sulphureum* в зоне 18±1 мм. В контрольном варианте по всей чашки Петри наблюдался рост мицелия, в том числе и на блоке (2д).

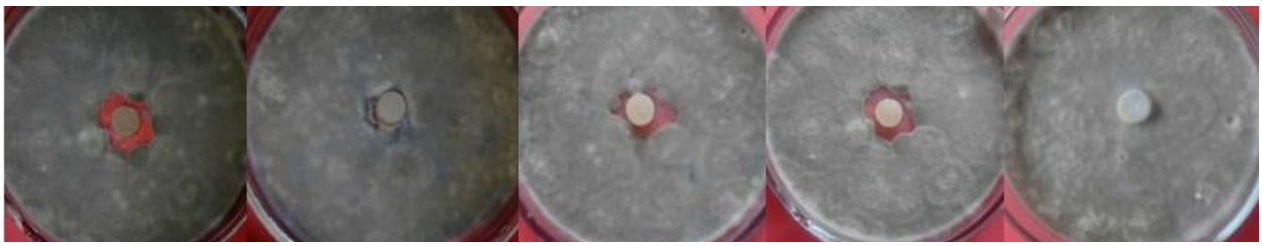
Микробная ассоциация по сравнению с культурами молочнокислых бактерий образовывала наибольшую зону подавления роста *F. sulphureum* – 28±1,5 мм. Следовательно, фунгицидная активность микробной ассоциации превышает таковую у монокультур молочнокислых бактерий. Таким образом, микробная ассоциация в условиях проведенного эксперимента обладала высокой фунгицидной активностью (>20 мм) по отношению к фитопатогенному грибу *F. sulphureum*, и не оказывала на него микостатического эффекта.

Рост гриба *Alternaria alternata* штаммы *L. casei* В 2/20 и *L. lactis B* 3/20 подавляли в зоне 15±2 и 16±2 мм, соответственно (рис. 3а, б), нарушений в развитии гриба не отмечено (табл. 3). Штамм *L. plantarum* В 1/20 не оказывал влияния ни на рост, ни на развитие гриба. Микробная ассоциация образовывала зону отсутствия роста *A. alternata* 18±1 мм (рис. 3в). В контрольной чашке Петри вся агаровая пластинка была покрыта спороносящим мицелием.

Таким образом, микробная ассоциация обладала фунгицидной активностью по отношению к *Alternaria alternata* и не оказывала микостатического эффекта.

Рост *S. alternans* штаммы *L. casei* В 2/20 и *L. plantarum* В 1/20 подавляли в круге диаметром 25±1 мм и 26±2 мм, соответственно (рис. 4 а, б). В зонах 25±1 – 75±2 и 26±2 – 39±1 мм отмечен недостаточно выраженный рост грязно-белого неспорулирующего мицелия. В оставшейся части чашки Петри отмечен темный мицелий, находящийся на стадии образования органов спороношения.

Штамм *L. lactis B* 3/20 образовывал зону задержки роста микромицета диаметром 26±1 мм. На остальной части чашки Петри наблюдался рост грязно-белого стерильного мицелия. Микробная ассоциация подавляла рост *S. alternans* в зоне 28±1 мм. В зоне 28±1 – 65±2,5 мм наблюдался рост стерильного грязно-белого мицелия. В зоне 65±2,5 – 90 мм отмечен рост низкого темного мицелия с образующимися органами спороношения. В контрольном варианте по всей поверхности чашки Петри наблюдали рост спорулирующего мицелия.

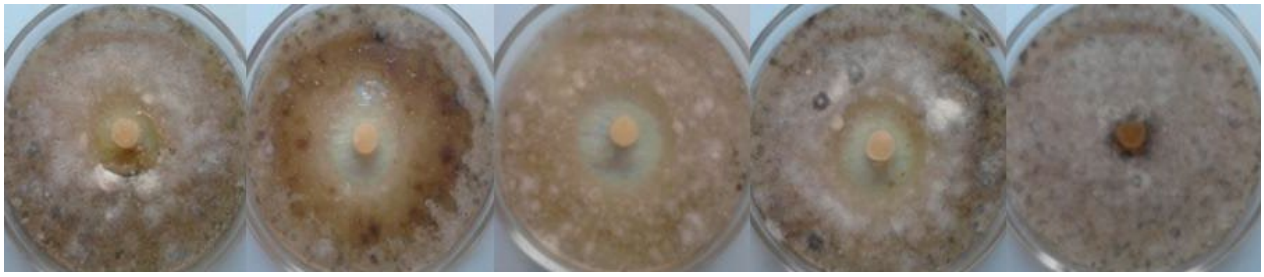


а б в г

Рисунок 3. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Alternaria alternata*: а – *L. casei* В 2/20, б – *L. plantarum* В 1/20, в – *L. lactis B* 3/20, г – микробная ассоциация, д – контроль

Таблица 3 Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Alternaria alternata*

Культура	Диаметр зоны отсутствия роста или задержки развития мицелия, мм	
	фунгицидная активность	фунгистатическая активность
L. casei В 2/20	15±2	0
L. plantarum В 1/20	0	0
L. lactis В 3/20	16±2	0
микробная ассоциация	18±1	0



а б в г

Рисунок 4. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Stachybotrys alternans*: а – *L. casei* В 2/20, б – *L. plantarum* В 1/20, в – *L. lactis B* 3/20, г – микробная ассоциация, д – контроль

Таблица 4 Антагонистическая активность молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к *Stachybotrys alternans*

Культура	Диаметр зоны отсутствия роста и задержки развития мицелия, мм	
	фунгицидная активность	фунгистатическая активность
L. casei В 2/20	25±1	25±1 – 75±2
L. plantarum В 1/20	26±2	26±2 – 39±1
L. lactis В 3/20	26±1	26±1 – 90
микробная ассоциация	28±1	28±1 – 65±2,5

Микробная ассоциация по отношению к *S. alternans* обладает высокой фунгицидной активностью – 28±1 мм, превышающей таковую у монокультур молочнокислых бактерий, а также проявляет фунгистатическую активность.

Проведенные исследования показали, что штаммы молочнокислых бактерий обладают различной антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микромицетам, которая проявляется в виде фунгицидного и фунгистатического эффекта. Так, *L. casei* В 2/20 проявлял низкую фунгицидную активность (зона задержки роста менее 20 мм) по отношению к *A. alternata*, высокую активность (зона задержки роста более 20 мм) в отношении *F. sulphureum* и *S. Alternans*, не обладал антагонистической активностью по отношению к *F. moniliforme*.

Штамм *L. plantarum* В 1/20 обладал высокой антагонистической активностью в отношении *S. Alternans*, не подавлял рост *A. alternata, F. moniliforme*, по отношению к *F. sulphureum* фунгицидная активность была менее 20 мм.

Штамм *L. lactis B* 3/20 проявлял низкую фунгицидную активность в отношении *F. moniliforme, F. sulphureum* и *A. alternata*, высокую фунгицидную активность в отношении *S. alternans*.

Микробная ассоциация проявила слабую фунгицидную активность в отношении *A. alternata*. А по отношению к *F. moniliforme, F. sulphureum, S. alternans* микробная ассоциация показала высокую фунгицидную активность (>20 мм). Фунгистатическую активность монокультуры молочнокислых бактерий и микробная ассоциация проявили в отношении *Stachybotrys alternans*.

Результаты проведенных исследований показали, что фунгицидная активность микробной ассоциации превышает таковую у монокультур молочнокислых бактерий. Так, в отношении *F. moniliforme L. casei* В 2/20 и *L. plantarum* В 1/20 не проявляли антагонистической активности. При этом зоны отсутствия роста при воздействии составили *L. lactis B* 3/20 – 17 мм, а консорциума – 25 мм. Такая же закономерность отмечена при действии микробной ассоциации на такие микромицеты, как *A. alternata, F. sulphureum*.

Биохимический анализ культуральной жидкости микробной ассоциации показал содержание разнообразных метаболитов, обладающих антибактериальным и антимикотическим действием (табл. 5). Дрожжи *P. accidentalis*, входящие в состав микробной ассоциации, выделяют спирты, что усиливает антибиотическое действие органических кислот – основных метаболитов лактобактерий [4]. Синергетическое действие спиртов и органических кислот приводит к более высокой антагонистической активности микробной ассоциации по сравнению с монокультурами молочнокислых бактерий.

Таблица 5 Противомикробные вещества, обнаруженные в культуральной жидкости микробной ассоциации

Вещество	Антибактериальный эффект	Антимикотический эффект	Содержание, мг/л
сквален	+	+	89,7
диметилфумарат	-	+	8,06
каприновая кислота	+	+	8,77
молочная кислота	+	-	1030,0

Помимо антибиотических свойств метаболитов микробной ассоциации, продукты обмена веществ молочнокислых бактерий и дрожжей стимулируют развитие друг друга. Так, молочнокислые бактерии выделяют органические кислоты, которые создают кислую среду, благоприятную для развития дрожжей. Кроме того, органические кислоты служат источником углеродного питания дрожжевых клеток. В свою очередь, дрожжи стимулируют рост молочнокислых бактерий, устраняя избыток молочной кислоты и обогащая субстрат витаминами. Отмирающие клетки дрожжей содержат много белков, являющихся хорошим источником азота для бактерий [3].

Таким образом, увеличение зоны подавления тест – организма ассоциацией микроорганизмов по сравнению с действием монокультур, свидетельствует о том, что взаимоотношения микроорганизмов образованной ассоциации можно охарактеризовать как синергизм. Явление синергизма, позволяющее молочнокислым бактериям и дрожжам успешно конкурировать с микромицетами за источники питания в естественной среде обитания, позволяет использовать его при разработке микробиологических препаратов, направленных на защиту растений от фитопатогенных микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена фунгицидная и фунгистатическая активность монокультур молочнокислых бактерий и микробной ассоциации по отношению к фитопатогенным грибам.

Показано, что эффективность подавления фитопатогенов выше у микробной ассоциации, по сравнению с монокультурами лактобактерий.

Определено наличие в культуральной жидкости веществ, обладающих антибактериальными и антимикотическими свойствами: сквален, диметилфумарат, каприновая кислота, молочная кислота.

ЛИТЕРАТУРА

Зенова, Г.М. Практикум по биологии почв / Г.М. Зенова, А.Л. Степанов, А.А. Лихачев, Н.А. Манучарова. М.: Изд-во МГУ, 2002. – 120 с.

Куприянов, А.А. Перемещение бактерий из экскрементов животных в почву и сопряженные с ней местообитания / А.А. Куприянов, Н.Н. Куненкова, А.Х.К. Ван Бругген, А.М. Семенов // Почвоведение, 2009. – № 11. – С. 1354–1361.

Лысак, В.В. Микробиология: учебное пособие / В.В. Лысак. Минск: БГУ, 2007. – 426 с.

Ратникова, И.А. Биологические основы создания пробиотиков направленного действия для медицины, сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности / Автореф. дисс. на соиск. учен. степ. докт. биол. наук. Алматы, 2010. – 43 с.

Solomon, E.B. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization / E.B. Solomon, S. Yaron, K.R. Matthews // Appl. Environ. Microbiol., 2002. – Vol. 68. – P. 397–400.

УДК 664

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУКЦИНАТОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПРОДУКЦИИ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Н.К. Романова, Е.В. Романова, Т.А. Ямашев, О.А. Решетник

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

В настоящее время много внимания уделяется такой характеристике как антиоксидантная активность, причем интересует этот показатель очень широкую группу специалистов – врачей, ученых-нутрициологов, фармацевтов, химиков, технологов питания. Роль антиоксидантов общеизвестна, но с точки зрения технологов питания основные вопросы – это способы введения антиоксидантов в пищевые системы, влияние на вкус и структуру продуктов и сохранность их функциональных свойств в процессе кулинарной обработки. Антиоксиданты являются важными соединениями для защиты клеток и тканей от окислительного процесса, поэтому все больше внимания уделяется сырью, продуктам, пищевым добавкам, обладающим антиоксидантной активностью.

Одним из известных химических соединений, применяемых в медицине, сельском хозяйстве, фармации, пищевых технологиях, является янтарная кислота. С технологической точки зрения – это антиоксидант, регулятор pH систем, пищевая добавка Е363, с медицинской – естественный участник обмена веществ в составе живого организма. Тело человека получает её как с продуктами питания, так и синтезирует самостоятельно. Она улучшает преобразование энергии из питательных веществ, способствует окислению недоокисленных продуктов и стимулирует усвоение кислорода на клеточном уровне [1]. Благодаря этому препарат обладает антиоксидантным и противотоксическим действием, стимулирует обмен веществ в целом. Кроме того, янтарная кислота является антигипоксантом, адаптогеном и иммуномодулятором.

Ранее проводились многочисленные исследования по использованию янтарной кислоты в пищевых технологиях. Известно положительное влияние янтарной кислоты и ее солей на процессы брожения в производстве хлеба, спирта, производстве солода, пивоварении, производстве вин, ликеро-водочном производстве. Наиболее интересные результаты были получены при использовании янтарной кислоты в технологиях кондитерских изделий, которые показали, что целесообразно ее вносить в пищевые системы из плодово-ягодного сырья, где она присутствует эндогенно. В этом случае она менее проявляет свой металлический привкус и не очень сильно влияет на вкусовые показатели пищевых продуктов [2]. В этом аспекте интерес представляют соли янтарной кислоты. Они менее кислые, не обладают характерным металлическим привкусом, свойственным янтарной кислоте.

Свойства янтарной кислоты как антиоксиданта известны давно, что нельзя сказать о ее солях. В работе исследовали антиоксидантную активность солей янтарной кислоты: калиевой, кальциевой и аммониевой, а также раствор лимонной кислоты, как наиболее часто используемой в качестве регулятора pH систем и вкусовой добавки в пищевых технологиях. Контрольным образцом являлся раствор аскорбиновой кислоты. В работе использовали метод определения антиоксидантной активности растительного сырья, предложенный авторами W. Lertittikul, S. Benjakul, M. Tanaka [4]. Этот метод широко применяется для оценки антиоксидантной активности растительного и пищевого сырья за рубежом, а в последние годы нашел применение в России.

Проведённые исследования на модельных 1 %-х растворах кислот и солей янтарной кислоты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Антиоксидантная активность модельных растворов

Образцы	Исследуемые добавки	Оптическая плотность, D	Антиоксидантная активность, %
Опыт 1	Лимонная кислота	0,166	61,94
Опыт 2	Янтарная кислота	0,188	70,14
Опыт 3	Сукцинат кальция	0,251	93,65
Опыт 4	Сукцинат аммония	0,170	63,43
Контроль	Аскорбиновая кислота	0,268	100

Как следует из данных, представленных в таблице, сукцинаты обладают довольно высокой антиоксидантной активностью, что позволяет говорить о перспективности использования их в пищевых технологиях. Сукцинаты имеют сходные характеристики с янтарной кислотой. Они не токсичны, не имеют кумулятивного эффекта, ДСП 11 мг/кг веса тела в день, растворимы в воде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поляков И.А., Малозёмов И.В., Степанова Н.С. Антиоксидантная терапия в комплексном лечении дисциркуляторной энцефалопатии / Психоневрология. 2009 № 4–5. С. 22–24.
2. Романова Н.К., Решетник О.А. Расширение ассортимента пастильно-мармеладных изделий для питания спортсменов на основе использования янтарной кислоты / Материалы «Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Качество пищи» Том 85, № 2, 2016. С. 212–213.
3. Lertittikul W. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH / Food Chemistry. – 2007. – V. 100. – № 2. – P. 669–677.

УДК 579.222; 577.15

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ РАСТВОРИТЕЛЯ НА НАКОПЛЕНИЕ ЦЕЛЕВЫХ ПРОДУКТОВ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРОГЕСТЕРОНА ШТАММАМИ *ASPERGILLUS NIDULANS*

О.С. Савинова[1], Т.В. Федорова[1], Н.К. Давыдова[2], Т.С. Савинова[3]

[1] ФИЦ «Биотехнологии» РАН, Москва, Россия
[2] Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия
[3] Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Ранее мы сообщали о способности штамма дикого типа *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069 и генетически-модифицированных штаммов, полученных на его основе, трансформировать прогестерон (ПГ) [1–3]. Было установлено, что мутации argB2 и pyrG89 не изменяют компонентный состав мажорных продуктов. При этом процесс трансформации является двухэтапным: на первом этапе протекает гидроксилирование ПГ (I) в С11α-положение с образованием 11α-гидрокси-ПГ (II), а затем этот продукт превращается в 11α-ацетокси-ПГ (III) и 6β, 11α-дигидрокси-ПГ (IV). Показано, что направления вторичной модификации 11α-гидрокси-ПГ являются конкурентными и зависят от условий проведения трансформации (состав среды, температурный режим, аэрация) [2].

В настоящей работе мы изучили влияние природы растворителя, применяемого для внесения ПГ, на накопление целевых продуктов его трансформации – II и III – штаммом *A. nidulans* ВКПМ F-1069 и новым штаммом *A. nidulans* lac № 4 (*argB*-) [3]. Трансформации проводили в ранее описанных условиях [3] с нагрузкой ПГ 1 г/л и концентрацией растворителя 2 % об. Для идентификации, разделения и количественной оценки продуктов использовали методы количественной и препаративной ТСХ, ^{1}H и ^{13}C ЯМР, МС высокого разрешения. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание стероидов	ДМСО		Ацетон		Этилацетат		Этанол		Глицерин	
	F-1069	lac № 4	F-1069	lac № 4	F-1069	lac № 4	F-1069	lac № 4	F-1069	lac № 4
I, mol %*	**14,61**	**5, 63**	**20,65**	**8,18**	23,68	31,31	33,68	32,39	33,94	**12,03**
II, mol %*	13,66	24,02	21,41	23,8	11,89	16,66	23,79	**30,71**	7,14	7,14
III, mol %*	23,66	**37,94**	23,22	**37,99**	27,44	22,78	15,83	15,49	15,83	**37,99**
IV, mol %*	**42,8**	28,66	24,96	27,23	27,23	24,64	20,42	15,67	27,23	22,69
II+III : IV	0,87:1	**2,16:1**	1,79:1	**2,27:1**	1,44:1	1,6:1	1,94:1	**2,95:1**	1,45:1	**1,99:1**
*показано среднее значение по 3 техническим повторностям (ошибка 3 %)										

В присутствии ДМСО оба штамма наиболее эффективно конвертировали ПГ. Однако с диким штаммом накопление нежелательного соединения IV было максимальным. При использовании *A. nidulans* lac № 4 (*argB*-) максимальное накопление продукта III имело место при применении ДМСО, ацетона и глицерина, а продукта II – в присутствии этанола. Кроме того, у нового штамма в отличие от дикого была обнаружена способность трансформировать ПГ в 17α-гидрокси-ПГ (V) в присутствии этанола и глицерина (содержание V было 3,5 и 7 mol % соответственно).

На основании полученных результатов был сделан вывод, что для накопления целевых продуктов II и III наиболее предпочтительным растворителем для внесения субстрата при трансформации ПГ штаммом *A. nidulans* ВКПМ F-1069 является ацетон, а для штамма *A. nidulans* lac № 4 (*argB*-) могут быть использованы и ацетон, и ДМСО.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант № 18–34–00653).

ЛИТЕРАТУРА

1. O.S. Savinova et al. FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1), 2018, p. 178.
2. O.S. Savinova et al. Steroids, 2019, Vol.149, Article 108421.
3. О.С. Савинова и др. Прикладная биохимия и микробиология, 2020, Т. 56, № 3, стр. 266–274.

УДК 579.23

ОЦЕНКА ПРЕБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ТРАВ ПЕРМСКОГО КРАЯ

З.Ю. Самойлова, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Одной из актуальных проблем современного животноводства является недостаток качественных концентрированных кормов. Повышение продуктивности и здоровья животных за счет организации полноценного кормления может быть реализовано путем включения в питательный рацион трав, обладающих пребиотической активностью. Известно, что значительный вклад в здоровье макроорганизма вносит его микрофлора. Стимулируя развитие представителей полезной микрофлоры и подавляя адгезию патогенов в желудочно-кишечном тракте, можно существенно улучшить общее состояние и повысить иммунологические показатели сельскохозяйственных животных.

Цель работы – оценка способности некоторых кормовых трав Пермского края модулировать биопленкообразование (адгезию) бактерий *Escherichia coli*. Данный вид бактерий является представителем условно-патогенной микрофлоры животных и человека и в определенных условиях может приводить к нарушениям работы желудочно-кишечного тракта.

Используя набор генно-инженерных штаммов *E. coli*, в данном исследовании оценивали эффекты разных доз водно-спиртовых экстрактов левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*), эспарцета песчаного (*Onobrýchis arenária*) и козлятника восточного (*Galéga orientális*) на биопленкообразование модельного штамма *E. coli* BW25113 на 96-луночных полистироловых планшетах через 22 часа инкубации методом окрашивания генцианвиолетом. Параметры роста (OD_{600}) и валового биопленкобрзования (OD_{540}) измеряли с помощью планшетного спектрофотометра xMark™ (Bio-Rad, США). В предварительных экспериментах были выбраны действующие дозы экстрактов 25, 50 и 100 мг сухого вещества/мл.

В контрольных культурах были выявлены следующие значения измеряемых параметров $OD_{600} = 0.307 \pm 0.010$ и $OD_{540} = 0.106 \pm 0.008$.

Установлено, что экстракт эспарцета в дозе 25 мг/мл оказывал слабое бактериостатическое действие на планктонные культуры *E. coli*, понижая OD_{600} до 0.273 ± 0.013 через 22 часа инкубации.

В наших условиях экстракты козлятника и левзеи дозозависимым образом подавляли валовое биопленкообразование до 3.5 раз по сравнению с контролем.

Полученные данные свидетельствуют о выраженной способности испытуемых растений модулировать рост и биопленкообразование условно-патогенной микрофлоры, что указывает на их высокий пребиотический потенциал. Следует отметить, что данные кормовые растения в достаточном количестве произрастают на территории Пермского края и являются компонентами кормов жвачных животных. Включение этих трав в состав комплексных кормов, может помочь решению проблем, связанных с влиянием патогенных микроорганизмов на работу желудочно-кишечного тракта животных. Требуется дальнейшее изучение механизмов наблюдаемых эффектов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-Урал 19–44–590009 и госзадания АААА-А19–119112290009–1

УДК 640

СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *B. SUBTILIS* С НОКАУТИРОВАННЫМИ ГЕНАМИ СУРФАКТИН-СИНТЕТЕАЗ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ФИТОПАТОГЕНЕЗ

Е.Р. Сарварова, Д.К. Благова, А.В. Сорокань, И.В. Максимов

Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, г. Уфа, Россия

Одно из важнейших условий достижения высокой урожайности сельскохозяйственных культур – это комплексная защита растений от различных вредителей и болезней. Современные химические препараты для растений негативно влияют на экологическую обстановку среды обитания. Поэтому на сегодняшний день, перспективным направлением считается разработка и использование в агропромышленности комбинированных препаратов на основе непатогенных бактерий, которые стимулируют рост, проявляют антимикробные и антифунгальные свойства, а так же служат альтернативой химическим препаратам.

В качестве основы таких перспективных средств являются эндофитные микроорганизмы, которые колонизируют внутренние растительные ткани, поддерживают рост и развитие растений, при этом не вызывая у них болезней (Sahu et al, 2017). Одним из таких штаммов является *Bacillus subtilis* 26Д, известный как основа промышленного универсального биопрепарата Фитоспорин-М («Башинком», Россия), который широко применяется в России. Ранее было установлено, что он способен продуцировать сурфактин [Максимов и др., 2020]. Сурфактин – циклический липопептид, проявляющий антибактериальную, антивирусную, антигрибную активности, вызывая лизис клетки, а также способствующий снижению продукции микотоксинов микроорганизмами [Mohammadipour et al., 2009]. Ранее так же было установлено, что геном штамма *B. subtilis* 26Д содержит ген *sfp*, кодирующий сурфактин-синтетазу [Бурханова и др., 2018]. Поэтому штамм *B. subtilis* 26Д был выбран как наиболее подходящий штамм для изучения роли сурфактина в защите растений от фитопатогенных микроорганизмов. Для синтеза сурфактина необходима 4-фосфопантенил-трансфераза, которая посттрансляционно фосфопантетенилирует сериновый остаток в доменных белках первых трех субъединиц (SrfABC) сурфактинсинтетазы [Quadri et al, 1998]. Нами были получены штаммы бактерий *B. subtilis* 26Д sfp – с неактивным геном *sfp* (4-фосфопантенил-трансфераза, X63158.1) и *B. subtilis* 26Д SN с неактивным геном sfpo (L17438.1). Целью данного исследования являлось сравнение рекомбинантных штаммов с исходным *B. subtilis* 26Д и выявление отличительных физиолого-биохимических и фунгистатических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для определения культурально-биохимических особенностей штаммов были выбраны основные признаки, которые, в соответствии с определителем бактерий Берджи, важны также для выяснения систематического положения бактерий.

Для определения антагонистической активности тест-объекты (*Fusarium sporotrichioides, Fusarium oxysporum, Fusarium avenaceum, Fusarium solani, Bipolaris sorokiniana, Phytophthora infestans Alternaria alternata, Alternaria solani, Septoria nodorum*) из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН выращивали на картофельно-глюкозном агаре при 27 °С, после образования мицелия с помощью бактериологической иглы вырезали агаровые блоки размером 5*5 мм. В другой чашке Петри на поверхность КГА высевали культуру исследуемого штамма в виде двух перпендикулярных друг другу штрихов и в центр образовавшихся долей чашки переносили агаровые блоки с тест-объектами [Whipps, 1987]. Чашки помещали в термостат при 27 °С на 3 дня. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемого штамма судили по величине радиуса зоны роста тест-объекта в сторону штрихов штамма (R_o) и в сторону краев чашки ($R_к$) и выражали в процентах проявления фунгистатической активности.

Для определения влияния бактерий на развитие симптомов фитофтороза использовали стерильные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в пробирках со средой Муросиге-Скуга. Через 10 суток культивирования обрабатывали бактериальной суспензией трех изучаемых штаммов путем нанесения 5 мкл суспензии (10^9 клеток/мл). Через 20 суток после обработки часть растений инфицировали спорами возбудителя фитофтороза (10^5 спор/мл) по 20 мкл на растение. Визуальные симптомы болезни наблюдали в течение 10 суток, листья фотографировали, фотографии анализировали в программе ImageJ, о пораженности судили по проценту поврежденной площади от общей площади листа.

Все эксперименты проводили не менее чем в 3 биологических и 3 аналитических проворностях. На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и их доверительные интервалы, рассчитанные по стандартным ошибкам. Достоверность различий между вариантами опыта оценивали по t-критерию Стьюдента при доверительном уровне $p < 0.95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнении биохимических свойств изучаемых штаммов мы не выявили существенных отличий между штаммами (табл. 1). Морфология клеток и колоний, спорообразование, окраска по Граму; рост при различных температурах, на разных средах, в анаэробных условиях и активность ферментов (амилаза, протеиназа, желатиназа, липаза, каталаза), утилизация углеводов (глюкоза, сахароза, маннит, лактоза); выделение индола, H_2 S и NH_3 одинаковы у всех штаммов. Отличие было выявлено в продукции рибонуклеазы – *B. subtilis* 26Д – 4,5, *B. subtilis* 26Дsfp- – 4 мм и *B. subtilis* 26ДSN – 2 мм.

Таблица 1. Культуральные и биохимические свойства штаммов

Свойства	Штамм		
	B.s. 26Д	*B.s.* 26Дsfp-	*B.s.* 26ДSN
Морфология клеток	палочки	палочки	палочки
Окраска по Граму	+	+	+
Спорообразование	+	+	+
Рост при температуре			
4 °C	-	-	-
50 °C	+	+	-
60 °C	-	-	-
Рост на средах:			
КГА	+	+	+
LB	+	+	+
Bacillus agar, цвет	зеленый	зеленый	голубой
2,5 % NaCl	+	+	+
6,5 % NaCl	+	+	+
Рост в анаэробных условиях	-	-	-
Активность ферментов:			
Амилаза	+	+	+
Протеаза	-		
Желатиназа	+	+	+
Липаза	+	+	+
Каталаза	+	+	+
Рибонуклеаза, мм	4,5	4	2
Утилизация углеводов:			
глюкоза	+	+	+
сахароза	+	+	+
маннит	+	+	+
лактоза	-	+	-
Утилизация мочевины	-	-	+
Реакция Фогес-Проскауэра	+	+	+
Выделение NH_3	-	-	-
Выделение индола	-	-	-
Выделение H_2 S	-	-	-

Изучение антагонистической активности штаммов (рис. 1) показало отличия в подавлении роста грибов: исходный штамм *B. Subtilis* 26Д проявлял активность в большей степени, чем рекомбинантные штаммы по отношению ко всем тестовым грибам. Наибольшее отличие в подавлении наблюдается на грибы *S. Nodorum* – 73.0, 50.0, 42.0 %, соответственно, и на *P. Infestans* – 89.4, 54.0 и 58.2 % соответственно.

Из рис. 2. Видно, что наиболее эффективным штаммом, снижающим развитие симптомов фитофтороза на листьях растений картофеля, является *B. Subtilis* 26Д. У штаммов *B. Subtilis* 26ДSN и *B. Subtilis* 26Дsfp-, не продуцирующих сурфактин, выявлено усиление восприимчивости растений к возбудителю фитофтороза по отношению к исходному штамму.

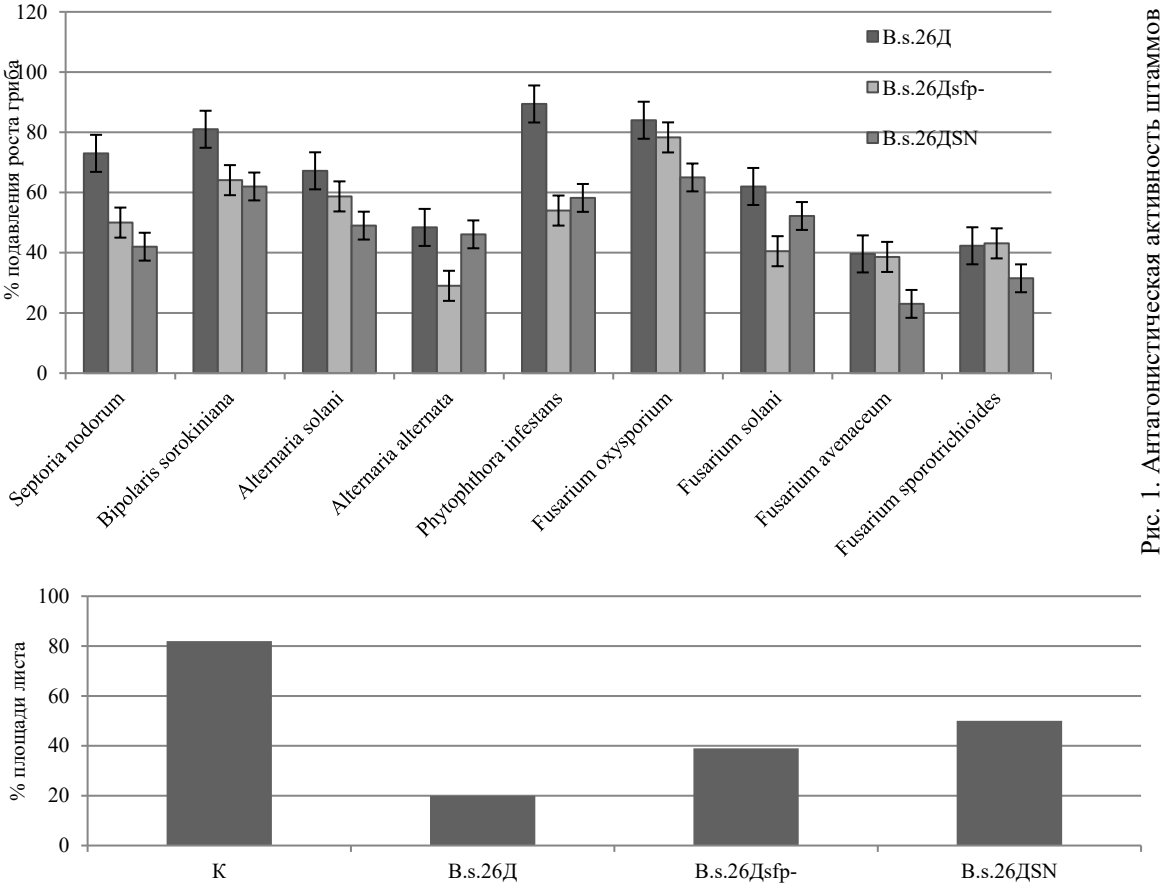


Рис. 1. Антагонистическая активность штаммов по отношению к фитопатогенным грибам

Рис. 2 Влияние бактерий *B. subtilis* 26Д, *B. subtilis* 26Дsfp- и *B. subtilis* 26ДSN на развитие симптомов фитофтороза на листьях растений картофеля на 10 сутки после инфицирования *P.infestans*

Таким образом, полученные рекомбинантные штаммы не отличаются от исходного штамма по основным культурально-биохимическим показателям и полученные результаты позволяют нам сделать вывод, что продукция сурфактина бактериальным штаммом *B. Subtilis* 26Д повышает устойчивость растений к фитопатогенным грибам.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-офи_м № 17–29–08014.

ЛИТЕРАТУРА

Бурханова Г.Ф., Черепанова Е.А., Благова Д.К., Максимов И.В. // Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего. Материалы межд. Научн. Конф. PLAMIC 2018, Уфа. 2018. С. 15

Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Sarvarova E.R., Rumyantsev S.D., Alekseev V. Yu., Khayrullin R.M. Recombinant Bacillus subtilis 26DcryChS line with gene Btcry1Ia encoding Cry1Ia toxin from Bacillus thuringiensis promotes integrated wheat defense against pathogen *Stagonospora nodorum* (Berk) and greenbug *Schizaphis graminum* Rond. // Biological Control. 2020. V. 144. Art. 104242. DOI 10.1016/j.biocontrol.2020.104242.

Mohammadipour M. et al. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing Bacillus subtilis isolates and evaluation of their biocontrol potential against Aspergillus flavus and Colletotrichum gloeosporioides //Canadian Journal of Microbiology. 2009. Т. 55. №. 4. – С. 395–404.

Quadri L.E.N. et al. Characterization of Sfp, a Bacillus subtilis phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases //Biochemistry. 1998. Т. 37. №. 6. P. 1585–1595.

Sahu P.K. et al. Bacterial Endophytes: Potential Candidates for Plant Growth Promotion //Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives. Springer, Singapore, 2017. P.611–632.

Whipps J.M. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. // New phytologist 1987. V. 107. P. 127–142

УДК 640

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ ПТИЦЕФАБРИК

О.С. Корнеева, Т.В. Свиридова, Г.П. Шуваева, О.Л. Мещерякова, Е.А. Василаки

В настоящее время средний уровень переработки отходов пищевой промышленности составляет около 20 %, остальные 80 % утилизируют путем сжигания или захоронения, что может привести к серьезным экологическим последствиям. Особенно актуальна эта проблема для птицеперерабатывающей промышленности. В процессе забоя птицы образуется большое количество отходов белковой природы, которые при рациональном подходе можно использовать для получения различных полезных продуктов – от белковых гидролизатов до биополимеров и биоводорода. Особые трудности возникают при утилизации пухо-перьевых отходов, составляющих около 7,5 % от живого веса птицы. Основным компонентом перьев является фибриллярный белок – кератин, высокоустойчивый к механической и химической обработке из-за большого количества дисульфидных связей.

Решение проблемы рациональной утилизации кератинсодержащего сырья возможно средствами биотехнологии, в частности, путем использования специфических ферментов ─ кератиназ (КФ 3.4.99.12), которые разрушают компактную структуру кератиновой молекулы до усвояемых компонентов, что способствует улучшению их функциональности и повышению биологической ценности.

На Российском рынке в настоящее время доминируют импортные ферментные препараты, в особенности кератиназы, которые производят такие компании, как DSM (Нидерланды), NOVUS (США), DuPont (США), Moehs Group (Испания). Их доля в общем объеме импорта 2019 года составила 78 %. На продукцию же отечественных производителей приходится только 20–22 % от всего товарооборота данного биопрепарата.

В связи в этим, поиск новых высокоактивных продуцентов кератиназ, подбор питательной среды и рациональных условий их культивирования, обеспечивающих максимальную биосинтетическую способность микроорганизмов, является перспективным направлением исследований в биотехнологии. Способностью синтезировать кератиназу обладают представители микромицетов, бактерии, активные продуценты встречаются среди актиномицетов.

Поэтому, объектами наших исследований служили микомицеты *Aspergillus niger* и бактерии родов *Bacillus subtilis* и *Streptomyces variabilis* из музея чистых культур кафедры биохимии и биотехнологии ВГУИТ.

Скрининг микроорганизмов-продуцентов кератиназ осуществляли на различных питательных средах следующего состава г/л: среда ISP – пивное сусло 90 см^3, крахмал растворимый 5 г, карбонат кальция 3 г, дрожжевой экстракт 5 г; Среда Чапека; пивное сусло с содержанием 7–8 % сухих веществ; мясо-пептонный бульон. Культивирование продуцентов проводили при температуре 27℃, частоте вращения шейкер-качалки 150 об/мин, в течение трех суток.

Кератиназную активность определяли спектрофотометрическим методом. В качестве субстрата использовали перо (прошедшее предварительную обработку хлороформом и высушенное на воздухе) в 0,05 М баратном буфере pH 9,0. Гидролиз проводили при температуре 37℃ в течение 3 ч, нерасщепленный белок осаждали раствором трихлоруксусная кислоты и фильтровали. В фильтрате измеряли оптическую плотность при длине волны 340 нм. За единицу кератиназной активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мг белка в 1 см^3 за 1 час в оптимальных условиях опыта.

Установлено, что максимальную биосинтетическую способность в отношении кератиназы проявлял актиномицет *St. variabilis* на модифицированной среде ISP, содержащей в качестве источника углерода картофельный крахмал в количестве 0,5 %, источника азота – 0,5 % пера, которую использовали в дальнейших исследованиях. Подбор оптимальных условий культивирования продуцента показал, что максимальное накопление кератиназы наблюдалось при начальном значении pH среды 8,0, температуре 25 °С и продолжительности выращивания 72 ч.

Таким образом, культивирование *St. variabilis* на модифицированной питательной среде ISP при оптимальных параметрах процесса позволило повысить биосинтетическую способность актиномицета в отношении кератиназы в 2,9 раза.

*УДК 630*165.6: 631.147(075.8)*

БИОТЕХНОЛОГИИ И ТРАДИЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ РАЗМНОЖЕНИЯ И СОЗДАНИЯ КУЛЬТУР ТОПОЛЯ В ЛЕСНОМ ХОЗЯЙСТВЕ ЦЧР

А.И. Сиволапов[1], В.А. Сиволапов[2]

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

В зоне защитного лесоразведения плантационное лесоводство является одним из путей интенсификации древесины [5]. Наиболее перспективным для плантационного выращивания является тополь *(Populus sp.)*, который за быстроту роста и скороспелость в ЦЧР называют «эвкалиптом Севера». Древесина тополя уступает сосне и, конечно, дубу, однако, находит применение для термомеханического модифицирования, для целлюлозно-бумажного производства, вискозной промышленности, спичечного и фанерного производства. Тополь используется для укрепления оврагов, лесомелиорации пойм, полезащитного лесоразведения, озеленения городов (мужские экземпляры) и т. д. Тополь наиболее продвинут в селекционном отношении. Для него получены не только гибриды, но и сорта [2, 3, 5]. Особый практический интерес представляют триплоидные тополя (2n=3x=57), нередко проявляющие соматический гетерозис и устойчивость к различным биотическим и абиотическим факторам [4, 9]. Высокая скорость роста и легкость вегетативного размножения большинства видов и гибридов, более раннее (по сравнению с основными лесообразователями) наступление эксплутационной зрелости и более короткий период ротации создают преимущества для плантационного (ускоренного) выращивания ценных форм и сортов на древесину, фитомассу (для получения кормовых добавок сельскохозяйственным животным) и целей биоэнергетики [5].

Некоторые представители подрода Лейка – *Leuce Dode* и настоящие тополя (*Eupopulus Dode*) из секции черных тополей (осокорь), белых тополей (тополь белый и сереющий) и осина относятся к трудно черенкуемым традиционным способом. Тополь белый (P. *alba* L.) и т. сереющий (*P. canescens* Sm.), являющийся спонтанным гибридом между тополем белым и осиной, по продуктивности древостоев, качеству древесины и др. значительно превосходят тополя других видов, произрастающих в лесах Воронежской области, в том числе черный, или осокорь – *P. nigra* L. По этой причине многие ценные формы, гибриды и полиплоиды тополя белого и сереющего (высокопродуктивные, декоративные, засухо- и морозоустойчивые и др.) не находят широкого применения в практике лесного хозяйства [4, 7–9].

Из традиционных методов размножения трудноукореняемых тополей наиболее успешным является зеленое черенкование. На успешность зеленого черенкования гибрида тополь белый × осина (искусственно полученного тополя сереющего) большое – решающее влияние оказывают условия среды, в которых укореняются черенки. Оптимальные условия среды (температура, влажность, освещенность) очень резко, в несколько раз увеличивают процент укореняемости черенков и одновременно увеличивают рост саженцев. Так, укоренение черенков искусственного гибрида тополь белый × осина без их обработки (контроль) было в теплице (оптимальные условия) – 82 %, повышая в лучших условиях среды и процент укоренения обработанных стимуляторами черенков. В этом же опыте черенки, обработанные этилкротиловым эфиром, в полиэтиленовом укрытии укоренились на 61 %, в теплице – на 86 %. Средняя высота укорененных саженцев в теплице достигала 40 см. [3].

Ряд исследователей, производивших опыты по зеленому черенкованию белых тополей, отмечают большую важность для успеха дела заготовку зеленых черенков на определенном этапе развития побега, в самом начале его одревеснения у основания прироста. Этот этап нам удалось определить для условий района Воронежа на основе фенологических наблюдений, увязать со сроками и фазами цветения акации белой, что имеет существенное значение для своевременной заготовки зеленых черенков.

На основе опытов для практических целей успешного зеленого черенкования гибридов т. белый × осина можно рекомендовать:

1) Заготовку черенков с маточных плантаций в оптимальные сроки с придержкой для них по срокам цветения белой акации.

2) Производить черенкование в оптимальных условиях среды, указанных для теплицы без применения стимуляторов, поскольку оно в этих условиях не эффективно.

3) При черенковании в менее благоприятных условиях – полиэтиленовые укрытия, теплицы с пониженными условиями, по сравнению с оптимальными для гибрида т. белый × осина (температура, влажность, освещенность) – применять обработку зеленых черенков стимуляторами: этилкротиловым эфиром этиленгликоля и гетероауксиновой пудрой.

Размножение сортов тополя Хоперский 1 и Приярский зелеными черенками.

Тополь сереющий относится к слабоукореняющимся породам. Первые опыты по их размножению предварительно обработанными зимними черенками (от взрослых деревьев 20–40 лет) в открытом грунте не дали положительных результатов. Тогда для «омоложения» побегов от отобранных деревьев (Хоперского триплоидного тополя, дерево 1, пол женский, в возрасте 41 года и Донского – пол мужской, в возрасте 23 лет) были сделаны прививки черенками в боковой зарез коры. Подвоем служили черенковые саженцы тополя белого и гибрида тополь белый × осина, высаженные в клоновом архиве мутантов тополя в Семилукском лесопитомнике. Женский клон полиплоидной формы тополя сереющего (родоначальник сорта тополя Хоперский 1) уже в первый год дал высокую приживаемость прививок, в то время как мужской клон (по фенотипу близок к осине, в последствии сорт тополя Приярский) только на третий год дал две удачные прививки из девятнадцати. Низкая приживаемость прививок объясняется, по-видимому, несовместимостью древесины подвоя и привоя: у тополя Приярского плотность древесины как у дуба, а у подвоев более низкая плотность древесины.

Размножение сортов зелеными черенками. При этом способе в качестве черенков используют облиственные части однолетних побегов, которые отрезают от ветвей маточных растений без существенного для них ущерба. Наличие на черенках листьев, активная дифференциация меристематических тканей и их высокая жизнедеятельность способствуют регенерационным процессам и восстановлению целостности организма. Применение же синтетических регуляторов роста для обработки черенков позволяет ускорить корнеобразовательный процесс, улучшить развитие корневой и надземной систем и увеличить выход укорененных черенков.

Для тополя Хоперский 1 лучшим сроком заготовки побегов считается 3 – 5-дневный срок после начала цветения акации белой. К этому времени побеги становятся упругими, корка в нижней части начинает буреть (одревесневать). Определенных календарных сроков для их заготовки побегов назвать нельзя, так как они зависят от погодно-климатических условий района черенкования. Пример конкретного выполнения:

Однолетние (мощные) побеги с прививок тополя Хоперский 1 в возрасте 3 – 4 лет были использованы для заготовки черенков. Черенки обрабатываются водным раствором лактонов РВУ-1 и РВУ-9 в концентрации 0,01 % при экспозиции 18 час. В качестве контроля берутся черенки, обработанные в воде. Подготовленные черенки высаживаются в теплицу с полиэтиленовым покрытием на песчано-торфяной субстрат (соотношение песка и торфа 1:1). Опыты закладываются в 3 – 6-кратной повторностях с количеством черенков от 30 до 60 (рисунок 1).



Рисунок 1 – Размножение тополя Хоперский 1 зелеными черенками

В теплице с туманообразующей установкой поддерживали относительную влажность воздуха около 80 %. По данным осенней инвентаризации, определено, что в контрольном варианте укоренилось 73,4 % черенков, при обработке черенков лактоном РВУ-9–80 %, РВУ-1–93,6 %. При замерах высот у укорененных черенков выявлено, что в опытных вариантах высота черенковых саженцев превзошла контрольные. Если в контрольном варианте она составила всего 9,3 см, то в опытах при обработке РВУ-1 – 11,9 см, а РВУ-9 – 16,4 см, то есть превышение достигло 29–80 % (рис. 2, 3).

Тополь сереющий Приярский не черенкуется, для него применяют только биотехнологии in vitro. Применение современных технологий *in vitro* позволит в полной мере использовать селекционные достижения и проводить интенсивное выращивание качественного посадочного материала ценных генотипов тополя (трудно размножаемых обычными способами) для плантационного лесовыращивания [1, 3, 6].

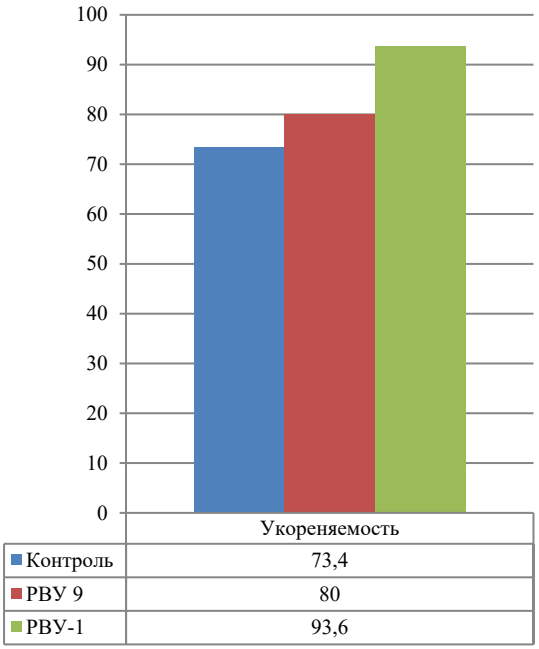


Рисунок 2 – Укореняемость зеленых черенков

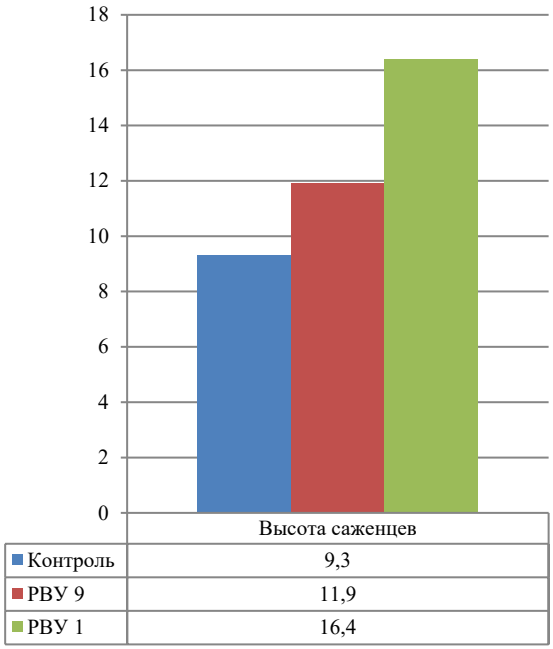


Рисунок 3 – Высота 1-летних черенковых саженцев тополя сереющего Хоперский – 1 тополя сереющего Хоперский – 1

Далее приводятся основные этапы выращивания посадочного материала, а также особенности, при выполнение которых существенно повышается эффективность работы и дает одинаково хороший результат для трудно размножаемого сорта тополя сереющего [2].

Микроклональное размножение можно разделить на несколько этапов:

1 этап – Заготовка побегов, изоляция эксплантов и получение асептических жизнеспособных культур. Получение асептических культур взрослых древесных растений, которые в то же время имеют высокую жизнеспособность и морфогенетическую активность – один из сложных и непредсказуемых моментов культивирования *in vitro*. Это связано с большой бактериальной и грибковой зараженностью исходного материала, а также уменьшением и иногда полной потерей с возрастом тканями регенерационной активности. Лучшим сроком заготовки побегов тополя с маточного взрослого дерева и изоляции эксплантов для культивирования в условиях *in vitro* является июнь месяц. Отбираются побеги с хорошо выраженными пазушными почками и междоузлиями. Срезанные побеги помещают в банках с водопроводной водой в условия холодильника (температура 10–12° С), где выдерживают в течение 3 – 5 суток для их холодовой предобработки перед изоляцией эксплантов.

Стерилизация побегов: предварительно отрезки побегов величиной 10 см тщательно промывают теплой водой с хозяйственным мылом, а затем подвергают поэтапной стерилизации:

1) Поверхностная стерилизация коммерческим 2 % раствором “Domestos” (подогретым до 30–40^0 С) в течение 15 минут с дальнейшей промывкой в проточной водопроводной воде (не менее 20 минут). Реализуется в нестерильных условиях.

2) Основная стерилизация побегов в асептических условиях (в условиях ламинар-бокса) 0.025 % раствором мертиолята в сочетании с жидким дезинфицирующим 7 % р-ром “Белизна” в течение 15 мин, с дальнейшей 5-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Для оптимального смачивания побегов во время важнейший стерилизации в раствор мертиолята рекомендуется добавить Твин 20 (0,08–0,12 %).

Такой способ стерилизации обеспечивает получение до 90 % асептических жизнеспособных культур.

2 этап – Индукция развития основного пазушного побега на первичных эксплантах.

Простерилизованные побеги разрезают в асептических условиях на небольшие части величиной 1,5–2 см с одной пазушной почкой. Экспланты в ламинар-боксе размещают в вертикальном или слегка наклонном положении по одному в культуральные сосуды (стеклянные биологические пробирки) с питательной средой WPM (среда № 1) с добавлением 6-БАП (6 – бензиламинопурина) 0,5 мг/л, ГК (гиббереллловой кислоты) 0,2 мг/л. Условия климатического режима: 16-ти часовой фотопериод при освещенности 2–3 кл, температуре 24–26° С. Через 2–4 недели культивирования из пазушной почки формируется основной побег.

Добавление в питательную среду ГК дает возможность не только повысить количество морфогенных культур в 1,9 раз – у тополя Приярского, но и способствует доращиванию побегов. В этом случае в течение следующего времени с момента начала культивирования развиваются побеги, выделяющиеся хорошим ростом в высоту (4 – 8 см) с необычно развитыми листовыми пластинками, отсутствием признаков сомаклональной изменчивости. Низкое содержание БАП в среде (0.2 мг/л) на начальном этапе культивирования недостаточно для результативной индукции и развития первичных побегов. Более же большое содержание БАП в среде (1.0 мг/л) угнетает развитие эксплантов и рост побегов в высоту.



Рисунок 4 – культуры тополя сереющего из регенерантов in vitro. Возраст 23 года.

Для повышения количества индуцированных побегов представляется рекультивирование первичных эксплантов с отрезанным пазушным побегом (снятие апикального доминирования) на среде WPM с уменьшенным содержанием БАП – 0.2 мг/л и выключении ГК 0.2 мг/л или НУК 0.05 мг/л. В этом случае в течение месяца культивирования совершается усиленное множественное формирование дополнительных побегов, выделяющихся хорошим ростом (3–5 см) и нормальным развитием. Количество побегов на 1 эксплант составляет от 6 до 14 побегов.

3 этап – Укоренение изолированных побегов и их мультипликация (собственно клональное микроразмножение) в условиях in vitro.

Образовавшиеся пазушные или индуцированные дополнительные побеги (достигшие высоты 1,5 – 3 см) отделяют и переносят на среду для самопроизвольного укоренения – WPM или ½ WPM (с пониженным содержанием макросолей) без гормонов. Более значительные побеги перед посадкой разрезают на микрочеренки с одной пазушной почкой размером 1,5–3 см. Результативность укоренения микропобегов в этом случае была высокой и составила до 94 %. На фоне значительной укореняемости микропобегов наблюдался их неплохой рост в высоту. К концу первого месяца культивирования побеги достигали 5–7 см, а через два месяца – 7–12 см.

Таким образом, указанные питательные среды стали наилучшими не только для самопроизвольного укоренения микрочеренков, но и для их доращивания.

Для микроклонального размножения рекомендуется использовать все микрочеренки растения-регенеранта, что позволяет поднять продуктивность работы. Это связано с отсутствием основных различий между черенками разного яруса одного растения (верхняя, средняя, нижняя часть побега) по действенности их укоренения в условиях *in vitro*. Все одноузловые сегменты отлично укореняются и имеют нормальный рост.

4 этап – Адаптация в почвенном субстрате в условиях лаборатории и прямая высадка растений из пробирочной культуры в почву, минуя промежуточный этап доращивания в лаборатории.

Прямая высадка растений из пробирочной культуры в почву предусматривает отсутствие промежуточного этапа доращивания в лаборатории.

Растения, извлеченные из пробирок, пикируют в прямолинейные бороздки, сделанные в хорошо разрыхленном и выровненном грунте. Проливают слабым раствором марганцовки ($KMnO_4$), присыпают почвой, уплотняют. После успешного укоренения растений и начала их роста в высоту для снижения влажности исключают дополнительный прикорневой полив. Размещение растений – от 100 до 200 штук на 1 м^2 прямолинейными рядами. Междурядье не менее 10 см. Такое размещение способствует качественному и своевременному уходу (рыхление, прополка) в течение первого вегетационного периода, что, в свою очередь, повышает приживаемость пробирочных растений в почве.

Прямая высадка микрорастений тополя сереющего Приярского дала более значительный результат приживаемости до 85,2 %, чем поэтапная адаптация в теплице. Из регенерантов тополя созданы культуры (рисунок 4).

Таким образом, для размножения тополей чаще всего применяют черенкование, а для трудно укореняемых – биотехнологию in vitro и создают культуры.

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. Машкина, О.С. Методические рекомендации по выращиванию посадочного материала сортов тополя сереющего с использованием технологии in vitro/ О.С. Машкина, А.И. Сиволапов, Т.М. Табацкая; ВГЛТА – Воронеж, 2011. – 30 с.
3. Сиволапов, А.И. Тополь сереющий: генетика, селекция, размножение: монография/ А.И. Сиволапов; ВГЛТА, ВГУ, 2005. – 157 с.
4. 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.
5. 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
6. 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.
7. Сиволапов, А.И. Аллотриплоидные клоны тополя сереющего (Populus canescens Sm.), отобранные в пойме Хопра и Дона – крупное достижение кафедры лесных культур в селекционном лесоводстве/ А.И. Сиволапов // Успехи современного естествознания. – 2020. – № 2. – С. 25–30.
8. Царев, А.П. Сортоведение тополя [Текст] / А.П. Царев. – Воронеж: ВГУ, 1985. –152 с.
9. 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.

УДК 579.647

ВЛИЯНИЕ АССОЦИАЦИЙ ЭФФЕКТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

А.К. Саданов, И.Э. Смирнова

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

В настоящее время, состояние сельского хозяйства заставляет обратить внимание на рациональное использование природных ресурсов при производстве агропродукции. Применение интенсивных технологий в сельском хозяйстве, основанных на химизации производства, приводит к загрязнению окружающей среды, снижению почвенного плодородия и ухудшению качества продуктов питания [1, 2]. В этой связи, необходимо разрабатывать альтернативные пути повышения урожайности агропродукции. Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) является основной технической культурой для производства сахара в странах умеренного климата. Однако, урожайность этой культуры в России и Казахстане по сравнению с другими странами мира низкая. По данным ФАО средняя урожайность сахарной свеклы в 2015 году в США составляла 493,0 ц/га, России -275,9 ц/га, в Казахстане – всего лишь 135,3 ц/га [3]. Применение пестицидов и стимуляторов роста для повышения продуктивности сахарной свеклы отрицательно сказывается на наконечном продукте – значительно понижается сахаристость клубней и выход сахара. Альтернативой химическим агентам являются препараты на основе микроорганизмов, по сравнению с которыми микробные препараты имеют значительные преимущества: экологическая безопасность, низкая токсичность, полифункциональность и низкая стоимость [4, 5]. В последнее время, все чаще для сельскохозяйственных нужд стали использовать препараты, состоящие из агрономически ценных или эффективных микроорганизмов (ЭМ-ассоциации), обладающих комплексным действием. Использование таких ассоциаций позволяет повысить продуктивность агрокультур, улучшить качество конечной продукции и снизить потребности в минеральных удобрениях [6, 7]. Основу таких ассоциаций составляют живые клетки почвенных и ризосферных микроорганизмов, обладающие производственно-ценными свойствами [8-10]. Ранее нами были созданы ЭМ-ассоциации, состоящие из чистых культур почвенных бактерий, предназначенные для использования под культуру сахарной свеклы. Изучена способность ассоциаций к фиксации азота атмосферы, мобилизации фосфатов почвы и их антагонистическая активность к фитопатогенам сахарной свеклы [11–12]. Целью данного исследования было изучение способности ЭМ-ассоциаций к стимуляции роста и развития сахарной свеклы, и отбор наиболее перспективных ассоциаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись ранее созданные ассоциации эффективных микроорганизмов (№ 18, 21, 58 и 72). В состав ЭМ-ассоциаций входили азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*, фосфатмобилизующие бактерии рода *Bacillus* и целлюлолитические бактерии рода *Bacillus*. Соотношение штаммов бактерий в ЭМ-ассоциации – 1:1:1.

Для изучения ростостимулирующей способности ЭМ-ассоциаций, бактерии выращивали отдельно на жидких элективных средах. Целлюлолитические бактерии культивировали на среде Гетчинсона, азотфиксирующие – на среде Эшби, фосфатмобилизующие – на среде Муромцева. Культивирование микроорганизмов проводили на шейкере (180 об/мин) при температуре 28 °С. Титр суспензий клеток бактерий составлял 1×10^7кл/мл. В опытах использовали семена сахарной свеклы сорта «Айсултан». Изучение ростостимулирующей активности ассоциаций проводили в два этапа: отбор активных ассоциаций в чашках Петри и в модельных опытах в ризосфере растений.

Для выращивания растений в чашках Петри использовали среду Ковровцева. Перед посевом семена обрабатывали суспензией ассоциации в концентрации 1×10^7 клеток на 1 г семян в течение 2 ч при комнатной температуре. В контрольном варианте семена замачивали в стерильной воде. Опыты проводили в камере роста (Constant Climate Chamber HPP-750, «Memmert», Germany). Параметры влажности, освещенности и температуры в камере соответствовали усредненным показателям весеннего периода года. Повторность опытов 3-х кратная.

В модельных опытах семена сахарной свеклы высевали в вегетационные сосуды емкостью 2 литра по 12 семян на сосуд. После прорастания семян в ризосферу проростков вносили жидкую суспензию ассоциаций с титром 1×10^7 клеток/мл из расчета 10 мл на 1000 г. почвы. Модельные опыты проводили, на открытых уличных площадках, в условиях приближенных к полевым условиям. Длительность опыта составляла 60 суток.

Всхожесть семян определяли посредством подсчета количества проросших семян в опытах и контроле. Оценку ростостимулирующего действия производили путем измерения длины стебля, корней, подсчета числа листьев на одно растение и сравнивали их с соответствующими показателями в контроле без обработки [13, 14].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «STATISTICA 10.0» [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении ростостимулирующей способности ЭМ-ассоциаций в чашках Петри в лабораторных условиях установлено, что инокуляция семян суспензией ЭМ-ассоциаций положительно влияет на всхожесть семян, рост и развитие проростков сахарной свеклы. Полученные данные представлены на рисунке 1.

Из результатов, представленных на рисунке 1, следует, что при инокуляции семян ЭМ-ассоциациями длина стебля проростков сахарной свеклы увеличилась в 4,0–4,4 раза, длина корня в 2,4–2,5 раза, а число листьев на одно растение возросло в 3,0 раза по сравнению с контролем. Также установлено, что обработка семян бактериальными суспензиями ассоциаций значительно повышала всхожесть семян. Так, всхожесть обработанных семян возросла до 68–75,6 %, в контрольном варианте всхожесть составляла только 52,3 %. Кроме того, установлена высокая пораженность проростков сахарной свеклы фузариозной гнилью, которая в контроле доходила до 60 %. В вариантах с обработкой семян ЭМ-ассоциациями пораженность проростков растений не выявлена.

Поскольку, планируется применение ЭМ-ассоциаций на полях, где присутствуют неблагоприятные факторы для развития сахарной свеклы, изучили влияние ассоциаций в ризосфере этой культуры. В опытах использовали почву, собранную в Жамбылской области, основном свеклосеющей регионе Казахстана. Установлено, что почва характеризуется невысоким содержанием питательных веществ, низкой общей численностью микроорганизмов и присутствием большого количества фитопатогенных микроорганизмов грибного происхождения. Модельные опыты проводили на открытых уличных площадках в условиях приближенных к полевым условиям. Семена высевали в вегетационные сосуды с почвой, после прорастания семян в ризосферу проростков в соответствие с методикой вносили жидкую суспензию ЭМ-ассоциаций. Длительность опытов составляла 60 суток. Полученные данные представлены на рисунке 2.

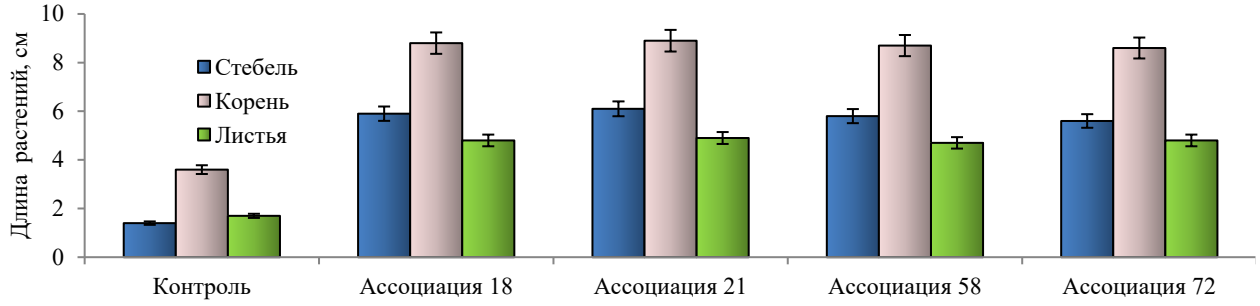


Рисунок 1 – Ростостимулирующая активность ЭМ-ассоциаций в чашках Петри

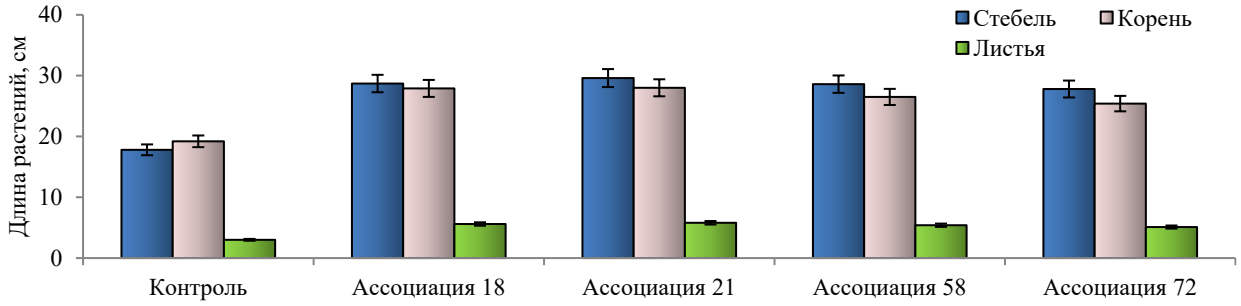


Рисунок 2 – Ростостимулирующая активность ЭМ-ассоциаций в ризосфере проростков сахарной свеклы

На рисунке 2 показано, что инокуляция суспензий ЭМ-ассоциаций в ризосферу проростков вызывала активную стимуляцию роста и развитие растений сахарной свеклы. Так, средняя длина стебля увеличилась в 1,6–1,7 раза, а корня – в 1,3–1,5 раза по сравнению с контрольным вариантом. Также, установлено повышение всхожести обработанных семян до 78,9 %, в контрольном варианте всхожесть составляла 60,4 %. Кроме того, отмечено, что пораженность растений корневыми гнилями, вызываемых фитопатогенными грибами родов *Fusarium* и *Alternaria*, отсутствовала. В то время как, в контрольном варианте она доходила до 25–30 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано наличие ростостимулирующей активности у исследуемых ЭМ-ассоциаций. Установлено, что инокуляция семян сахарной свеклы бактериальными суспензиями ассоциаций не только стимулирует рост и развитие растений сахарной свеклы, но и значительно повышает всхожесть семян. Кроме того, установлено существенное снижение пораженности растений сахарной свеклы корневой гнилью, что предполагает наличие у штаммов ассоциаций антифунгальной активности по отношению к грибным фитопатогенам, вызывающих эти гнили. Показано, что ассоциации № 18 и 21 обладали наиболее высокой ростостимулирующей способностью и их можно рекомендовать для практического применения.

Применение ЭМ-ассоциаций в сельском хозяйстве экологически безопасно и соответствует требованиям охраны окружающей среды, поскольку основано на естественном взаимодействии организмов в природе, не приводит к загрязнению почвы и нарушению биологического равновесия, так как используемые микроорганизмы являются полезными представителями микрофлоры почв, участвующими в процессах повышения ее плодородия. Сами штаммы, входящие в состав ЭМ-ассоциаций, оказывают щадящее и мягкое действие на растения, и в отличие от химических удобрений не накапливаются в них, что позволяет получать экологически чистую продукцию.

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. Lawal T.E., Babalola O.O. Relevance of biofertilizers to agriculture // Journal of Human Ecology. 2014. Vol. 47(1). P. 35–43.
2. Singh D.P.,et al.. Agrowaste bioconversion and microbial fortification have prospects for soil health, crop productivity, and eco-enterprising // International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture. 2019. Vol. 8. P. 457–472.
3. www.fao.org/about/en/ (опубл. 12.05.2018).
4. Пусенкова Л.И., и др. Повышение адаптивного потенциала посевов сахарной свеклы микробными биопрепаратами в условиях биотических и абиотических стрессов // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. № 1. С. 115–123.
5. Manici L.M., Caputo F., Saccà M.L. Secondary metabolites released into the rhizosphere by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium* spp. as underestimated component of nonspecific replant disease // Plant Soil. 2017. Vol. 415(1–2). P. 85–91.
6. Hu C., Qi Y. Long-term effective microorganisms application promote growth and increase yields and nutrition of wheat in China // European Journal of Agronomy. 2013. Vol. 46. P. 63–67.
7. Olle C., Williams Y. Effective microorganisms and their influence on vegetable production // Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 2013. Vol. 88. P. 380–386. DOI: 10.1080/ 14620316. 2013.11512979.
8. Packialakshmi N., Yasotha C. Role of effective microorganism in unfertile soil // International Journal of Phytopharmacy. 2014. Vol. 4(1). P.25–27.
9. Алещенкова З.М., и др.. Азотфиксирующие и фосфатмобилизующие бактерии для стимуляции роста сельскохозяйственных культур // Вестник Башкирского университета. 2015. Т. 20. № 1. С. 82–86.
10. Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф., Шарипова М.Р. Ризосферные бактерии // Ученые записки Казанского университета. Серия естественные науки. 2016. Т. 158. № 2. С. 207–224.
11. Смирнова И.Э., и др. Целлюлолитические бактерии, перспективные для создания ЭМ-ассоциаций и их идентификация // Международные научные исследования. 2016. № 8. С. 92–97.
12. Смирнова И.Э., и др.Выделение и изучение свободноживущих азотфиксирующих бактерий из почв свеклосеющих регионов Казахстана // Международные научные исследования. 2018. № 1–2. С. 28–32.
13. Посыпанов, Г.С. Долгодворов В.Е., Жеруков Б.Х. Растениеводство. М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. 612 с.
14. Артамонова М.Н., и др.Ростостимулирующая активность ассоциативных ризобактерий *Pseudomonas pseudoalcaligenes* и *Bacillus subtilis* // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5. С. 637.
15. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. М.: Stat Soft, 2013. 268 с.

УДК 574:663/664

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ *ДЕРБЕННИКА ИВОЛИСТНОГО* (*LYTHRUM SALICARIA*), ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ ПАВЛОДАРСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Б.Ж. Баймурзина[1, 3], Д.К. – К. Шакенева[2], Н.П. Корогод[1], З.М. Хасанова[3], Л.А. Хасанова[3]

[1] Павлодарский государственный педагогический университет, Павлодар, Казахстан
[2] Университет Витаутаса Магнуса, Каунас, Литва
[3] Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия

Дербенник иволистный (*Lythrum salicaria)* – многолетнее травянистое растение, великолепный медонос, используемый также в качестве лекарственного средства в традиционной медицине и красителя в пищевой индустрии. Представляет интерес исследование элементного состава данного растения в контексте его практического использования в качестве основы для фармпрепаратов, БАДов, лекарственных и чайных сборов, а также продуктов функционального назначения [1–3].

Известно, что существенное влияние на изменчивость элементного состава растений оказывают почвенно-экологические условия их произрастания [4]. Установлена взаимосвязь между содержанием в почве некоторых химических элементов и синтезом растениями отдельных групп биологически активных веществ. Так, растения, продуцирующие гликозиды, избирательно поглощают Mn, Mo, Cr, алкалоиды – Cu, Mn, Co; сапонины – Mo, V, Cu, углеводы – Zn, дубильные вещества – Mn, Cu, Cr [5–8].

Однако содержание химических элементов в растениях зависит не только от почвенно-экологических условий их произрастания, но и видовых особенностей. Различные виды растений в одинаковых экологических условиях накапливают разное количество химических элементов, что связано со спецификой их метаболизма, избирательной способностью к накоплению тех или иных элементов. Одновременно наряду с биохимическими особенностями на степень накопления растениями химических элементов оказывает влияние синергизм и антагонизм между отдельными элементами. Элементный состав растений также зависит от фенофазы их развития, концентрации элемента в окружающей среде, метеоусловий, в связи с чем, содержание элементов в растениях может быть различным и колебаться в широких пределах [4].

Методом спектрального анализа были исследованы образцы *Дербенника иволистного* (*Lythrum salicaria)* в фазе цветения – начала плодоношения из 3-х населенных пунктов Павлодарской области Республики Казахстан: с. Теренколь, с. Мичурино, с. Аккулы, расположенных вдоль реки Иртыш. Содержание микроэлементов определялось с помощью рентген-флуоресцентного анализатора БРА-18 «Буревестник». Проведенный спектральный анализ обнаружил в каждом исследованном образце *Lythrum salicaria* 71 химический элемент. В образцах *Lythrum salicaria*, собранных как на территории с. Теренколь, так и на территории с. Мичурино и с. Аккулы наблюдалось преобладание таких микроэлементов, как Mn, Ti и Zn. Среди макроэлементов преобладали K и Ca, при этом доминирующим элементом *Lythrum salicaria* являлся марганец.

Минимально были представлены Cd, Sn и Cs. Содержание остальных макро- и микроэлементов было незначительным. Обнаруженные в составе изученного растения такие элементы как Pb, Sr и Hg не представляли опасности для здоровья человека, так как их содержание не превышало пределы, установленные СанПин для пищевых продуктов и БАД на растительной основе. Спектральный анализ растений *Дербенника иволистного* (*Lythrum salicaria)* продемонстрировал следующую общую тенденцию накопления химических элементов во всех образцах независимо от места их произрастания: Mn > Ti> Zn > Cu > Ba > Ca > K > Pb > Si > Cr > Ni>Co>Mg>P>Fe>I>S>Na.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ушбаев, К.У. Лечебные свойства растений Казахстана / К.У. Ушбаев, Г.К. Никонов. – Алматы, 1994. – 215 с.
2. Кисличенко, В.С. Лекарственные растения – источники минеральных веществ // Провизор, 1999. № 20
3. Исаев, Ю.А. Лечение микроэлементами, металлами и минералами / Ю.А. Исаев. – Киев: Здоровье, 1992. – 118 с.
4. Сосорова, С.Б. и др.Содержание микроэлементов в лекарственных растениях разных экосистем озера Котокельского (Западное Забайкалье) / // Химия растительного сырья, 2016 – № 2. – С. 53–59.
5. Визир, К.Л. Действие марганца на рост и развитие растений на различных этапах их онтогенеза / К.Л. Визир, З.М. Климовицкая // Микроэлементы в жизни растений, животных и человека. – Киев, 1964. – С. 18–33.
6. Гринкевич, Н.И. Влияние микроэлементов на содержание алкалоидов в красавке / Н.И. Гринкевич, Л.И. Боровкова, И.Ф. Грибовская // Фармация, 1970. – № 4. – С. 30–36.
7. Гринкевич, Н.И. Роль геохимических факторов среды в продуцировании растениями биологически активных веществ / Н.И. Гринкевич, А.А. Сорокина // Биологическая роль микроэлементов. – М, 1983. – С. 187–193.
8. Немерешина, О.Н. К вопросу о содержании микроэлементов в сырье перспективных видов лекарственных растений южного Предуралья // Вестник ОГУ. – 2006. – № 12. – С. 167–168.

УДК. 664. 959. 5(06)

ПОРИСТЫЕ КОЛЛАГЕНОВЫЕ СУБСТАНЦИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ СРЕДСТВ ЛИЧНОЙ ГИГИЕНЫ

И.В. Сухов, Л.В. Антипова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Совершенствование и создание новых средств личной гигиены является актуальной многоотраслевой задачей. [1–4] В частности, такие средства гигиены, как прокладки, тампоны, салфетки, памперсы и т. п., поглощают выделения организма и поэтому должны иметь как можно большую влагоёмкость, желательно с дезодорирующим эффектом и в то же время не должны доставлять дискомфорт, вызывать аллергию и ухудшать состояние кожи человека. [5–6] Проведены исследования взаимодействия коллагена пресноводных рыб с водой для определения перспектив его использования как материала впитывающего слоя средств личной гигиены. Предложен способ обработки шкур пресноводных рыб для получения материала с повышенной водопоглощающей способностью.

Исследуемый материал получали последовательной обработкой шкур рыб в слабых растворах щелочей и органических кислот. Определение степени набухаемости гидрата коллагена и материалов на его основепо «ГОСТ 24160–2014.» Степень набухания выражали в процентах. По степени набухания определяли способность коллагена поглощать воду в растворах органических пищевых кислот.

Степень набухания, (%) рассчитывали по формуле: $X=m_2*100\%/m_1$ (1) где m_2 – масса навески после набухания, г m_1 – исходная масса навески, г

В ходе экспериментальных исследований теоретически обоснована и экспериментально подтверждена возможность получения и применения влагоемких материалов, где в качестве сырьевого источника предполагаются шкуры толстолобика [7–11]. Благодаря использованию в технологии получения коллагенового продукта органической кислоты низкой концентрации достигается высокая степень разрыхления коллагеновых волокон в структуре тканей [11–16]. После высушивания обработанных основ полученные материалы обладают свойствами, которые позволяют влаге быть доступной фибриллам белка, тем самым повышая высокую степень гидратации и увеличивая объем впитываемой влаги (Рисунок 1)

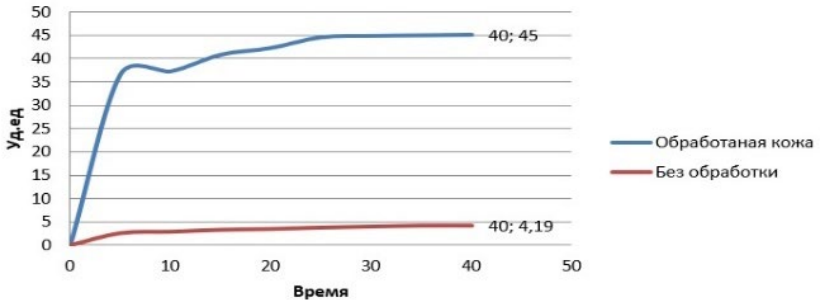


Рисунок 1. Графическая зависимость шкуры до и после обработки.

После обработки в растворах кислот и щелочей величина водопоглащения, отражающая влагоёмкость материала, повышается почти в 10 раз и составляет 45 г. на 1 г сухого вещества.

В результате проведенных исследований показано, что коллаген пресноводных рыб, после обработки в растворах щелочей и органических кислот, может быть применен как материал для впитывающего слоя средств личной гигиены.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Антипова Л.В., Сторублевцев С.А., Бобрешова М.В. Шкуры рыб – как объект для получения коллагеновых субстанций Научная конференция хранителна наука, техника и технологии – Научнитрудове Университет по хранителни технологии Пловдив; Том LIX. – 2012: 976–78

2. Антипова Л.В. Коллагены: источники, свойства, применения. Воронеж: ВГУИТ. 2014.

3. Батечко, С.А. Коллаген. Новая стратегия сохранения здоровья ипродления молодости [Текст] / С.А. Батечко, А.М. Ледзевиров – Колечково, 2010. – 244с

4. Борискина, Е.П. Физические факторы стабильности трехспиральныхструктур коллагенового типа [Текст] / Е.П. Борискина, Т.В. Больбух, М.А. Семенов, В.Я. Малеев // Биополимеры и клетка, 2006, № 6 с. 458–467.

УДК 663.8

ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОИЗВОДСТВА НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА

Л.В. Антипова, И.В. Новикова, Т.И. Романюк

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Согласно современной теории питания соединительным белкам причислена функция в пищеварении, аналогичная пищевым волокнам, что открывает перспективы в создании продуктов и напитков, улучшающих функционирование желудочно-кишечного тракта, т. е. продуктов функционального назначения. Коллагеновые белки из кожи рыбы отличаются более простой пространственной структурой и способны к растворению в нативном виде [1–2]. Высокая активность коллагена животных тканей к заживлению ран, способность к адсорбции химических соединений, включая витамины, антибиотики, ароматические компоненты, открывает широкие перспективы создания напитков специализированного и функционального назначения на основе растворимых форм коллагена. Растворимые формы коллагена возможно получить из сырья рыбного происхождения при тщательном подборе и научном обосновании технологических режимов. В этом случае жидкие коллагеновые дисперсии обладают нейтральным запахом и вкусом, прекрасно совмещаются с пищевыми ингредиентами и практически полностью перевариваются и усваиваются в желудочно-кишечном тракте человека. Все большую популярность набирает применение коллагена в производстве продуктов функционального назначения, разнообразных БАДов для спортивного, профилактического и повседневного употребления. Поскольку коллаген имеет нейтральный вкус и запах, он может добавляться в напитки [3]. Напитки относят к жидким продуктам питания, их значение в питании и формировании здоровья человека трудно переоценить. Особое значение для персонализированного питания они приобретают в связи с биологическим действием входящих компонентов за счет наличия усвояемых активных форм химических веществ природного происхождения. Большую популярность имеют напитки с использованием растительного сырья – известного источника витаминов, минеральных веществ, пищевых волокон.

Цель работы – обоснование компонентного состава и рецептуры напитков на основе растворимого коллагена рыбного происхождения.

Использовали гидрат коллагеновых белков из кожи толстолобика в виде дисперсии (полупрозрачная, гелеобразная жидкость от светло-желтого до белого цвета, с нейтральным запахом, без вкуса). В ходе экспериментальных исследований изучено влияние внешних факторов на органолептические и физико-химические свойства готовых напитков типа киселей, тонизирующих и коктейлей. Разработанные рецептуры и результаты анализа комплекса характеристик напитков из различных ассортиментных линеек позволяют рекомендовать их для удовлетворения потребительского спроса для профилактики, поддержания и коррекции физиологических состояний. В опытах in vivo доказано влияние компонентного состава на ароматические свойства, присутствие коллагена оказывает положительное действие на гистологические характеристики ЖКТ. В качестве ингредиентов в приготовлении напитков применяли растительное сырье, обладающее биологически активными свойствами – пюре малины, облепихи, экстракты шалфея и стевии, настои калины и боярышника. Провели дегустационную оценку различных вариантов купажей напитков в соответствии с правилами дегустации, использовали метод сенсорной оценки с построением профилограмм, были выбраны варианты с наилучшими дегустационными характеристиками.

Разработанные напитки позволят расширить ассортимент существующих безалкогольных напитков для различных рационов питания, исследования будут продолжены для разработки рентабельных продуктов функционального назначения с использованием коллагенового сырья с высокими органолептическими показателями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипова Л.В., Сторублевцев С.А. Сравнительные свойства коллагеновых белков рыбного и животного происхождения // Вестник Воронежского государственного университета. 2016. – № 4. – С. 123–126.
2. Антипова Л.В., и др.. Выбор коллагенсодержащего сырья и методов модификации соединительных тканей с целью получения коллагена // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2016. – № 1. – 43–46.
3. Антипова Л.В., Сторублевцев С.А., Гетманова А.А. Коллагенсодержащие напитки для функционального питания // Вестник ВГУИТ. – 2018. – Т. 80. – № 3. – С. 97–103.

УДК 663.5

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОРОЩЕННЫХ СЕМЯН РАЗЛИЧНЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В ИНДУСТРИИ ПРОДУКТОВ ЗДОРОВОГО ПИТАНИЯ

А.В. Черкасова, Л.П. Бессонова, Л.В. Антипова

Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

Анализ состояния здоровья населения в мировом масштабе свидетельствует об устойчивой тенденции к росту алиментарно зависимых заболеваний. Приобрели мировые масштабы целиакия, а также нарушение функций пищеварительного тракта из-за неприятия таких компонентов пищи как олигосахариды, в ряду которых особое место занимают лактоза молока и молочных продуктов. Это ограничивает ресурсы зерновых культур и источников животного белка в питании. Сложившаяся обстановка требует тщательного подбора источников пищи на основе глубоких знаний об их химическом составе, наличии биологически активных веществ и безопасности для здоровья человека.

Из растений в качестве источников белков, приближенных по свойствам к животным и «идеальному белку», следует выделить бобовые культуры. Применительно к условиям России перспективным сырьем можно признать чечевицу, которая показана в питании больных целиакией. Важно заметить, что чечевица содержит значительное количество полноценного белка, витаминов, клетчатки, минеральных веществ, что позволяет отнести ее к целебным культурам. Высокие функциональные свойства позволяют рассматривать ее не только как компонент комбинированной пищевой системы.

Использование белка чечевицы апробировано в технологии комбинированных мясных продуктов, при решении задачи повысить их усвояемость и обеспечить нормальное протекание обменных процессов в организме человека. Важно подчеркнуть пониженное содержание жира на 5 % в разработанных продуктах. Их пищевая ценность разработанных купатов меньше, чем в контрольном образце за счет заметного снижения содержания жира при увеличенном содержании белка.

Проращивание чечевицы позволяет избежать посторонние привкусы и запахи, снижающие потребительские качества для снижения жира в рационе питания и балансирования ингредиентного состава. Проведенный анализ показал, что содержание глютена в разработанных мясных продуктах соответствует требованиям, предъявляемым к питанию больных целиакией.

Другим перспективным растительным источником для разработки продуктов здорового питания являются семена тыквы. В семенах тыквы до 28 % ценных растительных белков, до 46,7 % жиров, нежная клетчатка. Пророщенные семена тыквы несут в себе огромный энергетический потенциал. Ферменты, содержащиеся в проростках, расщепляют запасные белки, жиры и углеводы этих семян, облегчая усвоение в пищеварительном тракте, и продолжают работать в организме человека, экономя его внутренние силы. При прорастании суммарное содержание антиоксидантов и витаминов в семенах тыквы увеличивается в разы, так как они встраиваются в органическую систему живой ткани растения и проявляют действие взаимосвязано, с усилением биологических эффектов. Суммарное содержание антиоксидантов (ССА) в процессе прорастания семян тыквы увеличивается в 10,1 раза, и достигает на пятые сутки 333 мг/100 г.

Учитывая, что проростки содержат большое количество биологически активных веществ, целесообразно применить данный компонент для получения творожного продукта с пролонгированным сроком хранения, а также изучить возможность его применения в мясных и рыбных системах.

Полученную информацию следует распространить среди населения и производителей через сеть Интернет в целях определения ожидаемых потребителей продукции и поиска инвестиций.

УДК 664.1

РАЗРАБОТКА МЕТАБОЛИЧЕСКИ АДАПТИРОВАННЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Ю.А. Семисажонова[1], Ж.В. Новикова[1], А.А. Максимкин[1], С.М. Сергеева[1], Д.С. Лавринович[2]

[1] Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия
[2] Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

В течение последних нескольких десятилетий в популяции человека произошли существенные изменения пищевого поведения, структуры питания и симбиотической микрофлоры, которые оказывают влияние на здоровье. Индустриализация, прежде всего, сельского хозяйства и пищевой промышленности, привела к изменению сырьевых ресурсов, используемых для изготовления продуктов питания. Увеличилось содержание в них искусственно созданных соединений, даже с потенциальными негативными эффектами на организм. Неправильный образ жизни, нерациональное питание, гиподинамия, вредные привычки, постоянный психоэмоциональный стресс основные факторы риска развития метаболического синдрома у современного жителя мегаполиса. Анализ состояния здоровья населения свидетельствует о неуклонном росте числа лиц, страдающих или склонных к различным заболеваниям, прежде всего к тем, которые получили название «болезни цивилизации» (оппортунистические инфекции, болезни сердца и сосудов, рак, мочекаменная и желчекаменная болезни, бронхиальная астма, гепатиты различного генеза, ожирение, подагра, остеохондроз, остеопороз, сахарный диабет и другие). По данным экспертов Всемирной Организации Здравоохранения многие из этих болезней являются основной причиной временной потери трудоспособности или инвалидности в самом работоспособном возрасте. Именно эти заболевания в настоящее время являются ведущей причиной сокращения продолжительности жизни, преждевременной смерти и инвалидности современного человека [2]. Между тем, человеческий организм – это сложная симбиотическая система. Координированная работа физиологических и регуляторных систем организма человека зависит от своевременного обеспечения многочисленными функциональными ингредиентами, в том числе за счет пищевых продуктов. Эти ингредиенты являются строительным и энергетическим материалом организма человека, регулирующим нормальную деятельность. Комплексный дефицит функциональных ингредиентов вначале носит обратимый характер. В последующем, при хронизации происходит переход функциональных изменений в необратимые, которые приводят к развитию различных патологических синдромов. В современных условиях наиболее частым последствием хронического дефицита функциональных ингредиентов является возникновение и прогрессирование метаболического синдрома [2]. В рамках решения данной проблемы идет агитация правильного питания и здорового образа жизни, а также поиск сырья и разработка новых пищевых продуктов способных снижать риск развития этих заболеваний. Матча – это «растертый чай» с уникальными свойствами. Его получают из чайного растения Camelliasinensis. В состав чая «Матча» входят аминокислоты, полифенолы, теофиллин, EGCG, пищевые волокна, витамины А, B_1, B_2, B_6, С, Е, К, минералы кальций, магний, фосфор, натрий, цинк, так же содержится больше антиоксидантов чем в чернике [4]. Вещества, входящие в состав зеленого чая «Матча», способствуют поддержанию здорового состояния организма человека, предотвращая развитие многих заболеваний. Присутствие L-теанина способствует выработке серотонина и дофамина, что улучшает мозговую активность и повышает настроение [3]. Зеленый чай «Матча» является мощным антиоксидантом, нормализует артериальное давление, является натуральным иммуностимулятором, способен ускорять метаболизм. Вышеперечисленные свойства данного чая легли в основу разработки технологии и рецептуры метаболически адаптированного функционального сбивного кондитерского изделия, а именно маршмеллоу, отвечающего потребностям людей, страдающих «болезнями цивилизации» [1].

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи: разработана оптимальная рецептура и технология производства кондитерского изделия маршмеллоу с введением зеленого чая «Матча», определены органолептические и физико-химические показатели качества, химический состав, определены возможности и угрозы при реализации нового продукта. Анализ химического состава разработанного кондитерского изделия показал, что 100 г. изделия обеспечивает удовлетворение суточной потребности на 83 % – в блоках ORAC, 300 % в полифенолах, 33 % в витамине А (ретиноле), 36 % в бета-каротине, 12 % в витамине B_1, 100 % в витамине К. При разработке метаболически адаптированного функционального сбивного кондитерского изделия, введение в рецептуру зеленого чая «Матча», позволит обогатить не только витаминами, но и не усваиваемыми пищевыми волокнами, которые в организме человека способны снижать гликемический индекс быстроусваиваемых углеводов. Создание низкокалорийного обогащенного маршмеллоу, позволит сделать его пригодным для питания людей, страдающих метаболическим синдромом и корректировать нутритивные нарушения у современного человека путем включения в рацион с учетом возраста, пола, профессии, условий и региона проживания конкретного человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новикова, Ж.В. Перспективы использования нетрадиционного сырья в российской пищевой промышленности // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2018. – № 6 (53). – С. 55–62.
2. Шендеров Б.А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. , 2008. С. 319.
3. Beneficial effects of green tea: A literature review / Mc [и др.]. // Chinese Medicine. – 2010. – № 4.
4. Matcha tea health benefits // AOImatcha: [сайт]. – URL: https://www.aoimatcha.com/matcha-health-benefits/

УДК 637.56:664

ВЛИЯНИЕ СЕМЯН КАНИХУА НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА РУБЛЕННЫХ КУЛИНАРНЫХ ИЗДЕЛИЙ

С.М. Сергеева[1], Ж.В. Новикова[1], А.А. Максимкин[1], Д.С. Лавринович[2]

[1] Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия
[2] Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

Теория рационального сбалансированного питания большое внимание уделяет энергетической ценности рационов и стремится к их оптимизации. В современных условиях высокая энергоемкость продуктов не является показателем их ценности. Население развитых экономических стран потребляет значительные количества рафинированных высококалорийных продуктов. Соответственно, актуальной является задача обеспечение потребления населением в достаточном количестве веществ, участвующих в физиологических процессах организма, а также создание продуктов, имеющих повышенную биологическую ценность [4, 5].

Политика Правительства в рамках реализации «Плана деятельности Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на период до 2024 года» и «Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года» ориентированы на обеспечение полноценного питания, профилактику заболеваний, увеличение продолжительности и повышение качества жизни населения, стимулирование развития производства и обращения на рынке пищевой продукции надлежащего качества [3, 6].

Рубленые полуфабрикаты из рыбы отличаются хорошими потребительскими свойствами, имеют достаточно высокую пищевую и биологическую ценность, но их состав не позволяет обеспечить сбалансированное и профилактическое питание. Внесение дополнительных компонентов из растительного сырья, например, семян канихуа, позволяет сократить технологические потери, увеличить выход готовых изделий, рационально использовать рыбное и растительное сырье, расширить ассортимент полуфабрикатов с высокой биологической ценностью, сбалансированным аминокислотным, витаминным и минеральным составом, высокими органолептическими показателями [1, 8, 9].

Канихуа – травянистое, однолетнее растение, вырастающее до 60 см в высоту. Канихуа (Kañihua или Kañiwa) является зрелым семенем породы Chenopodium pallidicaule. Канихуа обладает ореховым ароматом, который немного мягче и слаще, чем у киноа [10].

Сравнительны анализ пищевой ценности основного сырья, входящего в рецептуру рубленных кулинарных изделий из рыбного сырья, показал, что семена канихуа по содержанию белка на 6,89 %, жира на 4,89 %, суммарному содержанию витаминов группы В на 34,67 % превосходит пшеничный хлеб. Недостаток белка в организме человека, в соответствии с его суточными физиологическими потребностями, приводит к вовлечению белков тканей внутренних органов, в биохимические процессы, а образующиеся при этом аминокислоты расходуются на синтез биологически активных соединений, ферментов и гормонов [7]. Для предотвращения подобных нежелательных процессов необходимо потребление поликомпонентных продуктов, в которых с максимальной эффективностью использовались бы все аминокислотные преимущества каждого отдельного ингредиента [2]. Таким образом, принято решение произвести замену хлебного сырья на семена канихуа при разработке новой рецептуры рубленных кулинарных изделий.

Решение задачи, связанной с оптимизацией рецептуры рубленного кулинарного изделия, осуществляли путем построения математической модели при помощи симплекс метода и средств автоматизации с применением пакета программ MS Excel. Параметром оптимизации был выбран баланс незаменимых аминокислот. Соотношение рыбы к хлебу пшеничном в классической рецептуре составляет 81 к 19. В результате математического моделирования были получены 8 вариантов соотношений изменяемых ингредиентов, удовлетворяющих заданным условиям, рыбы к семенам канихуа от 81 к 19 до 46 к 54 с шагом 5 %. Наилучший баланс аминокислотного состава наблюдался в вариантах рецептур, содержащих большее количество растительного компонента (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты компьютерного моделирования

Наименования сырья	Соотношение компонентов %	Коэффициент сбалансированности аминокислотного состава
рыба: хлеб (контроль)	81:19	0,751
рыба: канихуа	81:19	0,758
	76:24	0,761
	71:29	0,765
	66:34	0,768
	61:39	0,772
	56:44	0,776
	51:49	0,780
	46:54	0,784

Согласно расчетным значениям коэффициента сбалансированности аминокислотного состава, для рыборастительных композиций замена хлеба пшеничного семенами канихуа приводит к улучшению сбалансированности аминокислот в белках комбинированных изделий как по количественному, так и по качественному составу аминокислот, отсутствию лимитирующих аминокислот, и, следовательно, являются биологически полноценными.

На основании изучения химического состава, пищевой ценности и органолептических свойств рубленных кулинарных изделий с внесением нетрадиционных сырьевых ингредиентов (семян канихуа) обоснована возможность их введения в рецептуру рыборастительных фаршей. Исследовано влияние семян канихуа на функциональные свойства, определена пищевая и биологическая ценность кулинарных изделий на основе рыборастительных фаршей.

ЛИТЕРАТУРА

Барсегян, А.Г. Натуральные ингредиенты для функционального и спортивного питания / А.Г. Барсегян. // М.: Пищевая промышленность. 2010. – С. 11.

Новикова, Ж.В. Перспективы использования нетрадиционного сырья в российской пищевой промышленности / Ж.В. Новикова, А.Д. Захарова, А.А. Максимкин, Ю.А. Семисажонова // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2018. – № 6 (53). – С. 55–62.

План деятельности Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на период до 2024 года (утв. Роспотребнадзором 01.02.2019). – Текст: электронный // КонсультантПлюс: [сайт]. – URL: http://www.consultant.ru/ document/cons_doc_LAW_ 332104/ (дата обращения: 18.06.2020).

Поверин, Д.И. Адекватное питание и его практическая реализация / Д.И. Поверин, Ю.А. Тырсин // Пищевая промышленность, 2005. № 8. – С. 6–9.

Позняковский, В.М. Кризис питания современного человека. Вопросы качества и безопасности пищевых продуктов / В.М. Позняковский, Н.Г. Челнакова // Известия вузов. Пищевая технология. 2004. – № 6. – С. 6–7.

Распоряжение Правительства РФ от 29.06.2016 N1364-р «Об утверждении Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года». – Текст: электронный // КонсультантПлюс: [сайт]. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_ 200636/ (дата обращения: 18.06.2020).

Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation. – Rome: FAO, 2013 – 66 p. Режим доступа: http://www.fao.org/3/a-i3124e.pdf. (Дата обращения 18.02.2019 г.).

Nittynen, L.M., Korpela, R.H. Role of arginine, taurine and homocysteine in cardiovascular diseases / L.M. Nittynen, R.H. Korpela // Ann Med. -2009. – № 5. – pp. 318–326.

Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Stanton, C. 2012. Health implications of high dietary Omega-6 polyunsaturated fatty acids. Journal of Nutrition and Metabolism, 1–16.

Repo-Carrasco-Valencia, R. Chemical and functional characterization of kañiwa (Chenopodium pallidicaule) grain, extrudate and bran./ Repo-Carrasco-Valencia, R., Acevedo de la Cruz, A., Icochea Alvarez, J.C., Kallio, H. // Plant Foods for Human Nutrition, 2009. P.94–101.

УДК 577.19

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕРОКСИДОВ НА РОСТ ЭНТАМОПАТОГЕННОГО ГРИБА ASCOSPHAERA APIS И ИХ ТОКСИЧНОСТИ ДЛЯ BOMBUS TERRESTRIS

М.Ю. Сыромятников [1,2], В.Н. Попов [1, 2]

[1] Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия
[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

В настоящее время в мире наблюдается тенденция снижения численности насекомых-опылителей. Резкому снижению численности насекомых-опылителей способствует синергетическое действие пестицидов и болезней, которые их поражают. Пестициды снижают общий иммунитет насекомых, что приводит к их повышенной восприимчивости к патогенам. Среди патогенов важнейших опылителей выделяют грибы, среди которых важную роль играет возбудитель аскофероза – Ascosphaera apis. Заболевание, вызванное данным патогеном, является самым заразным и разрушительным для медоносные пчелы. Недавно появились данные, что A. apis может вызывать заболевание шмелей.

На первом этапе нами осуществлялся поиск патогенных эукариотических микроорганизмов в личинках шмелей. Для этого содержимое кишечника шмелей высевали на среду Сабуро. Далее из выросших колоний (либо мицелия) микроорганизмов осуществляли выделение ДНК и проводили секвенирование с универсальными для грибов праймерами. Секвенированные последовательности сопоставляли с уже имеющимися в базах данных GenBank и BoldSystem. В результате в кишечники личинок шмелей нами были выявлены следующие эукариотические микроорганизмы: Lachancea thermotolerans, Mucor racemosus, Naganishia adeliensis, Penicillium commune, Rhodotorula mucilaginosa, Ascosphaera apis. Далее нами было исследовано влияние новых биоразлагаемых фунгицидов (синтетических пероксидов) на грибковый патоген шмелей и пчел – A. apis, изолированный из Чашки Петри. Было показано, что синтетические пероксиды обладают высокой фунгицидной активностью в отношении A. apis. Пероксиды вызывали ингибирование роста мицелия 94–100 % при концентрации 30,0 мг/л, при этом, интересно, что два синтетических пероксида обладали более высокой противогрибковой активностью, чем коммерческий фунгицид Триадимефон. Исследуемые пероксиды в максимально физиологически возможных концентрациях не приводили к гибели шмелей. Кроме того, пероксиды не снижали летную активность шмелей. В то же время наблюдалось снижение полетной активности шмелей при действии классических фунгицидов – дифеноконазола и пенконазола (в 1,4 раза и 1,3 раза соответственно).

Мы впервые показали, что синтетические пероксиды могут эффективно подавлять рост мицелия опасного энтомопатогенного гриба пчел и шмелей – A. apis и безопасны для насекомых. Учитывая строение исследуемых компонентов, данные вещества не приведу к загрязнению окружающей среды и в будущем могут быть применены для лечения насекомых без риска загрязнения мест обитания полехных насекомых. При этом, вероятно, исследуемые вещества можно как добавлять в сахарный сироп, так и непосредственно опрыскивать насекомых растворами этих веществ, поскольку мы не нашли токсического эффекта на шмелях, которые подвергались контактному действию синтетических пероксидов и которые потребляли вещества вместе с сахарным сиропом.

УДК 664

ТЕХНОЛОГИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ РЫБНОГО ФАРША С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

О.В. Бредихина, Н.Ю. Зарубин, Н.Г. Строкова

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Россия

Современные тенденции развития индустрии функциональных пищевых продуктов (ФПП) связаны с формированием концепции «здорового образа жизни» у различных групп населения страны, в основе которого лежит сбалансированный рацион питания.

В рыбной отрасли при создании ФПП в качестве массового полуфабриката – источника белка, микро-, макронутриентов перспективным является рыбный фарш. Особенности функционально-технологических свойств фаршей из различных видов рыб определяют необходимость их модификации путем введения в состав рецептур сырья растительного и животного происхождения, биологически активных веществ, в том числе продуктов биотехнологии (гидролизатов, пищевых волокон, витаминов, полисахаридов и др.) [1].

Так, в работе [3] регулирование функционально-технологических фаршевой системы из мышечной ткани минтая достигнуто путем внесения, разработанной авторами коллагено-растительной композиции (КРК) и содержащей в своем составе гидролизат коллагена из кожи рыб и растительные компоненты (мука из семян льна и клубней топинамбура).

В результате исследования опытного образца рыбного рулета из фарша минтая в оболочке, в котором 10 % рыбного сырья (фарш минтая) заменено КРК, установлено, что по сравнению с одноименным рулетом без внесения добавок, такие показатели как влагосвязывающая (ВСС), влагоудерживающая (ВУС) и жироудерживающая (ЖУС) способности повысились на 11,53 %, 22,35 % и 15,64 %, соответственно.

Данные химического состава, энергетической ценности, а также перевариваемости белков и липидов рыбных рулетов показали увеличение массовой доли общего и соединительнотканного белка на 12,38 и 29,94 % соответственно, а также калорийности на 6,74 % при снижении содержания жира (таблица 1) [3].

Таблица 1 – Показатели качества рыбного рулета из фарша минтая с коллагено-растительной композицией

Наименование показателя химического состава		Контроль	Опыт
Массовая доля	воды, %	79,56±0,32	77,01±0,81
	белка, %	17,29±0,43	19,43±0,72
	соединительнотканных белков, % от общего белка	4,71±0,12	6,12±0,16
	в том числе коллаген, % от общего белка	4,35±0,11	5,84±0,14
	жира, %	1,31±0,11	0,82±0,04
	золы, %	1,25±0,14	1,79±0,19
	углеводов, %	0,59±0,07	0,95±0,12
	инулина, %	-	0,78±0,10
Калорийность, ккал/100 г. продукта		83,06±2,03	88,66±2,17
Переваримость, мг тирозина/100 г. белка			
Фермент		Контроль	Опыт
Пепсин		6,59±0,17	6,36±0,16
Трипсин		10,46±0,25	10,21±0,24
Общее значение		17,15±0,43	16,57±0,40

Однако, показатель перевариваемости белковых веществ в рыбных рулетах с КРК снизился на 3,5 % по отношению к контрольному образцу, что связано наличием в рецептуре КРК пищевых волокон муки из семян льна и клубней топинамбура.

Таким образом, моделирование рецептур с учетом коллагено-растительной композиции – полноценного источника белка, а также пищевых волокон, в частности инулина, позволило не только улучшить технологические свойства фаршевой системы из мышечной ткани минтая, но и повысить биологическую ценность пищевых продуктов на ее основе, тем самым придать им функциональные свойства.

Использование ферментированной кожи рыб в технологиях рыбных фаршей с целью получения рыбных полуфабрикатов и кулинарных изделий на их основе описано в [4]. Способ получения комбинированного фарша из путассу и сайки включает разделку рыбы на филе, его дальнейшее измельчение и приготовление двухкомпонентной фаршевой системы. Отделенную и измельченную кожу рыб ферментируют протеазой. Коллоид, полученный с использованием методов биотехнологии, обрабатывают 0,3 % раствором лимонной кислоты, смешивают с гидратированной мукой гороха или чечевицы. Пищевую композицию вносят в двухкомпонентную фаршевую систему в количестве 10–20 % от массы фарша [4].

Результаты исследований, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что по всем анализируемым показателям, опытный образец фарша не уступает контрольному. При внесении в опытный образец ферментированной кожи рыб и растительных компонентов ВСС фарша повысилась на 10,02 % по сравнению с контрольным образцом, что очевидно будет способствовать снижению потерь массы продукта при термообработке и улучшению его структурно-механических свойств. Показатели ПНС и пластичности также увеличились на 0,18 кПа и 0,35 $см^2/г$ соответственно.

Таблица 2 – Физико-химические, функционально-технологические и реологические показатели рыбного фарша на основе мышечных тканей путассу и сайки

Наименование показателя	Образцы рыбного фарша	
	контроль	опыт
Массовая доля воды, %	76,12±1,86	70,75±1,93
pH, ед.	5,53±0,02	5,67±0,03
ПНС, кПа	0,63±0,09	0,81±0,11
Пластичность, $см^2/г$	13,86±0,33	14,21±0,39
ВСС, % к общей влаге	72,13±0,69	79,36±0,94

Подбор компонентов фаршевой системы и биотехнологические способы их обработки, в совокупности проявляющие синергетический эффект, позволили авторам работы рекомендовать разработанную фаршевую систему из мышечных тканей путассу и сайки в качестве основы при создании функциональных пищевых рыбных полуфабрикатов и кулинарных изделий, являющихся источником белка, сбалансированного по аминокислотному составу, пищевых волокон, микро-, макроэлементов, в частности железа.

Практический интерес представляет разработка композиции пробиотического назначения (КПН) на основе бурых морских водорослей семейства Laminariaceae (Saccharina japonica), ферментированных молочнокислыми бактериями (рода Lactobacillus) с целью дальнейшего ее внесения в рыбный фарш из трески [2]. Вводимая композиция представляет собой натуральный пищевой комплекс, сочетающий в себе естественные факторы, способствующие улучшению деятельности ферментных систем физиологичных штаммов молочнокислых микроорганизмов, что обеспечивает становление экосистемы пищеварительного тракта организма человека.

В результате замены 15 % фарша КПН позволило повысить в среднем выход фарша на 6,20 %, показатели ВСС – на 5,98 %, ВУС – на 10,38 %. При этом предельное напряжение сдвига (ПНС) фарша снизилось как до, так и после термообработки, что свидетельствует о повышении влагоёмкости и, соответственно, сочности рыбного фарша из трески (таблица 3).

Таблица 3 – Функционально-технологические и реологические показатели рыбного фарша на основе трески с композицией пробиотического назначения

Наименование показателя	Образцы рыбного фарша	
	контроль	Опыт
Выход фарша после термообработки, %	89,80±0,76	92,20±0,98
ВСС, % к общей влаге*	67,92±0,54 / 44,30±0,38	73,90±0,71 / 54,68 ±0,44
ПНС, кПа*	0,65±0,08 / 11,29±0,78	0,61±0,07 / 7,66±0,54
* Примечание: числитель – до термообработки, знаменатель после термообработки		

Кроме того, целесообразность использования композиция пробиотического назначения заключается в обогащении рыбного фарша из трески пищевыми волокнами – полисахаридами (альгиновой кислотой и ее солями: альгинаты натрия, калия и кальция), клетчаткой, а также минеральными веществами, в частности йодом, которые содержатся в больших количествах в морских бурых водорослях.

Актуальной в настоящее время, с точки зрения переработки массовых видов глубоководных рыб, представляется работа [5]. Известно, что фарш, получаемый из мышечной ткани глубоководного макруруса, является обводненным (содержание воды до 50 %) и, как следствие, имеет слабою консистенцию. Однако низкое содержание жира (не более 0,3 %) и достаточное количество белка (~16 %) в мышечной ткани макруруса позволяет рекомендовать его для создания диетических и функциональных пищевых продуктов.

Авторами разработана композиция пищевого продукта из фарша макруруса с высокими показателями качества, в том числе реологическими и органолептическими, одновременно отвечающего требованиям теории сбалансированного питания с дополнительным введением в рыбный фарш ставриды и семги [5]. Кроме того, использование пищевого альбумина, изготавливаемого из плазмы крови животных, полисахаридов из морских водорослей (альгината натрия, каппа-каррагинана или их смеси) привело к улучшению функциональных свойств белков, увеличению вязкости фаршевых систем, что в целом позволило улучшить функционально-технологические свойства сырья (ВСС, гелеобразующую и жироэмульгирующую способности), а также обогащению продукта полноценным легкоусвояемым животным белком (таблица 4) и биологически активными веществами.

Таблица 4 – Химический состав и энергетическая ценность пищевого продукта из фарша макруруса

Содержание, %					Энергетическая ценность ккал/100 г.	Соотношение содержания белок: жир
воды	жира	белка	золы	углеводов		
62,7 – 71,3	18,7 – 23,8	7,0 – 10,4	1,33 – 1,71	0,77 – 2,24	118 – 229	1:1,9 – 1:2,3

Таким образом, на основании вышеизложенного можно говорить о реальной перспективе использования рыбных фаршей в технологиях ФПП, путем внесения в рецептуры комбинированных добавок на основе животного и растительного сырья, полученных с использованием методов биотехнологии. Благодаря данному направлению становится возможным предотвратить / сгладить дефицит пищевого белка, являющегося обязательной составляющей рациона человека, обогатить продукт пищевыми волокнами и нутриентами, а также повысить функционально-технологические и реологические свойства используемого сырья водных биоресурсов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Л.С. Современное производство кулинарных изделий из рыбного сырья/ Л.С. Абрамова Л.С., О.В. Бредихина, Е.К. Тихомирова // «Рыбпром». 2010. № 1. С. 57.
2. Корниенко Н.Л. Кулинарные фаршевые рыбные изделия с использованием пробиотической композиции / Н.Л. Корниенко, О.В. Бредихина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2012. Том 8. № 1. С. 32–35.
3. Зарубин Н.Ю. Исследование влияния коллагено-растительной композиции на качественные показатели рыбных рулетов Зарубин Н.Ю., Фролова Ю.В., Бредихина О.В. Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. 2018. № 2 (49). С. 72–78.
4. Патент 2595516 Российская Федерация, МПК A23 L 17/00. Способ получения комбинированного фарша из путассу и сайки. / Артемов Р.В., Бредихина О.В., Зарубин Н.Ю. – № 2015117906/13; подача 13.05.2015; опубл. 27.08.2016. Бюл. – 4 с.
5. Патент 2557145 Российская Федерация, МПК A23 L 1/325. Композиция пищевого продукта из макруруса / Подкорытова А.В.; Игнатова Т.А.; Родина Т.В.; Строкова Н.Г.; Семикова Н.В.; – № 2013152083/13; подача 25.11.2013; опубл. 20.07.2015. Бюл. № 20. – 4 с.

УДК 637.127.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ ПРОДУЦЕНТА КОРМОВОГО БЕЛКА

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

Воронежский государственный университет инженерных технологий Россия,
** Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Россия*

Кормовой белок составляет важную часть рациона кормления в промышленном животноводстве. Его основной целью является восполнение дефицита растительных кормов по незаменимым аминокислотам. Исключительная скорость размножения и богатый химический состав дрожжевых клеток обуславливают широкое использование их биомассы не только как ценного кормового продукта, широко используемого в животноводстве и птицеводстве, но и как исходное сырье для получения пищевых концентратов. Производство биомассы дрожжей на дешёвом сырье рассматривают как одно из средств устранения растущего белкового дефицита в питании сельскохозяйственных животных и птицы.

В современных биотехнологических процессах, основанных на использовании микроорганизмов, продуцентами белка служат дрожжи, микроскопические грибы, бактерии и водоросли. С технологической точки зрения одним из наиболее перспективных продуцентов кормового белка являются дрожжи Saccaromyces cerevisiae. Биологическая ценность дрожжевого белка определяется наличием значительного количества незаменимых аминокислот. По содержанию витаминов дрожжи рода Saccaromyces превосходят все белковые корма.

В качестве питательной среды для культивирования дрожжей Saccaromyces cerevisiae ЛВ-7 применяли послеспиртовую зерновую барду.

Анализ химического состава зерновой барды позволяет сделать вывод о целесообразности ее применения в микробиологической промышленности с целью удешевления питательной среды для культивирования Saccaromyces cerevisiae – продуцента кормового белка, т. к. фильтрат барды содержит все необходимые вещества для роста и развития микроорганизмов. Послеспиртовая барда содержит в 2–2,5 раза больше сырого и перевариваемого протеина, необходимых для организма микроэлементов, биологически активных веществ, характеризуется богатым и разнообразным аминокислотным составом.

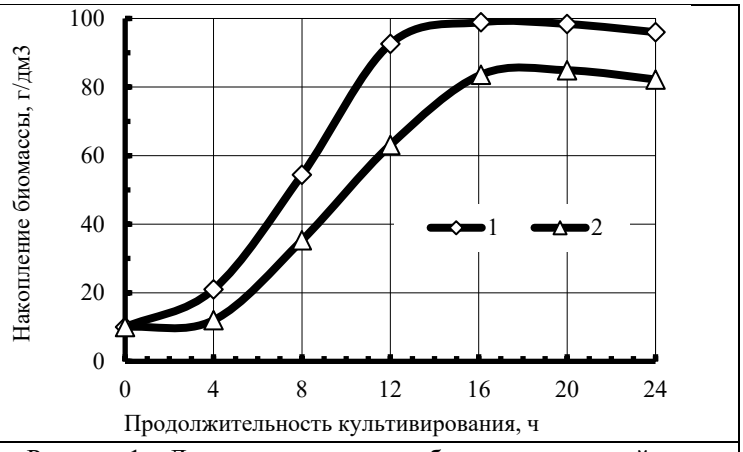


Рисунок 1 – Динамика накопление биомассы дрожжей;
1 – с добавлением тиамина; 2 – контроль (без добавления тиамина)

В качестве питательных солей использовали диаммоний фосфат (1,4 г/дм^3 сусла), сульфат аммония (3,7 г/дм^3 сусла) Питательную среду подкисляли серной кислотой до pH 5,0 и засевали дрожжами, выращенными на солодовом сусле в количестве 10 % от объема питательной среды. В качестве стимулятора роста дрожжей использовали тиамин (7 мг/дм^3 барды).

Исследования показали, что внесение в питательную среду на основе послеспиртовой зерновой барды тиамина в количестве 7 мг/дм^3 питательной среды увеличивает накопление биомассы дрожжей в 1, 3 раза.

УДК 663.531

ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЦЕСС БРОЖЕНИЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЭТАНОЛА ИЗ СМЕСИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

А.Н. Яковлев, С.Ф. Яковлева, Т.С. Ковалева, Т.Н. Тертычная *

Воронежский государственный университет инженерных технологий Россия,
** Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Россия*

В настоящее время для получения этилового спирта в качестве сырья используются смеси различных зерновых культур, включая сорго. Эта культура вышла на четвертое место по мировым валовым сборам. По устойчивости урожаев оно занимает одно из первых мест среди всех полевых культур. Кроме того, сорго благополучно переносит высокие колебания температуры почвы и воздуха. В связи с этим на территории России стало широко культивироваться зерновое сорго, стоимость которого значительно ниже, чем стоимость традиционного зернового сырья.

Использование дополнительных ферментных препаратов в технологии этанола значительно повышает степень гидролиза некрахмалистых полисахаридов растительного сырья до сбраживаемых дрожжами углеводов, сокращает сроки брожения вследствие высокой реакционной способности ферментов, значительно улучшает показатели готовой бражки и конечного продукта – этилового спирта.

В качестве сырья для проведения исследований использовали зерновую смесь, включающую, ячмень (70 %) крахмалистостью 52 %, влажностью 14,0 %, и сорго (30 %) крахмалистостью 58 %, влажностью 15 %. Использовали помол зерновой смеси со степенью измельчения 92–95 %. При водно-тепловой и ферментативной обработке замеса в качестве источника термолабильной α-амилазы использовали ферментный препарат Альфаферм 3500 Л, источника протеаз – протеолитический ферментный препарат GC-106. Для расщепления некрахмалистых полисахаридов использовали ферментный препарат Виско Стар 150Л, содержащий комплекс цитолитических ферментов.

Осахаривание разваренной массы проводили ферментным препаратом глюкоамилазы Биозим 800 Л. В качестве контроля использовали разваренную массу, полученную с использованием только ферментного препарата Альфаферм 3500 Л.

Полученное сусло сбраживали дрожжами Saccharomyces cerevisiae XII расы в течение трех суток при температуре 28…30 ºС. Об интенсивности брожения судили по количеству углекислого газа, выделившегося из сбраживаемого сусла. Бродильные пробы подвергались взвешиванию через каждые три часа, и было найдено отношение убыли массы к промежутку времени, в течение которого происходила эта убыль.

По окончании срока брожения в полученной бражке определяли объемную долю спирта и рассчитывали его выход, а также определяли содержание растворимых несброженных углеводов и нерастворенного крахмала. Полученные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1 Показатели зрелой бражки

Показатели	Контроль	Опыт
Объемная доля спирта, % об.	7,8	8,5
Содержание растворимых несброженных углеводов, г/100 см^3	0,43	0,24
Содержание нерастворенного крахмала, %	0,1	0,03
Нарастание титруемой кислотности, °	0,19	0,18
Выход спирта, дал/т условного крахмала	64,9	67,8
Продолжительность брожения, ч	68,0	52,0

Общая продолжительность брожения в контрольной пробе составила 68 ч, в опытной – 52 ч. Брожение в опытной пробе протекает более интенсивно, чем в контрольной пробе. Это объясняется тем, что при использовании комплекса ферментов, содержащего кроме амилаз протеолитический фермент, гидролизующий белковые комплексы зерна до пептидов и аминокислот, сусло обогащается дополнительным азотистым питанием. Дрожжевые клетки, выращенные на сусле, обогащенном аминным азотом, обладают большей физиологической и бродильной активностью, что подтверждают исследования.

В опытном образце степень гидролиза крахмала выше, чем в контрольном, тем самым сокращается продолжительность стадии дображивания, а в целом и весь процесс брожения.

УДК 579.64

ВЛИЯНИЕ ШТАММОВ DELFTIA SPP. НА РАЗВИТИЕ РОСТКОВ САЛАТА, ВЫРАЩЕННЫХ В ПРИСУТСТВИИ МЕТСУЛЬФУРОН-МЕТИЛА

Н.В. Агафонова, Н.В. Доронина

ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

Производные сульфонилмочевины – широко известные гербициды нового поколения, обладающие высокой эффективностью при невысоких дозировках. Метсульфурон-метил (МСМ) является органическим соединением из ряда сульфонилмочевин. В нейтральных или щелочных условиях этот гербицид медленно разлагается и сохраняется в почве до 2–3 лет, что приводит к потерям урожая (до 30 %) при последующем севообороте. Поэтому актуален поиск микроорганизмов, обеспечивающих экологически-безопасный путь снижения загрязнения почв и повышение урожайности сельскохозяйственных культур растений. Известно, что бактерии рода Delftia стимулируют рост растений, обладают антагонистической активностью, деградируют различные токсичные соединения (фенол, анилин, терефталаты и др.).

Цель работы – выявление способности к росту на МСМ представителей рода Delftia: штаммы Lp-1, 2 и 7, выделенные нами ранее из ризосферной почвы, а также исследование влияния инокуляции семян салата (Lactuca sativa L.) данными штаммами на рост и развитие ростков, выращенных в присутствии гербицида МСМ в условиях in vitro.

Бактерии культивировали на минимальной минеральной среде с различными концентрациями МСМ (0.62, 1.25, 2.5 и 5.0 мМ) в качестве единственного источника углерода. Выявлено, что только штамм 2 способен расти при данных концентрациях МСМ и использовать его в качестве источника углерода и энергии (рисунок).

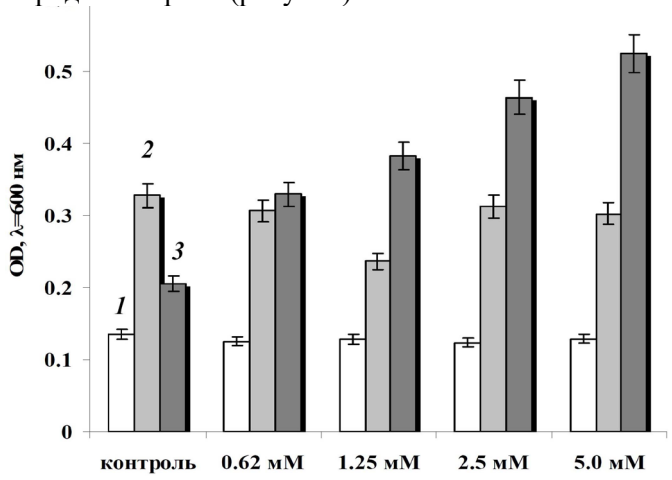


Рисунок. Оптическая плотность (OD600) штаммов Delftia spp. Lp-1 (1), 7 (2) и 2 (3) после 5 суток роста на различных концентрациях МСМ в ростовой среде

Стерильные семена выращивали in vitro на 0.7 % водном агаре с 0.62, 1.25, 2.5 и 5.0 мМ МСМ, при 23–25 °С в течение 7 сут. Несмотря на отсутствие роста бактерий Delftia spp. Lp-1 и 7 на среде с МСМ, ростки салата, колонизированные этими штаммами, а также штаммом 2, имели на 5–13 % большие длину гипокотилей, корней и сухой вес из расчета на 1 росток по сравнению с контрольными (неинокулированными) в присутствии 0.62–2.5 мМ гербицида. При этом концентрация 5.0 мМ МСМ в среде оказывала сильное ингибирующее действие на развитие неколонизированных и колонизированных ростков салата, вероятно, за счет высокой концентрации гербицида: отмечено замедление развития листьев, пожелтение корней, уменьшение размеров листовых пластинок.

Таким образом, обнаружено, что инокуляция семян салата исследуемыми штаммами Delftia spp. улучшала рост гипокотилей и корней, повышала вес ростков салата, выращенных в присутствии гербицида, несмотря на то, что способность к использованию МСМ в качестве источника углерода и энергии выявлена только у штамма Delftia sp. 2. Следовательно, колонизация семян исследуемыми штаммами перспективна для снятия ингибирующего действия метсульфурон-метила и повышения урожайности сельскохозяйственных культур растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18–04–01148.

УДК 66.098:57.037

БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКОТОКСИНОВ

Р.Ф. Ахундов, Т.Б. Ершова, И.В. Лягин, Е.Н. Ефременко

МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

Присутствие микотоксинов в различном сельскохозяйственном сырье, используемом для выработки разнообразных пищевых и технических продуктов, ставит актуальные задачи, связанные с их экспрессным контролем, основанном на применении максимально простых методов анализа [1]. Особенно актуальным становится применение таких методов при поиске ферментов, способных катализировать процессы детоксификации различных микотоксинов [2–3], и последующем скрининге их активности в варьируемых условиях проводимых биокаталитических реакций [4].

Известно, что ацетилхолинэстераза (AChE) и бутирилхолинэстераза (BChE) являются хорошими маркерами для выявления различных токсичных соединений, и при этом они обеспечивают разный отклик на ингибирующее воздействие таких веществ. Поскольку известно, что различные микотоксины (в частности, зеараленон, стеригматоцистин, охратоксин А, деоксиниваленол) могут ингибировать действие холинэстераз, то интересно было определить диапазоны тех концентраций, которые обеспечивали бы максимальную степень ингибирования AChE и BChE, чтобы в дальнейшем оценивать, например, эти концентрации токсинов в разных объектах исследования до и после их ферментативной детоксификации.

В этой работе были использованы AChE и BChE, соответствующие им субстраты и ряд микотоксинов, наиболее часто определяемых в различном сельхозяйственном сырье и продукции (зеараленон, стеригматоцистин, дезоксиниваленол и охратоксин А), в качестве ингибиторов холинэстераз. Было показано, что тип ингибирования холинэстераз микотоксинами – конкурентный. Были определены диапазоны детектирования разных микотоксинов с использованием ингибирования двух разных холинэстераз. Очевидно, за счет того, что ацилсвязывающий карман у этих холинэстераз немного разный по размеру (у AchE меньший по объёму, чем у BchE за счет снижения числа остатков фенилаланина, формирующих этот карман [5]), была выявлена разная степень ингибирования этих холинэстераз одними и теми же микотоксинами. Было установлено, что для анализа зеараленона целесообразнее использовать BChE, а для анализа стеригматоцистина, деоксиниваленола и охратоксина А – предпочтительнее AChE. Проведенное компьютерное моделирование связывания микотоксинов с молекулами AChE и BChE (молекулярный докинг) с помощью метода AutoDock Vina 4.2 позволил определить локализацию токсинов возле активных центров холинэстераз, подтверждающую, таким образом, конкурентный тип их ингибирования микотоксинами, и оценить аффинность возникающих взаимодействий. Оказалось, что для обоих холинэстераз самым сильным ингибитором является стеригматоцистин.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 16–14–00061).

ЛИТЕРАТУРА

[1] Peng, W. – X.; Marchal, J.L.M.; Van der Poel, A.F.B. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. // Anim. Feed Sci. Technol., 2018, v. 237, p. 129–153.

[2] Ahundov R., Lyagin I., Senko O., Maslova O., Makhlis T., Efremenko E. Biocatalytic transformation of various mycotoxins: modern problems and existing potential. // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2019, v. 525, p. 012090.

[3] Lyagin I.V., Efremenko E.N. Enzymes for detoxification of various mycotoxins: origins and mechanisms of catalytic action. // Molecules, 2019, v. 24(13), p. 2362.

[4] Efremenko E., Ahundov R., Aslanli A., Lyagin I., Senko O., Maslova O., Stepanov N. Development of functional materials with specific activities for degradation of toxins IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2019, v. 525, p. 012016.

[5] Pezzementi L., Nachon F., Chatonnet A. Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: an atypical butyrylcholinesterase from the medaka Oryzias latipes. // PLoS ONE, 2011, v. 6(2), e17396.

УДК 632.952

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОЛОНГИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ФУНГИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТА) В БОРЬБЕ С КОРНЕВЫМИ ГНИЛЯМИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Н.В. Стрельцова

Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия

Корневые гнили зерновых культур наносят значительный ущерб растениеводству, приводя к потерям урожая и ухудшая качество зерна [1]. Для защиты растений широко применяют фунгициды, но чрезмерное использование токсичных веществ приводит к снижению качества и плодородия почвы. В первую очередь это связано с отрицательным воздействием на почвенные микроорганизмы, которые являются неотъемлемой её частью и активно участвуют в почвообразовательных процессах [2, 3, 4]. Для решения данной проблемы могут быть использованы системы с контролируемым высвобождением пестицидов. Их применение позволит снизить отрицательное воздействие на окружающую среду, а также повысить эффективность пестицидов, так как депонирование препаратов в биоразрушаемую основу обеспечивает пролонгированный эффект [5]. В качестве основы для депонирования активного вещества в таких системах используются различные природные полимеры. Одним из таких полимеров является поли (3-гидроксибутират) (ПГБ) – представитель класса полигидроксиалканоатов, синтезируемых микроорганизмами и способных разрушаться под действием их микробных ферментов [6, 7]. ПГБ использовали в данной работе в качестве основы для депонирования фунгицидов.

Цель работы – оценка эффективности пролонгированных фунгицидных препаратов для защиты пшеницы и ячменя от возбудителей корневых гнилей и исследование влияния препаратов на почвенные микроорганизмы.

Два фунгицида – эпоксиконазол и тебуконазол были депонированы в смесовую основу, состоящую из ПГБ и березовых опилок в соотношении: ПГБ 50 %, опилки 30 %, фунгицид 20 %, и формировали гранулы.

В первую очередь была оценена возможность использования пролонгированных фунгицидных препаратов in vitro. На чашку Петри с питательной средой (Сабуро-агар) с одной стороны помещали экспериментальный образец гранулы фунгицида, а с другой – засевали гриб Fusarium verticillioides. В качестве положительного контроля использовали эквивалентное количество порошкообразного фунгицида. В отрицательном контроле на чашку засевали гриб F. verticillioides без фунгицидов. Чашки инкубировали при 25 °С в течение 10–14 суток, далее измеряли площадь колоний гриба.

Эксперимент in vitro показал, что системы пролонгированного действия способны подавлять рост фитопатогенного гриба F. verticillioides (Рисунок 1). Размер колоний при использовании экспериментальных образцов был значительно меньше по сравнению с размером колоний в отрицательном контроле. При сравнении экспериментальных форм с образцами положительного контроля значимых отличий эффективности не было выявлено.

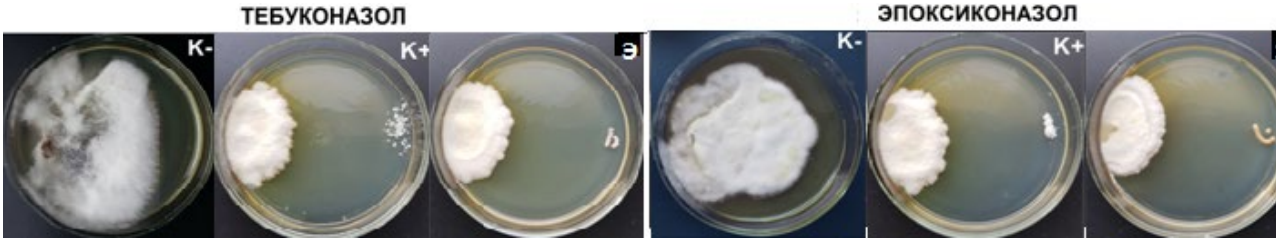


Рисунок 1 – Оценка эффективности депонированных форм фунгицидов в условиях invitro: К(–) – отрицательный контроль; К(+) – положительный контроль; Э – экспериментальные формы

Далее была проведена оценка фунгицидного действия пролонгированных препаратов в лабораторных условиях на тестовых растениях. Для этого семена пшеницы и ячменя засевали в контейнеры с почвой. Одновременно с посевом семян вносили экспериментальные формы фунгицидов.

Растения выращивали в климатической камере Фитотрон-ЛиА-2 в течение 56 суток. В качестве положительного контроля в почву вносили раствор фунгицида в концентрации, рекомендованной для полевого применения. В отрицательном контроле фунгициды не применяли. Эффективность депонированных и свободных препаратов оценивали, сравнивая зараженность корней гнилями в разные фазы развития растений: всходы (7 суток), кущение (28 суток), выход в трубку (42 суток) и колошение (56 суток). Зараженность корней определяли во влажных камерах [8].

Фитосанитарный анализ семян, проведенный перед посевом, показал наличие внутренней инфекции. Был выявлен фитопатогенный комплекс грибов из родов Fusarium, Bipolaris и Alternaria. Зараженность семян пшеницы грибами рода Alternaria составила 7 %, Fusarium – 10 %, Bipolaris – 8 %. Зараженность семян ячменя была выше: грибы рода Alternaria были выявлены в 22 % случаев, Fusarium – 15 %, Bipolaris – 10 %.

При выращивании растений без внесения фунгицидных препаратов зараженность корней нарастала. В отрицательном контроле доля растений ячменя, зараженных корневыми гнилями, увеличивалась в течение всего эксперимента и к фазе колошения достигла 45 %, зараженность корней пшеницы также выросла и составила 32 % (Рисунок 2). Обработка почвы растворами тебуконазола и эпоксиконазола уменьшила долю зараженных растенийячменя к фазе колошениядо 11–13 %, пшеницы – до 9,7–11 %. Использование депонированных форм фунгицидов было менее эффективно на стадии всходов, однако к фазе кущения экспериментальные формы фунгицидов сравнялись по эффективности со свободной формой препаратов. После фазы выхода в трубку и до конца эксперимента наблюдали снижение зараженности обоих видов растений в среднем до 6–7 % в вариантах с внесением экспериментальных фунгицидных гранул, что превышало по эффективности обработку почвы растворами препаратов. Фунгицидное действие депонированных форм было более выражено на растениях ячменя, семена которых изначально имели высокий процент зараженности фитопатогенами.

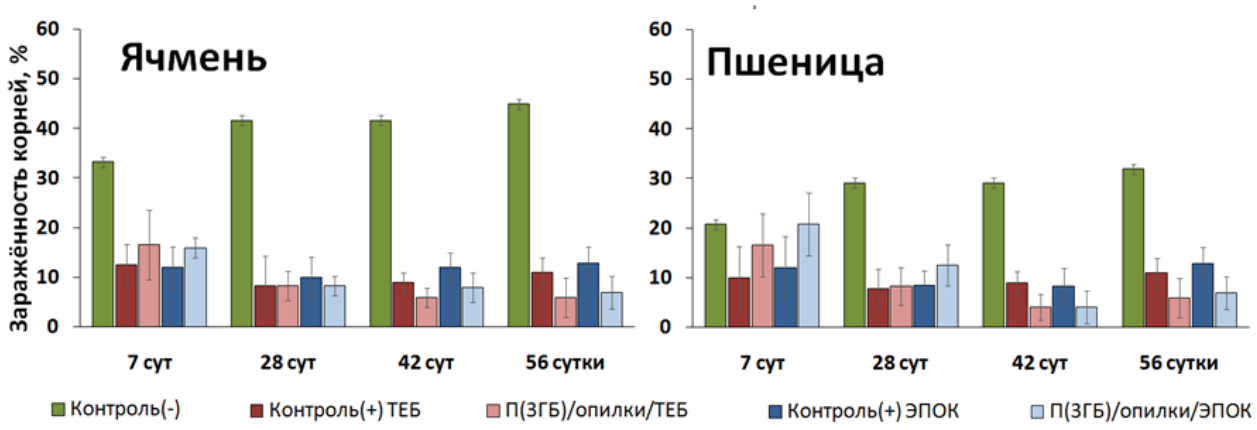


Рисунок 2 – Влияние депонированных форм фунгицидов на зараженность растений корневыми гнилями

Также в ходе эксперимента была проведена оценка влияния пролонгированных фунгицидных препаратов на почвенные микроорганизмы: микромицеты и бактерии. Оценка проводилась общепринятыми методами почвенной микробиологии. Численность бактерий определяли высевом из почвенной суспензии на мясопептонный агар, микромицетов – на картофельно-декстрозный агар.

Использование депонированных форм фунгицидов привело к снижению численности микромицетов в почве (Рисунок 3). Как и в случае с зараженностью корней фитопатогенными грибами, численность микромицетов в почве в фазе всходов была выше при использовании экспериментальных форм фунгицидов по сравнению со свободной формой. Но к фазе выхода в трубку ситуация изменилась – численность микромицетов была значительно ниже при использовании депонированных форм препаратов. Анализ таксономического состава микромицетов показал значительное снижение представителей фитопатогенного комплекса Fusarium, Bipolaris и Alternaria в почве. Это также подтверждает представленные выше результаты эффективности депонированных форм препаратов.

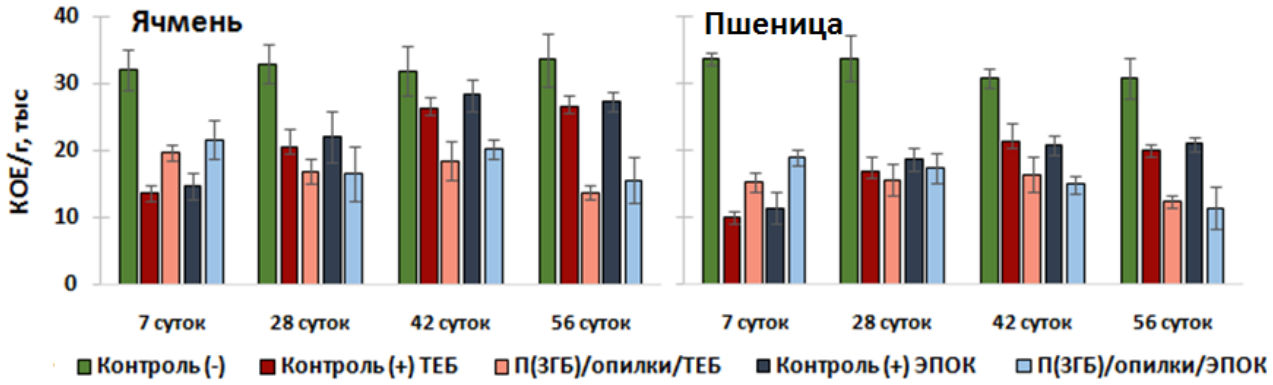


Рисунок 3 – Влияние депонированных форм фунгицидов на почвенные микромицеты

Анализ влияния депонированных форм фунгицидов на почвенные бактерии показал, что численность бактерий во всех образцах варьировалась независимо от форм внесенных препаратов и достоверно не отличалась от численности в контрольных образцах почвы без внесения фунгицидов. В начале эксперимента численность бактерий составила около 5 млн. КОЕ/г почвы. По окончании эксперимента – увеличилась в разных вариантах опыта от 15 до 50 млн. КОЕ/г почвы. Это свидетельствует об отсутствии негативного влияния пролонгированных фунгицидных препаратов на почвенные бактерии.

Таким образом, депонированные формы фунгицидов показали свою эффективность как в условиях in vitro, так и в эксперименте с растениями. Несмотря на то, что экспериментальные препараты менее эффективны на начальных этапах развития растения, в дальнейшем они не уступают по эффективности фунгицидам в свободной форме. Также было показано, что пролонгированные фунгициды не подавляют развитие почвенных бактерий.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ, проект «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» (№ 074–02–2018–328).

ЛИТЕРАТУРА

1. Дорофеева Л.Л., Шкаликов В.А. Болезни зерновых культур // М.: Печатный город. – 2007 – 96 с.
2. Wadhad Edrees. Study the Effects of Chemical Pesticides on Soil Bacterial Community on Khat //Clinical Biotechnology and Microbiology. – 2019. – Т. 3. – № 2. С. 599–604.
3. Rachel Nettles, John Watkins, Kevin Ricks, at al. Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean //Applied soil ecology. – 2016. – Т.102. – С. 61–69.
4. Malgorzata Baćmaga, Jadwiga Wyszkowska, Jan Kucharski. The effect of the Falcon 460 EC fungicide on soil microbial communities, enzyme activities and plant growth //Ecotoxicology. – 2016. – Т. 25. – №. 8. – С. 1575–1587.
5. Березненко Н.М., Лепешкина М.И. Перспективы использования пестицидных формуляций с контролируемым высвобождением действующего вещества //SWorld: сб. науч. ст. – Иваново: Научный мир, 2015. – 2 (39). Том 18. – С. 56–69.
6. Tatiana G. Volova, Svetlana V. Prudnikova, Natalia O. Zhila. Fungicidal activity of slow-release P (3HB)/TEB formulations in wheat plant communities infected by Fusarium moniliforme //Environmental Science and Pollution Research. – 2018. – Т. 25. – №. 1. – С. 552–561.
7. Волова Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов. – 2014.
8. ГОСТ 12044–93. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. Дата издания: 01.01.2004. Дата последнего изменения: 19.07.2010

УДК 640

ПОВЕДЕНИЕ ПЛАНКТОННЫХ УРЕОЛИТИЧЕСКИХ КЛЕТОК BACILLUS LICHENIFORMIS ПРИ БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ $CaCO_3$

Л.А. Иванова[1,2], Д.А. Головкина[1,2], Е.В. Журишкина[1,2], В.В. Егоров[1,2], А.А. Кульминская[1,2]

[1] Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинов, Ленинградская обл, Россия;
[2] Курчатовский геномный центр – ПИЯФ, Ленинградская обл., Россия;

Биоминерализация – феномен образования минералов живыми организмами в результате их метаболических реакций с окружающей средой. Карбонат кальция является одним из самых распространенных материалов на Земле, являясь основным компонентом известняка, мрамора, мела, травертина, доломита. Процесс индуцированного микроорганизмами осаждения $CaCO_3$ (MICP) привлекает большое внимание исследователей [1]. В частности, в течение последних 15 лет активно разрабатываются технологии по восстановлению бетонных конструкций, которые можно «ремонтировать», используя осажденный бактериями карбонат кальция. Однако на сегодняшний день механизм образования кристаллов бактериальными клетками все еще остается не до конца изученным: появление центра кристаллизации и начальный рост кристаллов карбоната кальция являются наиболее дискуссионными вопросами [2].

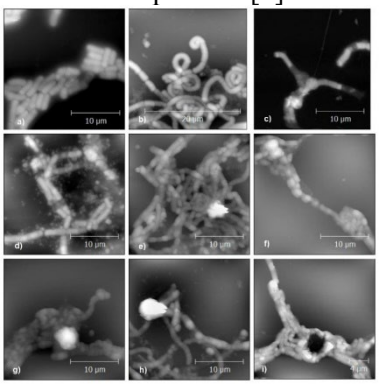


Рис. 1. Процесс кристаллообразования в течение 48 часов бактерией B. licheniformis DSMZ 8782 на среде B4 – M; Зондовый сканирующий микроскоп NT-MDTSolverBio. Время наблюдения: a) 0 ч; b) 9 ч; c) 18 ч; d) 24 ч; e) 27 ч; f) 30 ч; g) 33 ч; h) 42 ч; i) 45 ч

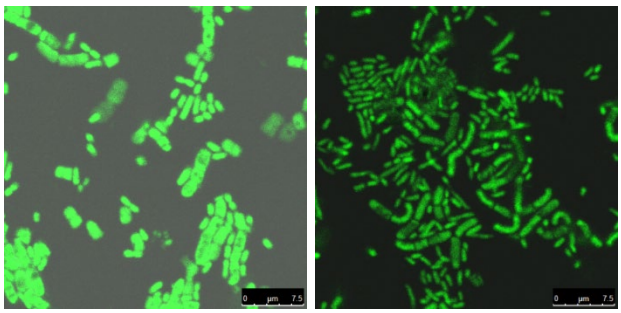


Рис. 2 Изображения полученные с помощью конфокальной микроскопии с окрашиванием ДНК-связывающим красителем B. Licheniformis, культивируемых в течение 24 часов а) в среде без мочевины и CaCl2б) в присутствии мочевиныи CaCl2

В ранее проведенном скрининге штаммов бактерий, способных к MCIP, мы обнаружили, что наиболее эффективной культурой для образования кристаллов карбоната кальция был штамм Bacillus licheniformis DSMZ 8782 (результаты готовятся к публикации).

В настоящем исследовании мы использовали несколько микроскопических (атомно-силовая, конфокальная и растровая электронная микроскопии) и биохимических методов (измерение изменения значений pH среды, количества биомассы, количества осадка $CaCO_3$, а также значений удельной уреазной активности в процессе культивирования B. licheniformis в присутствии мочевины), чтобы продемонстрировать поведение планктонных бактериальных клеток во время роста в среде, содержащей мочевину, и их влияние на инициацию кристаллизации $CaCO_3$ и эволюцию кристаллов.

С помощью конфокальной микроскопии была показана эволюция накопления внеклеточного матрикса, содержащего белковую компоненту и компоненту, содержащую ДНК с использованием специфических красителей.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение №. 075–15–2019–1663.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dhami, N.K. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritage / N.K. Dhami, M.S. Reddy, A. Mukherjee // Frontiers Microbiol. – 2014. – № 5. – P. 304.
2. Le Métayer-Levrel, G. Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and regeneration of limestones in buildings and historic patrimony / G. Le Métayer-Levrel, S. Castanier, G. Orial, J-F. Loubière, J-P. Perthuisot // Sediment Geol. – 1999. – № 126. – P. 25–34.

УДК 579.84

НОВЫЙ МЕТИЛОТРОФНЫЙ ФИТОСИМБИОНТ ANCYLOBACTER SP. VT

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

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

Аэробные метилотрофные бактерии (метилобактерии) используют в качестве источников углерода и энергии различные C_1-соединения (метанол, метиламин, формальдегид, формиат и др.) и выполняют функцию природного биофильтра на пути эмиссии этих соединений в атмосферу. Одноуглеродные соединения образуются в различных биотопах, присутствуют в стоках многих производств, а также являются естественными продуктами метаболизма растений, поэтому неудивительно, что метилобактерии широко распространены и постоянно обнаруживаются в ризосфере и филлосфере (Доронина с соавт., 2015). Установлено, что многие метилотрофы являются фитосимбионтамии и улучшают рост растений с помощью самых разнообразных механизмов. Бактерии рода Ancylobacter встречаются в различных экологических нишах (водная среда, донные отложения, различные виды растений) и играют важную роль в круговороте углерода. Некоторые представители рода Ancylobacter являются фитосимбионтами (Агафонова с соавт., 2014, 2017), поэтому их изучение и выделение из различных растений географически удаленных ареалов является весьма актуальным.

Цель работы – характеристика нового метилотрофного фитосимбиота и исследование его влияния на рост ростков Lactuca sativa L., культивируемых в условиях in vitro.

Объектом исследования служил новый штамм VT, выделенный нами из ризосферы лапчатки Potentilla sp. L. (берег Голубого озера, Казань, Татарстан) на среде с метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии. Для идентификации нового изолята использовали методы полифазной таксономии. Штамм VT представлен грамотрицательными неспорообразующими палочковидными неподвижными клетками. Является факультативным метилотрофом, поскольку растет на широком спектре полиуглеродных соединений, а также на минеральной среде с 0.5 % метанола при температуре 10–30ºС, pH 6.5–7.5 и до 1 % NaCl в среде. На основании секвенирования генома штамм VT отнесен к роду Ancylobacter и является представителем нового вида.

На среде с нитратом калия и L-триптофаном, в качестве предшественника синтеза индолов, обнаружена способность нового изолята синтезировать фитогормоны ауксины до 9 мкг/мл. Кроме того, при культивировании нового метилотрофа на среде с метанолом и $Ca_3(PO_4)_2$ в качестве единственного источника фосфора в среду выделяется до 150 мкг/л свободного фосфора, что подтверждает способность штамма к увеличению биодоступности фосфора для себя и растений. Также обнаружено, что штамм Ancylobacter sp. VT обладает способностью к синтезу сидерофоров, которые специфически связывают ионы железа и ограничивают рост фитопатогенов. В опытах по инокуляции клетками Ancylobacter sp. VT стерильных семян салата (Lactuca sativa L.) выявлено, что к 10 суткам высота ростков и длина корней колонизированных (опытных) растений превышала показатели контрольных (стерильных) на 6–7 % и 13 %, соответственно.

В настоящее время, секвенирование полных геномов микроорганизмов также позволяет раскрыть метаболические основы ассоциации метилотрофов с растениями. Аннотирование генома штамма Ancylobacter sp. VT показало наличие генных модулей путей C_1-метаболизма, синтеза фитогормонов, ферментов фосфорного метаболизма и сидерофоров.

Таким образом, новый факультативный метилотроф из ризосферы лапчатки является фитосимбионтом, использует выделяемый растениями метанол, синтезирует фитогормоны, сидерофоры, обладает фосфатсолюбилизирующей активностью и стимулирует рост растений. Следовательно, новый изолят Ancylobacter sp. VT перспективен для применения в сельскохозяйственной практике, обеспечивая более высокую урожайность, сниженные производственные затраты и негативное воздействие на окружающую среду из-за использования химических удобрений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18–04–01148.

УДК 638.145.3

МАРКЕР-ОПОСРЕДОВАННАЯ СЕЛЕКЦИЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ APIS MELLIFERA L.

М.Д. Каскинова, Л.Р. Гайфуллина, Л.Р. Салтыкова, А.Г. Поскряков, А.Г. Николенко

Уфимский федеральный исследовательский центр РАН,.Уфа, Россия

Медоносная пчела Apis mellifera L. является важным звеном в экологической цепи. Также она имеет особое значение в хозяйственно-экономической деятельности человека как опылитель сельскохозяйственных культур и производитель пчеловодческой продукции. Медоносная пчела представляет собой довольно сложный объект для селекции – необходимо учитывать такие особенности биологии как эусоциальность, гаплодиплоидность и полиандрия. Медоносные пчелы, как большинство перепончатокрылых насекомых, являются гаплодиплоидными организмами – самки развиваются из оплодотворенных яиц и, следовательно, диплоидны, самцы же появляются из неоплодотворенных яиц и имеют гаплоидный набор хромосом, полученный от матери (партеногенез). Исследования последних лет с применением методов генетики показали, что пчелы имеют более сложный механизм определения пола (Beye, Hasselmann, 2003; Beye et al., 2013; Lechner et al., 2013; Zareba et al., 2017). Гетерозиготное состояние одного гена, названного complementary sex determiner (csd), приводит у медоносной пчелы к развитию особей женского пола, тогда как гомозиготность вызывает формирование диплоидных трутней, которые уничтожаются рабочими пчелами. Нормальные трутни развиваются при гемизиготном состоянии гена csd. При низком аллельном разнообразии гена csd в семье появляется большая доля диплоидных трутней (явление генетического пестрого расплода), что приводит к снижению силы семьи. Следовательно, для успешной селекции пчел необходимо разработать комплекс рекомендаций по отбору желаемого признака (или признаков) с сохранением генетического разнообразия гена csd. Цель данной работы – разработка метода селекции пчел на основе данных о чистопородности и аллельного разнообразия гена csd.

Для анализа аллельного разнообразия гена csd были использованы две выборки пчел с разным уровнем контроля размножения. На первой племенной пасеке из Иглинского района Республики Башкортостан (РБ) (15 семей), специализирующейся на разведении A. m. mellifera, используются инструментальное осеменение и отцовские семьи разного происхождения. Во второй пасеке из Чишминского района РБ содержатся семьи предположительно A. m. carpatica и A. m. carnica (44 семьи). Контроль размножения отсутствует, но ежегодно ввозятся новые матки для поддержания генетического разнообразия семей. Отобранные из каждой семьи живые рабочие пчелы трутни фиксировали в 96 % этаноле и хранили до выделения ДНК при – 100 ℃. ДНК выделяли из мышц торакса с использованием набора ДНК-ЭКСТРАН-2. Для анализа были выбраны экзоны с 6 по 8 гена csd. ПЦР-анализ проводили в термоциклере BIO-RAD T100 в объеме 15 мкл с использованием праймеров F-GGGAGAGAAGTTGCAGTAGAG и R-TTGATGCGTAGGTCCAAATCC. Режим ПЦР: 5 мин 94 ℃, затем 30 циклов с денатурацией 30 сек при 94^0 С, отжигом 30 сек при 54,5 ℃, элонгацией 60 сек при 72 ℃ и конечной элонгацией 7 мин при 72 ℃. Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) амплификатов гена csd проводили в фирме Синтол (Москва, Applied Biosystems) с прямым и обратным праймерами, использованными при проведении ПЦР. Подвидовую принадлежность определяли при помощи ПЦР-анализа мтДНК (локус COI-COII) и SSR локусов Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28. В качестве сравнительных групп были использованы выборки A.m.mellifera из Бурзянского района РБ (N = 123) и Пермского Края (N=136), A. m. carnica из Республики Адыгея (N=15), A. m. caucasica из Краснодарского края (N=42) и A. m. carpatica из Закарпатской области Украины (N=15).

Анализ подвидовой принадлежности показал, что семьи с пасеки Иглинского района имеют умеренную гибридизацию – доля интрогрессии генофонда линии С составила в среднем 23 %. Для чишминской пасеки средняя доля интрогрессии генофонда линии М составила 3 %.

Анализ аллельного разнообразия гена csd в 15 семьях иглинской пасеки показал наличие 20 уникальных аллелей. Идентичные аллели обнаружены у семей № 13 и 52; № 43, 61 и 136; № 43 и 63; № 43 и 45. Наличие идентичных аллелей у этих семей объясняется родством этих семей – трутни из семьи № 13 использовались для осеменения маток из семьи № 52, а матки из семей № 43 и 45 являются сестрами. Для избежания появления диплоидных трутней было рекомендовано не использовать совместно сперму трутней из семей с одинаковыми аллелями гена csd при искусственном осеменении маток.

В 44 семьях с чишминской пасеки было выявлено 41 аллель, из них 22 редких (т. е. аллели, встречающиеся один раз). Семьи № 2 и 6 имеют одинаковые аллели. Одинаковые пары аллелей обнаружены также в семьях № 4 и 17, № 12 и 27. Когда семьи на пасеке в течение продолжительного времени разводится «в себе», то это приводит к накоплению семей с одинаковым генотипом, что мы и видим на примере гена csd. Генетическая структура данной выборки однородная. На данной племенной пасеке, в отличие от пасеки с A.m.mellifera, не используется искусственное осеменение маток. На пасеке, использующей инструментальное осеменение и отцовские семьи разного происхождения, аллельное разнообразие относительно числа проанализированных семей выше, чем на пасеке, где контроль размножения отсутствует.

Таким образом, на основе анализа подвидовой принадлежности и аллельного разнообразия гена csd разработаны практические рекомендации по сохранению чистопородности и оптимизации числа семей для каждой отдельной популяции. Показано, что комплексный анализ семей на чистопородность и аллельное разнообразие гена csd необходим для племенных пасек, специализирующихся на разведении разных пород и линий пчел и использующих искусственное осеменение маток. Такой подход позволяет комбинировать родительские пары без потери чистопородности семей.

Данная работа позволила создать усовершенствованную схему селекции пчел Apis mellifera. Схема включает три основных этапа (рисунок).

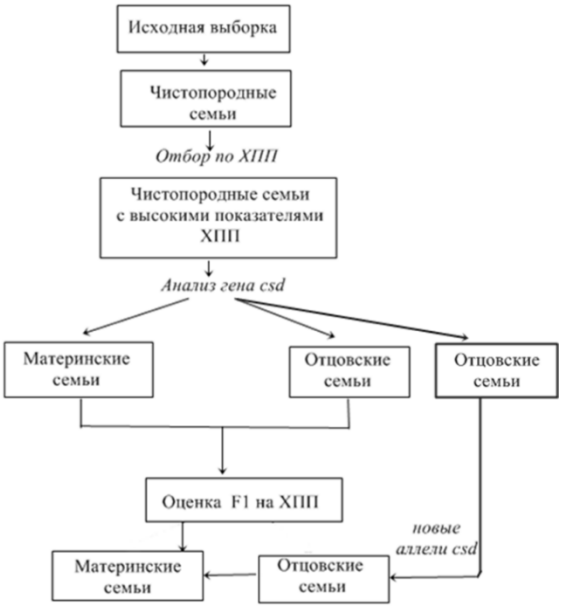


Рисунок Схема селекции медоносной пчелы с применением информации о чистопородности и аллельному разнообразию гена csd.

Первым этапом является отбор чистопородных семей подвида A.m. mellifera из исходной популяции пчел с использованием полиморфизма межгенного локуса COI-COII мтДНК и 9 SSR локусов яДНК (Ap243, 4A110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28). Второй этап – анализ аллельного разнообразия гена csd. На основе данных по аллельному составу гена csd формируются отцовские и материнские семьи (100–200 материнских семей и несколько отцовских семей по 15–20 семей в каждой). Материнские и отцовские семьи должны иметь разные аллели csd. Если нет возможности применять инструментальное осеменение, то рекомендуется создать несколько отцовских семей вокруг пасеки с материнскими семьями, что позволит создать требуемый трутневый фон. На третьем этапе производится отбор семей по интересующим признакам (к ним относятся продуктивность, устойчивость к болезням, зимостойкость и т. д.). Отобранные семьи рекомендуется разместить на пасеке, отдаленной от других семей из исходной популяции для избежания нежелательного скрещивания. Рекомендуется создать несколько таких пасек для дальнейшего их скрещивания. Отбор по селектируемому признаку (признакам) необходимо проводить в каждом поколении. Данная схема селекции позволит получить семьи пчел с высокими показателями продуктивности.

Работа выполнена в рамках госзадания № 01201350736.

ЛИТЕРАТУРА

Beye M., Hasselmann M. The gene csd is the primary signal for sexual development in the Honeybee and encodes an SR-type protein. Cell. 2003. V. 114. P. 419–429.

Beye M., Hasselmann M.,, et al. Gradual molecular evolution of a sex determination switch through incomplete penetrance of femaleness. Current Biology. 2013. V.23. P. 2559–2564. doi: 10.1016/j.cub.2013.10.070

Lechner S., Ferretti L., et al. Nucleotide variability at its limit? Insights into the number and evolutionary dynamics of the sex-determining specificities of the honey bee Apis mellifera. MBE Advance Access published. 2013. № 29. P. 1–37.

Zareba J., Blazej P., et al. Uneven distribution of complementary sex determiner (csd) alleles in Apis mellifera population. Scientific Reports. 2017. V. 7. doi:10.1038/s41598–017–02629–9

УДК 637.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛОДОВО-ЯГОДНОГО СЫРЬЯ АЛТАЙСКОГО КРАЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ СЫРОВ

О.Н. Мусина, Н.И. Бондаренко, Д.А. Усатюк

Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия, Барнаул, Россия

Плодово-ягодное сырье Алтайского края перспективно для комбинирования с молочным сырьем. Использование местного растительного сырья позволит обогатить мягкие сыры биологически активными веществами, такими как водорастворимые и жирорастворимые витамины, полифенолы, органические кислоты, пищевые волокна, в т. ч. пектиновые вещества, повысить рентабельность производства, избежать затрат на транспортные расходы, поскольку как молоко, так и плодово-ягодное сырье успешно производятся в больших объемах на территории края.

Молоко в опытах использовано пастеризованное при температуре 75° С с выдержкой 25 с, нормализованное, с массовой долей жира 3,0 %.

Облепиха богата биологически активными веществами, в частности – витаминами (С, А, Е и др.). Жимолость также богата витаминами (С, Н, B_1, B_2 и др.), катехинами, антоцианами, лейкоантоцианами [1, 2]. Для исследований была использована облепиха сорта «Алтайская» и жимолость сорта «Берель» в виде натурального сока, протертой массы и концентрата. Натуральный сок соответствовал требованиям ГОСТ 32101–2013 «Консервы. Продукция соковая. Соки фруктовые прямого отжима. Общие технические условия», протертая масса – ГОСТ Р 54681–2011 «Консервы. Фрукты протертые или дробленые. Общие технические условия», концентрат – ГОСТ 32102–2013 «Консервы. Продукция соковая. Соки фруктовые концентрированные. Общие технические условия». В таблице 1 представлены физико-химические характеристики образцов сока, протертой массы и концентрата жимолости.

В работе использованы стандартные физико-химические методы исследований: массовую доля титруемых кислот плодово-ягодного сырья определяли по ГОСТ Р 51434, титруемую кислотность молока и молочно-ягодных смесей определяли в соответствии с ГОСТ 3624, активную кислотность – по ГОСТ 32892. Достоверность полученных результатов обеспечивается выполнением исследований на серийном оборудовании с известными метрологическими характеристиками, применением стандартных методик, отсутствием противоречия полученных результатов известным теориям и опубликованным научным данным других исследователей. Для расчета и оптимизации рецептур использованы методы компьютерного моделирования [3].

Таблица 1. Физико-химические характеристики плодово-ягодного сырья.

Плодово-ягодное сырье Алтайского края	Удельная масса, г/см^3	Массовая доля титруемых кислот, %	Растворимые сухие вещества, %	Сумма полифенолов, мг/дм^3	Сахара, г/100г
Облепиха сорта «Алтайская», селекция «НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко», Алтайский край					
Натуральный сок	1,035	1,20	10,5 %	6438	7,9
Протертая масса	–	1,30	10,0	2328	8,1
Концентрат	–	5,80	61,0	17630	41,9
Жимолость сорта «Берель», селекция «НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко», Алтайский край					
Натуральный сок	1,055	2,74	13,0	7894	9,9
Протертая масса	–	3,20	14,0	9162	9,2
Концентрат	–	7,30	37,5	24315	31,3

Мягкий сыр вырабатывали термокислотным способом. В подогретое молоко вносили смесь 20 %-го раствора глюконо-дельта-лактона (ГДЛ) и плодово-ягодного сырья (суммарно 4,25 % от массы молока). Количество растительного сырья (сок, концентрат, протертая масса) в смеси с ГДЛ рассчитывали в зависимости от pH (около 2,5–3,5 единиц).

В первой серии опытов термокислотное сквашивание проводили при температуре молочно-растительной смеси 93–95° С. Контрольный образец – смесь нормализованного молока с ГДЛ в количестве 4,25 % (без добавления плодово-ягодного сырья). Кислотность подсырной сыворотки и предел погрешности измерения приведены на диаграмме (рис. 1). Сгусток имел хлопьевидный характер. Установлено, что подсырная сыворотка опытных образцов имеет активную кислотность выше контроля для всех вариантов.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Использование плодово-ягодного сырья в виде концентрата или протертой массы более предпочтительно при ведении технологического процесса выработки мягких сыров: в таком случае большая часть сухих веществ растительного наполнителя переходит в готовый продукт – мягкий сыр повышенной пищевой и биологической ценности.

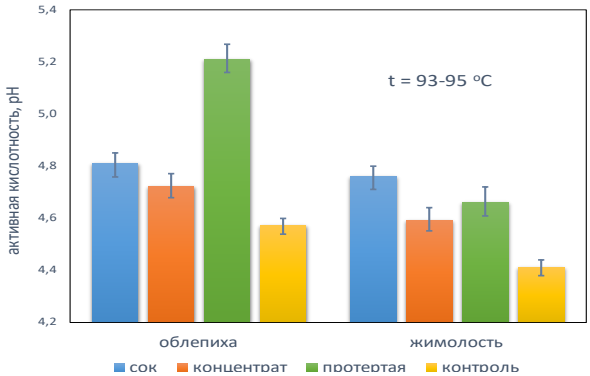


Рисунок 1. Кислотность подсырной сыворотки при температурном режиме сквашивания смеси 93–95 °С

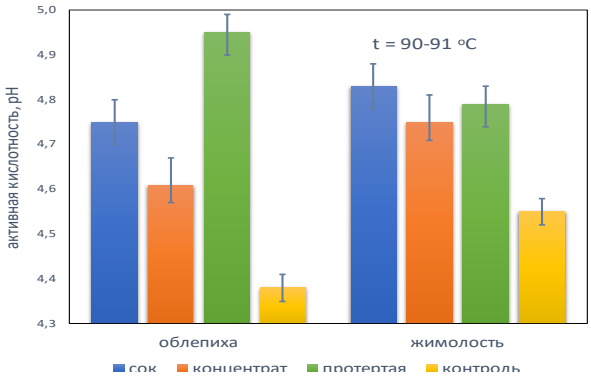


Рисунок 2. Кислотность подсырной сыворотки при температурном режиме сквашивания смеси 90–91 °С

Как для облепихи, так и для жимолости, кислотность подсырной сыворотки, ее органолептические и микробиологические характеристики позволяют продолжить исследования в направлении разработки освежающего напитка на основе сыворотки, обогащенной биологически активными веществами плодово-ягодного сырья Алтайского края.

Для улучшения консистенции молочно-растительного сгустка была проведена серия опытов при температуре молочно-растительной смеси 90–91° С. Контрольный образец такой же, как и в предыдущей серии опытов – смесь нормализованного молока с ГДЛ в количестве 4,25 % (без добавления плодово-ягодного сырья). Кислотность подсырной сыворотки и предел погрешности измерения приведены на диаграмме (рис. 2). Сгусток обладал мягкой эластичной текстурой, во вкусе более отчетливо ощущается присутствие плодово-ягодного наполнителя, при этом остались сливочные нотки, характерные для классических мягких сыров из молочного сырья.

Установлено, что использование плодово-ягодного сырья во всех случаях повышает выход конечного продукта – мягкого сыра.

На заключительном этапе экспериментов была отработана дозировка сахара-песка и поваренной соли. Мягкий сыр отличается хорошей хранимоспособностью, микробиологическими и биохимическими показателями, в том числе повышенным содержанием биологически активных веществ, особенно водорастворимых витаминов и полифенолов, а также пищевых волокон и ряда минералов.

Использование плодово-ягодного сырья для получения мягкого комбинированного сыра имеет положительный эффект как по органолептическим показателям, так и по выходу готового продукта. Большие перспективы имеет сыворотка.

Научные выводы по данному направлению исследований и образцы мягких сыров, выработанные в лаборатории научно-прикладных технологических разработок Сибирского НИИ сыроделия, прошли общественную апробацию и были представлены на многочисленных выставках и ярмарках, в том числе «День Сибирского поля» (Павловск, 19–20 июня 2019 года), Фестиваль фермерской еды «Своё» (Барнаул, 17–18 августа 2019 года), «Дни Алтайского сыра» (Барнаул, 24 августа 2019 года), III межрегиональная научно-практическая конференция «От биопродуктов к биоэкономике» (Барнаул, 7–8 ноября 2019 года), V международный форум «Пищевая индустрия» (Красноярск, 10 – 12 апреля 2019 года). Продегустированный образцы сыров получили высокую оценку как от профессионалов отрасли, так и от рядовых потребителей.

В настоящее время готовится заявка на патент и нормативно-техническая документация на технологию мягкого сыра с плодово-ягодным сырьем Алтайского края.

ЛИТЕРАТУРА

Кольтюгина О.В. Получение молочных продуктов с использованием продуктов переработки плодов облепихи // Ползуновский вестник. – 2016. – № 1. – С. 24–28.

Мусина О.Н., и др.. Состояние и тенденции развития биотехнологии комбинированных молочных продуктов: монография. Барнаул: Изд-во АлтГТУ, 2006

Musina O.N., Lisin P.A. An approach to the choice of alternatives of the optimized formulations // Foods and Raw Materials. – 2015. – Т. 3. – № 2. – С. 65–73.

УДК 66.047

СУПЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ХРИЗАНТЕМЫ CDM44 ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ ТАБАКА К ПОНИЖЕННЫМ ТЕМПЕРАТУРАМ

А.В. Нежданова, А.М. Камионская, А.В. Щенникова

Институт Биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Одним из ключевых регуляторных семейств у растений является семейство MADS-box генов (Parenicova et al., 2003). Кодируемые ими факторы транскрипции принимают участие в контроле многих аспектов развития, включая сельскохозяйственно ценные признаки, такие как сроки вегетации, вегетативная масса, строение соцветия и цветка, фертильность, морфология плода, формирование семян (Smaczniak et al., 2012; Dong et al., 2014; Theißen et al., 2016). Также, данные факторы транскрипции могут регулировать уровень биосинтеза различных вторичных метаболитов (например, каротиноидов, антоцианов, и др.) (Jaakola et al., 2010; Li et al., 2019). Более того, показано, что MADS-box белки участвуют в ответе растения на различные абиотические и биотические стрессы (Castelán-Muñoz et al., 2019).

Наиболее известны функции MADS-белков в области определения идентичности цветковых органов. Согласно общепринятой модели ABCDE, 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). Генетическая активность E, необходимая для определения идентичности сразу всех цветковых органов, представлена генами SEPALLATA (SEP) – SEP1, SEP2, SEP3 и SEP4 (или, соответственно, AGL2, AGL4, AGL9 и AGL3) (Pelaz et al., 2000, 2001). Цветок с выключенной E-активностью состоит из одних чашелистиков, а вместо пестика формируется новый цветок с тем же паттерном развития (Ferrario et al., 2003). А мутация сразу всех SEP-генов sep1 sep2 sep3 sep4 приводит к формированию цветка, состоящего из листьев (Ditta et al., 2004). MADS-белки регулируют транскрипцию генов-мишеней в составе мультимерных комплексов, что описано моделью «Квартет» (Smaczniak et al., 2012). Согласно модели, все цветок-специфичные тетрамеры MADS-белков включают SEP-белок, что свидетельствует о его решающей роли в формировании комплексов и регуляции развития цветка.

Ключевые роли SEP-генов в различных аспектах репродуктивного онтогенеза растения делает их перспективным объектом внутри- и межвидовых исследований, как для фундаментальной науки, так и для научно обоснованной биотехнологии агрокультур.

Целью настоящего исследования стало определение функции MADS-box гена E-класса – CDM44 из хризантемы (Chrysanthemum x morifolium Ramat., сорт Парламент). Анализ структуры и филогении CDM44 показал, что он является структурным гомологом генов SEP3 (Arabidopsis thaliana), CaMADS-RIN (Capsicum annuum) и RIN (Solanum lycopersicum) (рис. 1), что предполагает и функциональное сходство с ними. Был проведен in vivo анализ транскрипционной активности CDM44 и его белок-белковых взаимодействий с MADS-белками других классов в двухгибридной дрожжевой GAL4-системе. В результате было показано, что CDM44 способен активировать транскрипцию генов-мишеней, а также формировать комплексы с MADS-белками C-класса подсолнечника HAM45 и HAM59. Данные результаты подтверждают принадлежность CDM44 к SEP3-кладе.

Чтобы исследовать возможное участие CDM44 в развитии меристемы цветка и соцветий, с помощью агробактериальной трансформации были получены и проанализированы трансгенные растения табака Nicotiana tabacum с суперэкспрессией трансгена CDM44 (E) под контролем усиленного 35S CaMV промотора. Эктопическая экспрессия CDM44 не повлияла на время цветения или строение соцветия, а цветки имели нетрансгенный фенотип. Однако семенные коробочки таких растений созревали гораздо медленнее контроля и формировали значительно меньше семян (рис. 2). Данный эффект может быть объяснен замалчиванием генов клады SEP3 (и трансгена, и родных генов табака), что указывает на возможность участия CDM44 в регуляции сроков созревания плода, подобно его гомологу RIN (Li et al., 2019), а также в определении идентичности семязачатков (Smaczniak et al., 2012).

Полученные растения 35S:CDM44 были дополнительно подвергнуты стрессу, связанному с воздействием пониженных температур. В процессе инкубации при +4 °C трансгенные растения демонстрировали более высокую устойчивость к холодовому стрессу в сравнении с контрольными, нетрансгенными растениями. У последних наблюдались видимые симптомы повреждения листьев (увядание) и снижение уровня хлорофилла.

На основании полученных результатов можно предположить, что исследуемый нами ген CDM44 участвует в регуляции созревания семянки хризантемы, а также в ответе растения на холодовой стресс. Мы планируем изучить участие CDM44 в реакции растения на другие стрессы (повышенные температуры, обезвоживание, солевой стресс и др.).

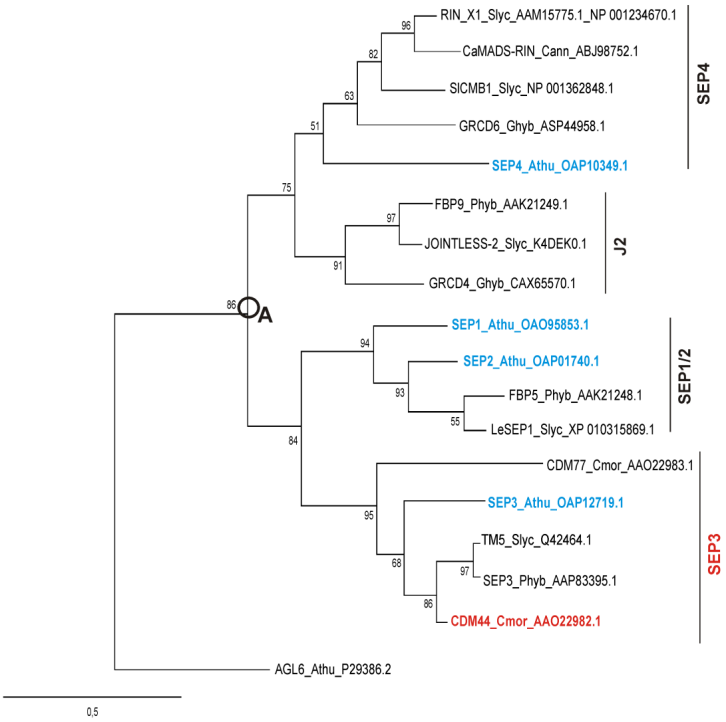


Рисунок 1. Филогенетическая классификация MADS-фактора транскрипции CDM44 в сравнении с известными гомологами SEP; AGL6 использован в качестве внешней группы. Дендрограмма построена методом максимального правдоподобия (модель JTT; G+G; программа MEGA 6.0). Существенные значения бутстрэп указаны в основании ветвей. A (Ancestor) – общий предшественник подклад SEP. Рядом с названием каждого белка приведен номер доступа в NCBI и вид растения: Slyc – Solanum lycopersicum L.; Cann – Capsicum annuum L.; Phyb – Petunia x hybrida hort. ex E. Vilm.; Cmor – Chrysanthemum x morifolium Ramat.; Ghyb – Gerbera hybrid cultivar; Athu – Arabidopsis thaliana (L.) Heynh

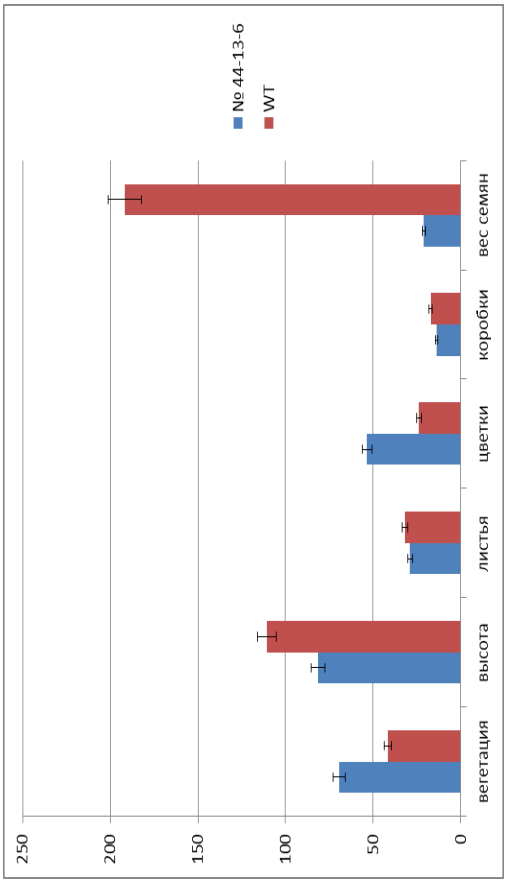


Рисунок 2. Характеристики линии трансгенных растений табака 35S:CDM44 в сравнении с контролем

Полученные данные могут быть использованы для научно обоснованной селекции сортов (включая методы геномного редактирования) с повышенной устойчивостью к стрессам и / или улучшенной морфологией плода.

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

ЛИТЕРАТУРА

Castelán-Muñoz N. et al. MADS-Box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants //Frontiers in plant science.2019.Т. 10.С. 853.
Ditta G. et al. The SEP4 gene of Arabidopsis thaliana functions in floral organ and meristem identity //Current Biology.2004.Т. 14.№. 21.С. 1935–1940.
Dong T. et al. A non-climacteric fruit gene CaMADS-RIN regulates fruit ripening and ethylene biosynthesis in climacteric fruit //PloS one.2014.Т. 9.№. 4.С. e95559.
Ferrario S. et al. The MADS box gene FBP2 is required for SEPALLATA function in petunia //The Plant Cell.2003.Т. 15.№. 4.С. 914–925.
Jaakola L. et al. A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits //Plant Physiology.2010.Т. 153.№. 4.С. 1619–1629.
Li S. et al. A Critical Evaluation of the Role of Ethylene and MADS Transcription Factors in the Network Controlling Fleshy Fruit Ripening. New Phytol.2019.Т. 221.№. 4.С. 1724–1741.
Parenicová L. et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world //The Plant Cell.2003.Т. 15.№. 7.С. 1538–1551.
Pelaz S. et al. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes //Nature.2000.Т. 405.№. 6783.С. 200–203.
Pelaz S. et al. APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development //The Plant Journal.2001.Т. 26.№. 4.С. 385–394.
Smaczniak C. et al. Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development //Proceedings of the National Academy of Sciences.2012.Т. 109.№. 5.С. 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.Т. 143.№. 18.С. 3259–3271.

УДК 664.642.2; 663.18

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ И СОХРАНЯЕМОСТИ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ В ЖИДКОЙ РЖАНОЙ ЗАКВАСКЕ

О.А. Савкина, М.Н. Локачук, Л.И. Кузнецова, Е.Н. Павловская, В.К. Хлесткин*

Санкт-Петербургский филиал ФГАНУ НИИ хлебопекарной промышленности,, Россия
**ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Россия*

Хлебные закваски являются полуфабрикатом хлебопекарного производства, получаемым в результате сбраживания питательной смеси из муки и воды (или осахаренной мучной заварки) микроорганизмами, применяемыми в хлебопекарной промышленности. В результате микробиологических процессов в заквасках происходят существенные изменения биополимеров муки, накапливаются низкомолекулярные метаболиты, что может приводить к изменению свойств готовых хлебобулочных изделий. Большая часть заквасок на хлебопекарных предприятиях нашей страны выводятся с использованием чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей из коллекции ФГАНУ НИИ хлебопекарной промышленности и его Санкт-Петербургского филиала и ведется в промышленности достаточно длительное время от полугода до года, а иногда и дольше. При этом может происходить изменение микробиома заквасок под влиянием различных экзогенных факторов, таких как состав и собственный микробиом мучной среды, температура, влажность, режим введения свежей питательной среды (мучной болтушки). Динамика изменений в микробиоме заквасок при длительном ведении на сегодняшний день изучена не достаточно. В частности, нет сведений об изменении микробиома отечественных хлебных заквасок в процессе длительного ведения, хотя степень микробной контаминации основного сырья – муки в России и Европе значительно отличается. В России работы по исследованию динамики изменений микробиома ржаных заквасок при длительном ведении проводятся коллективом проекта, включающим в себя сотрудников Санкт-Петербургского филиала НИИХП и Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных.

Цель исследований – изучить динамику микробиома и сохраняемость чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей в жидкой ржаной закваске для хлеба.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью исследования динамики микробиоты ржаных заквасок с направленным культивированием микроорганизмов выводили по разводочному циклу и вели жидкую ржаную закваску без заварки. В разводочном цикле применяли чистые культуры молочнокислых бактерий L. fermentum 34, L. parabuchneri 30, L. parabuchneri 26, L. plantarum 1 и дрожжей C. milleri Чернореченский, S.cerevisiae Л-1 из коллекции культур микроорганизмов «Молочнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» СПБФ ФГАНУ НИИХП. Используемые для выведения заквасок чистые культуры молочнокислых бактерий и дрожжей были выделены из спонтанных заквасок хорошего качества в 1960-х гг. Они были идентифицированы до вида в соответствии с имеющимися на тот момент методиками. Позже, в 1970-хх годах, были проведены дополнительные исследования с помощью более современных методов (метод люминисцирующих антител) [1,2,3]. В рамках темы госзадания № 0593–2019–0006 «Разработать научные основы формирования микробных композиций и биосистем на их основе, обеспечивающих высокое качество и безопасность хлебобулочных изделий» проведена реидентификация промышленно-ценных штаммов молочнокислых бактерий [4].

Для исследования микробных популяций закваски использовали традиционные методы культивирования в сочетании с фенотипическими (физиологическими и биохимическими) и генотипическими методами определения видовой принадлежности микробиоты. Качественный состав микрофлоры и соотношение микроорганизмов определяли при помощи молекулярно-генетических методов.

Количественный состав микрофлоры заквасок определяли методом постоянных окрашенных препаратов по Бургвицу. Количество жизнеспособных клеток дрожжей и молочнокислых бактерий определяли по ГОСТ 10444.12–2013 и ГОСТ 10444.11–2013.

Для выделения ДНК из образцов был использован набор реактивов (MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Soil) компании MACHEREY-NAGEL (Германия) согласно инструкции производителя.

В каждом образце был определен таксономический состав грибного и бактериального сообщества на основании анализа ампликонных библиотек фрагментов рибосомальных оперонов.

С целью исследования влияния микрофлоры на качество полуфабрикатов и хлеба закваску использовали для приготовления хлеба ржаного из обдирной муки формового (ГОСТ 2077–84).

В полуфабрикатах (закваска, тесто) определяли физико – химические показатели (влажность, кислотность, температуру, подъемную силу, содержание летучих кислот и спирта).

В готовых изделиях определяли физико-химические показатели (влажность мякиша по ГОСТ 21094–75; кислотность по ГОСТ 5670–96, пористость – по ГОСТ 5669–96, удельный объем хлеба методом определения вытесненного объема, сжимаемость мякиша с помощью автоматизированного пенетрометра АП-4–1, а также органолептические показатели (вкус, запах, окраска корок и мякиша, состояние пористости и др.). Содержание летучих кислот в заквасках и хлебе определяли полумикрометодом ВНИИХПа, а содержание спирта в полуфабрикатах и хлебе – методом Мартена в его йодометрической модификации, разработанным во ВНИИХПе.

Исследовали влияние микробного состава на накопление химических веществ в закваске и хлебе, а также на вкус и аромат хлеба. Содержание молочной и уксусной кислот определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования микрофлоры жидкой ржаной закваски без заварки показали, что видовой состав микрофлоры в процессе ведения значительно изменялся, что оказало влияние на показатели качества заквасок и хлеба.

В муке, используемой для приготовления жидкой закваски, содержание молочнокислых бактерий было крайне низким и составляло 0,1 %, а дрожжи не были выявлены. В первой фазе разводочного цикла закваски содержание молочнокислых бактерий рода Lactobacillus составляло 63 %, так же в незначительном количестве (1,2 %) обнаружены молочнокислые бактерии рода Weissella. Присутствовали все четыре внесенных штамма молочнокислых бактерий, из которых доминировал вид L. parabuchneri. Дрожжей вида C.milleri было 58 %, а вида S.cerevisiae -41 % от общего количества грибной микрофлоры. Содержание посторонних бактерий (семейства Enterobacteriaceae) составляло 18–20 %. Также в закваске обнаружены бактерии семейства Clostridiaceae (1,7 %).

Во втором освежении производственного цикла содержание молочнокислых бактерий уменьшилось до 48 %, однако внесенные чистые культуры еще присутствовали в достаточном количестве. Содержание дрожжей также уменьшилось: вида C.milleri – до 48 %, а вида S.cerevisiae – до 28 %. Количество посторонних бактерий (Enterobacteriaceae) снизилось до 3 %. Появились плесневые грибы рода Alternaria (8,5 %), источником которых является мука. Они сохранялись на протяжении всего периода ведения закваски.

При таком видовом составе микрофлоры жидкая ржаная закваска без заварки в разводочном цикле и первых освежениях производственного цикла имела характерные для нее физико-химические показатели: кислотность 10,2–12,2 град, подъемную силу 13–19 минут, содержание летучих кислот 24,6–31,4 %, спирта 1,67–2,49 %СВ. Закваски имели характерный заквасочный запах. Соотношение дрожжи: МКБ составляло 1: (21–55).

К 42 освежению производственного цикла физико-химические показатели существенно не изменились. Однако отмечалось изменение видового состава лактобацилл: все четыре первоначально внесенные штамма не были выявлены, но появились новые виды L.pontis (из муки) и L.sanfranciscensis (в муке не обнаружен, источник не известен). Содержание дрожжей также изменилось: C.milleri -61 %, а вид S.cerevisiae не обнаруживался. Исчезновение вида S.cerevisiae может быть связано с тем, что при ведении закваски в силу технологических причин было отмечено превышение показателя кислотности в некоторых фазах (до 15,4 град). Дрожжи данного вида не являются кислотоустойчивыми (переносят кислотность до 12 град), поэтому они не смогли сохраниться в закваске.

К 81 освежению производственного цикла физико-химические показатели также существенно не изменились, за исключением содержания летучих кислот (снизились в 1,8 раз), что было связано с изменением видового состава лактобацилл: доминировал неуточненный по базе данных GenBank вид Lactobacillus, содержание вида L.pontis снизилось, а вид L.sanfranciscensis не обнаруживался. Из дрожжей присутствовал только вид C.milleri (58 %).

К 93 освежению отмечается резкое снижение содержания спирта (в 4–9 раз), ухудшение подъемной силы (до 40 минут), что объясняется значительным снижением содержания клеток дрожжей в закваске. Однако, в общем видовом разнообразии процентное содержание вида C.milleri существенно не изменилось (58 %). Видовой состав лактобацилл не изменился по сравнению с 81 освежением.

К 42 и 93 освежению количество молочной кислоты увеличивалось, а уксусной несколько снижалось, что в полной мере подтверждает данные по изменению содержания летучих кислот и изменению видового состава заквасочной микрофлоры.

Изучение влияния микрофлоры заквасок на биотехнологические характеристики закваски в течение длительного времени ее ведения, химический состав и качество хлеба показало следующее. В хлебе, приготовленном на исследуемой закваске 2 – 68 освежений производственного цикла, кислотность составляла 7,6–8,6 градусов. Содержание летучих кислот и спирта в процессе ведения уменьшалось с 36,8 % до 24,4 % и с 0,55 до 0,32 % СВ. Хлеб имел традиционный запах и вкус.

В 93 освежении отмечалось существенное снижение содержания спирта до 0,02 % СВ, что связано со снижением содержания дрожжей в закваске. Хлеб имел выраженный кислый вкус.

Содержание органических кислот в хлебе изменялось также, как и в закваске, что связано с изменением видового состава дрожжей и лактобацилл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что внесение чистых культур молочнокислых бактерий и дрожжей приводит к получению качественной закваски с доминированием правильной бродильной микрофлоры уже в первой фазе разводочного цикла. Однако, при длительном ведении заквасок отмечается значительное изменение видового разнообразия лактобацилл. Штамм дрожжей C.milleri при этом сохранялся на протяжении всего периода ведения закваски. Изменение микробиома закваски оказывает существенное влияние на показатели качества закваски и хлеба.

Исследование проводилось при поддержке фонда РФФИ (проект № 19–016–00085 «Исследование видового разнообразия и симбиотических взаимодействий в микробиомах крахмало-белковых гидроколлоидных систем (хлебных заквасок)»). Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

ЛИТЕРАТУРА

Афанасьева, О.В. Микробиология хлебопекарного производства / О.В. Афанасьева; С. – Петер. Фил. Гос. НИИ хлебопекар. Пром-ти (СПб Ф ГосНИИХП). – СПб.: Береста, 2003. – 220 с.

Каталог культур микроорганизмов «Молочнокислые бактерии и дрожжи для хлебопекарной промышленности» из Коллекции Санкт-Петербургского филиала ГНУ ГОСНИИХП Россельхозакадемии / О.В. Афанасьева, Е.Н. Павловская, Л.И. Кузнецова. – М.: Россельхозакадемия, 2008. – 98 с.

Афанасьева, О.В. Микробиологический контроль хлебопекарного производства/ О.В. Афанасьева. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 143 с.

Локачук М.Н. и др Микрофлора хлебных заквасок. Реидентификация отечественных промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий // Хлебопродукты. – 2020. – № 5. – С. 37–39.

УДК 579.64

PSEUDOMONAS ASPLENII 11RW В КАЧЕСТВЕ АНТАГОНИСТА ЗАБОЛЕВАНИЙ ЯБЛОНИ

С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов

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

Парша, вызываемая грибом Venturia inaequalis, является одним из наиболее опасных и распространённых заболеваний яблони. Контроль этого патогена требует частых фунгицидных обработок, что чревато развитием резистентности возбудителя. Поэтому применение микробных антагонистов может стать дополнительным инструментом в борьбе с болезнями сельскохозяйственных культур. Целью настоящего исследования явилось изучение эффективности микробиологического препарата на основе штамма Pseudomonas asplenii 11RW для защиты яблони от парши Venturia inaequalis.

Бактериальную культуру для лабораторного и полевого исследования выращивали на питательной среде, содержащей мелассу и неорганические соли, на лабораторном ферментере Biostat A (Sartorius, Германия) до достижения титра жизнеспособных клеток 10^9 КОЕ/мл.

Антагонистическую активность штамма проверяли в тестах in vitro с использованием чистой культуры возбудителя парши Venturia inaequalis. Суспензию спор и мицелия гриба смешивали со стерильной и охлажденной до 45 °С картофельно-сахарозной средой, разливали по чашкам Петри, после чего в застывшей среде делали лунки, в которые вносили анализируемую бактериальную суспензию. Посевы инкубировали при 26 °С в термостате в течение 10 суток, после чего оценивали степень ингибирования роста гриба. Результаты опыта показывают высокую активность штамма P. asplenii 11RW против изученного фитопатогена яблони: диаметр зоны подавления роста возбудителя парши составил в среднем 46 мм.

Дополнительно препарат тестировали в Краснодарском крае на яблонях сорта Ренет Симиренко (высоковосприимчивый к парше сорт) позднего срока созревания. Препарат применяли с нормой расхода 4,0 л/га путем однократного опрыскивания деревьев в фазу начала спелости плодов. В качестве эталона сравнения использовали стандарт хозяйства. Учеты проводили перед применением биопрепарата и далее через 6–10 суток после обработки, а также при съеме урожая.

На опытном участке парша развивалась по типу тардивной эпифитотии. В контрольном варианте на начало испытаний было поражено треть листового аппарата и половина плодов. Учет результатов после обработки показал, что после применения биопрепарата количество пораженных листьев и интенсивность их поражения не изменились, при этом в контроле в этот период было зафиксировано нарастание инфекционного фона: количество пораженных листьев выросло в среднем в 1,3 раза, количество пораженных плодов – в 1,2 раза. Таким образом, тестируемый препарат успешно блокировал инфекцию парши на листьях и плодах (биологическая эффективность составила 99,8 %), не уступив при этом варианту хозяйства. Период защитного действия анализируемого биопрепарата от конидиальной инфекции парши составил 10 суток.

Таким образом, в лабораторных условиях препарат на основе Pseudomonas asplenii 11RW показал высокую фунгицидную активность против возбудителя парши. Результаты лабораторного опыта подтверждаются и полевым экспериментом, где в стандартных производственных условиях во второй половине вегетации на высоковосприимчивом к парше сорте яблони препарат продемонстрировал высокую эффективность. Следовательно, разработанный биопрепарат имеет перспективы применения в качестве фунгицида для защиты вегетирующих растений яблони.

ЛИТЕРАТУРА

Методические указания по фитосанитарному и фитотоксикологическому мониторингам плодовых пород и ягодников. – Краснодар, 1999.

Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве. – Санкт-Петербург, 2009.

УДК 664.681.1:633.112

НАУЧНЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ НОВЫХ РЕЦЕПТУР ПЕЧЕНЬЯ

Т.Н. Тертычная[1], И.В. Мажулина[1], С.Ф. Яковлева[2]

[1] Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Россия
[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий», Россия

В последние годы большое внимание уделяется разработке организации здорового питания. Перспективными с точки зрения химического состава считаются природные лекарственные источники растительного происхождения, когда можно использовать целый комплекс биологически активных веществ [1]. Целесообразно широко использовать сырье растительного, животного и минерального происхождения, изыскивать новые ресурсы для целенаправленного применения в технологии разнообразных продуктов питания [2–3].

Обоснован выбор рецептуры печенья при максимально возможной введении в рецептуру муки тритикалевой обдирной, растительных композитов в виде порошка из плодов боярышника и порошка топинамбура. Плоды боярышника содержат ряд витаминов и минеральных веществ, антиоксиданты, растворимые и нерастворимые пищевые волокна, бифилавоноиды и др. Вещества, входящие в состав плодов боярышника оказывают благоприятное воздействии при расстройствах сердечно-сосудистой системы, при гипертонической болезни, снижают возбудимость центральной нервной системы, а также усиливает коронарное и мозговое кровообращение. Порошок из клубней топинамбура содержит 10 % клетчатки, 1,1 пектиновых веществ. Его минеральные элементы наиболее весомо представлены железом (до 12 мг %) и кремнием (до 8 %), а также: калий – до 200 мг %, фосфор – до 500 мг %, кальций – до 40 мг %, магний – 30 мг %, марганец – до 45 мг %, цинк – до 15 мг %, медь – до 0,4 мг %, ни-кель – 0,3 мг % и другие [4].

Для оптимизации соотношений ингредиентов принималось симплекс-решетчатое планирование эксперимента. За единицу условно была принята сумма рецептурных компонентов: X_1 – дозировка порошка из плодов боярышника, %; X_2 – дозировка порошка топинамбура, %; X_3 – дозировка муки пшеничной первого сорта, %. В качестве выходного параметра использовался показатель намокаемости печенья (У, %).. Расчет параметров оптимизации проводили по программе «STATISTICA». Проверка уравнения регрессии по критерию Фишера показала, что полученная модель адекватно описывает экспериментальные результаты. С учетом постановки эксперимента получены следующие пределы изменения рецептурных компонентов: дозировка порошка из плодов боярышника – 4,5–7,0 %, порошок топинамбура – 0,5–3,0 %, мука пшеничная первого сорта – 5,0–7,0 %. Дозировка муки тритикалевой обдирной – 85 % от общего расхода.

Печенье удовлетворяет суточную потребность в отдельных эссенциальных веществах на 10–37 %. Использование композитной смеси на основе порошков из плодов боярышника и клубней топинамбура позволяет разработать новые полезные пищевые продукты. Печенье обладает высокими показателями качества и повышенной биологической ценностью за счет повышенного содержании белковых веществ, заменимых и незаменимых аминокислот, клетчатки, минеральных веществ, витаминов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Optimization of technological parameters of preparation of dough for rusks of high nutrition value / /A.A/ Zhuravlev, S.I. Lukina, E.A. Ponomareva, K.E Roslyakova // Foods and Raw Materials. – 2017. – T.5. – № 1. – pp. 73–80.
2. Инновационные подходы к созданию рецептур печенья функционального назначения / И.В. Мажулина, Т.Н. Тертычная, В.И. Оробинский и [др.] // Хлебопродукты. – 2016. – № 1. – С. 56–57.4.
3. Тертычная Т.Н. Сдобное печенье высокой пищевой ценности из муки тритикале / Т.Н. Тертычная // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2009. – № 2. – С. 40–43.
4. Топинамбур – нетрадиционное сельскохозяйственное сырье / О.С. Корнеева, Н.А. Жеребцов, Т.Н. Тертычная и [др.] // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1994. – № 4. – С. 67–68.

УДК 637

БИОТЕХНОЛОГИЯ СМЕТАННОГО ПРОДУКТА С ПРОЛОНГИРОВАННЫМИ СРОКАМИ ГОДНОСТИ

О.И. Долматова

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

В настоящее время молочные продукты с увеличенным сроком годности особенно актуальны [1]. В работе предложена биотехнология сметанного продукта, содержащего в своем составе защитную культуру. «Golden Line Profiline PC 27.50» – это дополнительная культура, которая вносится вместе с основной заквасочной, в ее составе – Lactobacillus rhamnosus, Lactococcus lactis ssp. lactis, Propionibacterium freudenreichii ssp. Freudenreichii. Защитная культура особенно активна в отношении дрожжей, плесеней, БГКП и позволяет создать безопасный продукт [2].

Сметанный продукт получали следующим образом. Для восстановления сухих компонентов рецептурное количество воды набирали в емкость, далее ее нагревали до температуры 40 – 45 °С и при постоянном перемешивании через воронку вносили сухие компоненты. Жировые компоненты предварительно подготавливали, нарезали на куски. Плавление происходило в ванне при температуре не более 63 °С при постоянном перемешивании. После подогрева жировых и молочных компонентов начинали составление смеси. Жир через диспергатор подавали тонкой струйкой в резервуар с молочными компонентами с одновременной циркуляцией получаемой смеси. После перекачивания всего количества жировых компонентов, смесь диспергировали 10–15 минут. В это время вносили стабилизатор консистенции и соль-корректор. Подготовленную и нагретую до 65 °С молочно-растительную смесь направляли на гомогенизатор, затем на пастеризационно-охладительную установку. Пастеризация сливок происходит при температуре (94±2) °С с выдержкой 20 секунд. Далее сливки охлаждали до температуры заквашивания и перекачивали в резервуар. Заквашивание производили путем внесения сухой заквасочной и защитной культуры. После внесения смесь перемешивали в течение 15–20 мин и оставляли для сквашивания. Процесс сквашивания считали оконченным после образования плотного сгустка, с показателем активной кислотности не менее pH 4,6, титруемой кислотности – не менее 54°Т. Далее продукт перемешивали с одновременным охлаждением ледяной водой, которая подается в рубашку резервуара в течение 5–10 минут. Затем продукт подавали на фасовочный автомат. После фасовки и маркировки, продукцию направляли в холодильные камеры с температурным режимом (4±2)°С для охлаждения и созревания. Процесс созревания длился от 12 до 48 часов. За это время продукт приобретал оптимальные органолептические характеристики, а именно накапливал ароматические вещества, происходил процесс структурообразования, который делает консистенцию более плотной.

Параллельно проводили две выработки сметанного продукта – первая с применением защитной культуры (экспериментальный образец), вторая – без добавления (контрольный образец). Выработанный продукт был поставлен в холодильную камеру при температуре (4±2)°С на 40 суток, с целью подтверждения его хранимоспособности в течение предполагаемого срока годности – 30 суток. Органолептический, физико-химический и микробиологический контроль проводили каждые 10 суток. Установлено, что сметанный продукт с защитной культурой хранится дольше на 30 % по сравнению с контрольными образцами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голубева Л.В. Разработка технологии сметанного продукта с увеличенным сроком годности / Л.В. Голубева, О.И. Долматова, Ю.Г. Медко // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2017. – Т. 79. – № 3 (73). – С. 109–114.
2. Тютикова Н.С. Биозащита – натуральный способ сохранить продукты питания / Т.С. Тютикова // Переработка молока. – 2018. – № 5. – С. 29.

УДК 634.8

РИЗОГЕНЕЗ ВИНОГРАДА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *EX VITRO*

Т.А. Красинская

Институт плодоводства, аг. Самохваловичи, Беларусь

Ризогенез в условиях *in vitro* проводили на модифицированных средах Мурасиге-Скуга, содержащих различные ауксины (индолилмасляная (ИМК), α-нафтилуксусная (НУК) и индолиуксусная (ИУК) кислоты) в концентрации 0,2 мг/л. Длительность этапа – 3 недели. Для ризогенеза в условиях *ex vitro* использовали нестерильный субстрат, состоящий из: нижний слой – мох сфагновый (*Sphagnum* L.); верхний слой – торфяной субстрат «Двина». Растения длиной 1,5–2 см после этапа микроразмножения высаживали в субстрат и закрывали, создавая условия повышенной влажности. Длительность ризогенеза в условиях *ex vitro* – 12 недель. В качестве объектов исследований служили сорта Агат донской, Bianca, Зилга.

Ризогенез в условиях *in vitro*. Максимальная доля укорененных растений-регенерантов (99,0 %) отмечалось при использовании в питательных средах ИМК. Результативность ризогенеза при использовании НУК была идентичной, как и на безгормональной среде (64,0 и 64,3 % соответственно). Сорт Bianca демонстрировал высокий потенциал к ризогенезу, образовывая корни даже на среде без ауксинов (86,3 %). Рост стебля и развитие корневой системы достоверно определялись генотипом культивируемых сортов и видом ауксина. Через 3 недели этапа ризогенеза длина стебля растений-регенерантов сорта Bianca составила 2,5 см, что в 1,7 раз выше, чем у сортов Зилга и Агат донской. Длина стебля растений достоверно отличалась на различных средах: на безгормональной среде, на средах с ИМК и ИУК средняя длина стебля составила 2,0 см, на среде с НУК – 1,3 см. Сорта Bianca и Зилга характеризовались большим количеством корней, образовавшихся после трех недель культивирования, и большей их длиной. У сорта Агат донской ростовые процессы корневой системы проходили медленней, чем у предыдущих сортов, но количество корней и их длина была оптимальна для переноса растения в нестерильные условия. Использование всех изучаемых ауксинов стимулировало закладку корневых зачатков: среднее количество корней варьировало от 3,5 до 4,5 шт. в зависимости от вида ауксина. В то время как на безгормональной среде данный показатель составил значение 2,9 шт. Отмечалась сортоспецифичная реакция сортов винограда на различные ауксины при развитии корневой системы. У сорта Bianca максимальный показатель развития корневой системы отмечался на средах с ИМК и НУК. У сорта Зилга ауксин ИУК способствовал большему развитию корневой системы, чем ИМК и НУК. Сорт Агат донской на средах с ИМК показывал лучшие показатели развития корневой системы. Таким образом, в среднем по сортам использование 0,2 мг/л ИМК в качестве стимулятора ризогенеза эффективно для роста и развития корней.

Ризогенез в условиях *ex vitro*. Перспективным направлением является разработка элементов технологии ризогенеза растений-регенерантов непосредственно в нестерильный субстрат, минуя этап ризогенеза в условиях *in vitro*. Через 12 недель этапа ризогенеза растений-регенерантов в условиях *ex vitro* был отмечен достаточно высокий процент укорененных растений, который варьировал от 61,1 до 91,7 % в зависимости от сорта, что сопоставимо с полученными результатами ризогенеза в условиях *in vitro*. Морфологические показатели развития надземной и подземной частей растений после ризогенеза в условиях *ex vitro* определялись генотипом: максимальные показатели отмечались у сортов Агат донской и Зилга. Длина стебля растений после ризогенеза в нестерильных условиях была в три раза выше таковой у растений, ризогенез у которых проходил в условиях *in vitro*: 4,4–7,9 см у растений после ризогенеза *ex vitro* и 1,5–2,5 см у растений после ризогенеза *in vitro*. Таким образом полученные результаты исследований показали возможность укоренения сортов винограда в нестерильном субстрате без предварительной обработки ауксинами. После 12 недель одновременного ризогенеза и адаптации в условиях *ex vitro* растения достигали оптимальной длины и развития корневой системы для пересадки на этап постадаптации и дальнейшего культивирования.

УДК 577.151, УДК 66.098

НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ БИОДЕСТРУКЦИИ КСАНТАНА: ПОЛНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ IN VITRO И ВОЗМОЖНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

С.В. Швецова[1,2.3], Л.В. Юрченко[1], Е.В. Журишкина[1.3], К.С. Бобров[1.3], А.А. Кульминская[1.3]

[1] Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия,
[2] Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
[3] Курчатовски геномный центр-ПИЯФ, Гатчина, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Ксантановая камедь (ксанатан) – это анионный полисахарид, широко применяемый в различных областях промышленности. По химической структуре молекула ксантана имеет целлюлозный остов и линейные боковые цепи, состоящие из маннозил–глюкуронил–маннозных субъединиц, последовательно присоединенных в О-3-положении к некоторым глюкозильных остаткам остова [1]. Кроме того, внутренние и терминальные остатки маннозы в боковых цепях могут быть модифицированы посредством пируватных и ацетильных групп. Востребованность данного биополимера обусловлена его уникальными свойствами: отличная загущающая способность, высокая вязкость раствора при низкой концентрации, устойчивость к биоразложению, стабильность в широком диапазоне температур, pH, солености и давления. Перечисленные параметры делают его привлекательным, например, для пищевой, фармацевтической, медицинской, нефтяной промышленностей [2, 3]. Ксантан широко используется в процессе повышения нефтеотдачи в качестве добавки к буровому раствору и активно применяется при бурении нефтяных скважин в Европе и США [2]. Детальные знания о возможностях частичной или полной деструкции, а также модификации физико-химических свойств высокостабильного полимера ксантана при помощи ферментов микроорганизмов являются на сегодня недостающим звеном в рамках его успешного использования. Задачи по утилизации отработанных буровых растворов с использованием ксантана, а также применение полисахарида на некоторых этапах нефтедобычи делают актуальным поиск новых перспективных микроорганизмов, способных деградировать ксантан, а значит, и исследование ферментных систем на их основе [4]. Уменьшение молекулярной массы или изменение структуры биополимера при помощи ферментных препаратов может позволить применять полученные продукты в новых биотехнологических отраслях [5] или же станет быстрым и безопасным способом утилизации биополимера, что важно с точки зрения экологии и природоохранных вопросов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Скрининг продуцентов ксантан-деградирующего комплекса ферментов осуществляли с использованием коллекции микроорганизмов (бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы) лаборатории энзимологии Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, а также полученных в рамках исследования новых изолятов. Для поиска требуемых активностей, штаммы культивировали на жидкой и / или твердой (1,5 % агара) среде с ксантаном (0,3 % ксантана, 0,1 % пептона в растворе минеральных солей) при 28 °С. В результате скрининга были отобраны 1 перспективный штамм, способный гидролизовать ксантан. Морфологию клеток наблюдали с использованием световой микроскопии. Генетическую идентификацию штамма выполняли путем ПЦР-амплифицирован гена 16S рРНК с использованием набора праймеров 8F и 1492R [6].

Влияние источников углерода на рост клеток и продукцию ксантан-деградирующих ферментов штамма X1 осуществляли на средах с различными углеводсодержащими компонентами (0,3 % (вес/об.) ксантан, 0,5 % (вес/об.) ксантан или по 1 % (вес/об.) глюкоза, водорастворимый крахмал, сахароза, лактоза, карбоксиметилцеллюлоза, манноза, альгинат, хитозан, каррагинан) и культивировали при 28 °С, 150 об/мин на шейкере. Для исследования влияния источников азота, изолят X1 культивировали в течение суток на среде с ксантаном для получения инокулята, а затем клетки переносили на среды с 0,3 % (вес/об.) ксантана и 0,1 %-ным содержанием (вес/об.) различных источников азота, таких как триптон, дрожжевой экстракт, пептон, бычий экстракт, мочевина, нитрат аммония и сульфат аммония.

Концентрацию клеток в процессе роста культуры измеряли при 600 нм. Измерение ферментативной активности внеклеточных ферментов выполняли с использованием культуральной жидкости в качестве грубого ферментного препарата.

Концентрированный ксантан-деградирующий ферментный препарат получали путем осаждения сульфатом аммония супернатанта культуральной жидкости (степень насыщения 70 % (вес/об.)); осадок растворяли и диализовали в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 6,5. Активность внутриклеточных ферментов измеряли после вскрытия клеток ультразвуком, предварительно обработанных лизоцимом в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 6,5. Освобождение восстанавливающих сахаров в процессе роста изолята на среде с ксантаном, а также в реакционной смеси определяли с использованием метода PAHBAH [7]. Активность ксантан лиазы определяли по увеличению величины поглощения при 235 нм [8]. Измерение активности секретируемых и внутриклеточных экзо-гликозидаз осуществляли с использованием хромофорных п-нитрофенил (пНФ) гликозидов: пНФ-α-D-маннопиранозид, пНФ-β-D-глюкопиранозид, пНФ-целлобиозид. Измерение вязкости осуществляли с использованием вискозиметра Brookfield DV2T-LV. Мониторинг образования продуктов разложения ксантана в реакционной смеси осуществляли с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе бутанол / уксусная кислота/ вода (2:1:1, об./об./об.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе поиска продуцентов, обладающих ферментной системой для эффективной биодеструкции ксантана, был обнаружен и изолирован штамм бактерии X1, способный расти на среде с ксантаном. Основываясь на снижении вязкости в растворе ксантана, высвобождении ксантоолигосахаридов и обнаружении ферментативной активности, был определено, что штамм X1 является ксантаноразлагающей бактерией (рис. 1). Исходя из полученных предварительных данных, а также основываясь на знаниях о структуре биополимера ксантана, было сделано предположение о наличии у нового штамма X1 собственного ксантанолитического комплекса ферментов. Данный комплекс, теоретически, должен включать такие ключевые ферменты, как ксантан лиаза (КФ 4.2.2.12, PL8), α-маннозидаза (КФ 3.2.1.24, GH38), β-глюкозидазу (КФ. 3.2.1.21), глюкуронидаза, а также возможно присутствие фермента эндо-действия, специфичного в отношении полимерной цепи ксантана. Глюканазы, специфичные как ксанатаназы эндо-типа, обнаружены у некоторых штаммов бактерий, способных к биодеструкции ксанатана [9, 10]. Было показано, что в полученном нами ферментном препарате из изолята X1 при росте на среде с ксантаном, имеются активности ксантан лиазы, α-маннозидазы, β-глюкозидазы, а также другие гидролитичесике активности. Было установлено, что ксантан лиаза проявляет максимальную активность в области pH 5,0–6,0, при проведении реакции при температуре 37 °C.

Новый изолят X1 был идентифицирован на основе микробиологических и генетических методов как представитель рода Paenibacillus sp. X1. Для полученного нового продуцента Paenibacillus sp. X1 было оценено влияние источников углерода и азота на рост клеток и продукцию ксантан-деградирующих ферментов. Показано, что среди протестированных источников азота, добавление в среду пептона в количестве 0,1 % являлось наиболее оптимальным для роста и выработки требуемого комплекса ферментов.

На выбранной среде XP был исследован пул секретируемых и внутриклеточных активностей ксантанолитического комплекса ферментов нового продуцента XI. Раствор ксантана (0,3 % вес/об.) обрабатывали внеклеточными и внутриклеточными ферментными препаратами, полученными при росте на жидкой среде XP. Для этого, в процессе роста культуры ежедневно отбирали аликвоты культуральной жидкости, центрифугировали, клетки вскрывали для получения внутриклеточных ферментов. Действие ферментов и наличие образующихся продуктов реакции отслеживали по изменению вязкости раствора ксантана и количеству восстанавливающих сахаров в реакционной смеси, а также при помощи ТСХ-анализа реакционной смеси. На рисунке 2 представлена динамика образования продуктов биодеградации ксантана различными фракциями ферментов из изолята X1. Видно, что при действии секретируемых (внеклеточных) и внутриклеточных ферментов на ксантан, спектр продуктов различен. Активность внутриклеточных ферментов достигает максимума на 3–4-е дни роста культуры, тогда как активность секретируемых ферментов в культуральной жидкости – на 4–5-е дни. Вероятно, это связано с тем, что часть ферментов, задействованных в полной биодеструкции ксантана, являются внутриклеточными. Полученные данные хорошо согласуются с недавно опубликованными результатами по протеомному исследованию ксантан-деградирующего пула ферментов у бактреии Microbacterium sp. XT11 [9]. Пятно, отмеченное стрелкой (рис. 2), вероятно, является маннозой с пируватной группой и отщепляется ксантан лиазой.

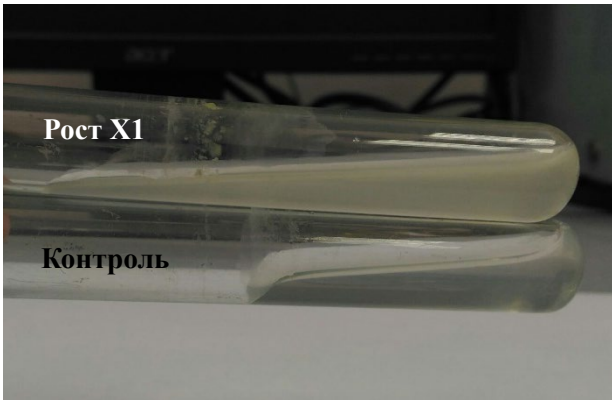


Рисунок 1 – Снижении вязкости раствора ксантана новой ксантаноразлагающей бактерией X1

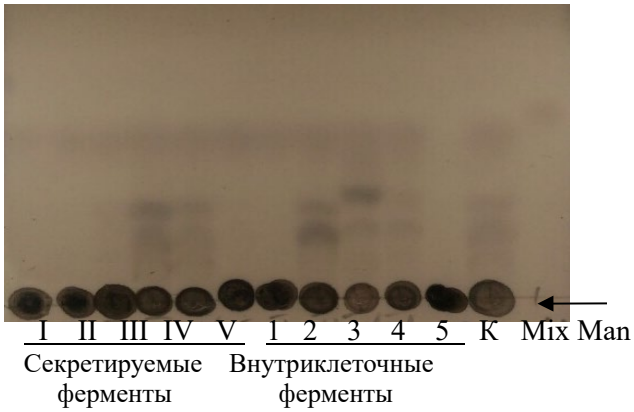


Рисунок 2 – ТСХ-анализ реакции расщепления ксантана грубым ферментным препаратом. I–V / 1–5 – день роста культуры, Mix – смесь секретируемых и внутриклеточных ферментов на 5-й день роста; Man — манноза

На следующем этапе был получен концентрированный ферментный препарат для обработки ксантана. При анализе реакционной смеси, инкубируемой при 37 °C в течение 9-ти часов, методом ТСХ в было показано высвобождение и увеличение концентрации во времени ксантоолигосахаридов и других низкомолекулярных продуктов, а также существенное снижение вязкости 0,3 %-го раствора ксантана (рис. 3). Итогом проводимого эксперимента была полное разрушение биополимера (не показано на рисунке), что указывает на большой потенциал полученного ферментного препарата.

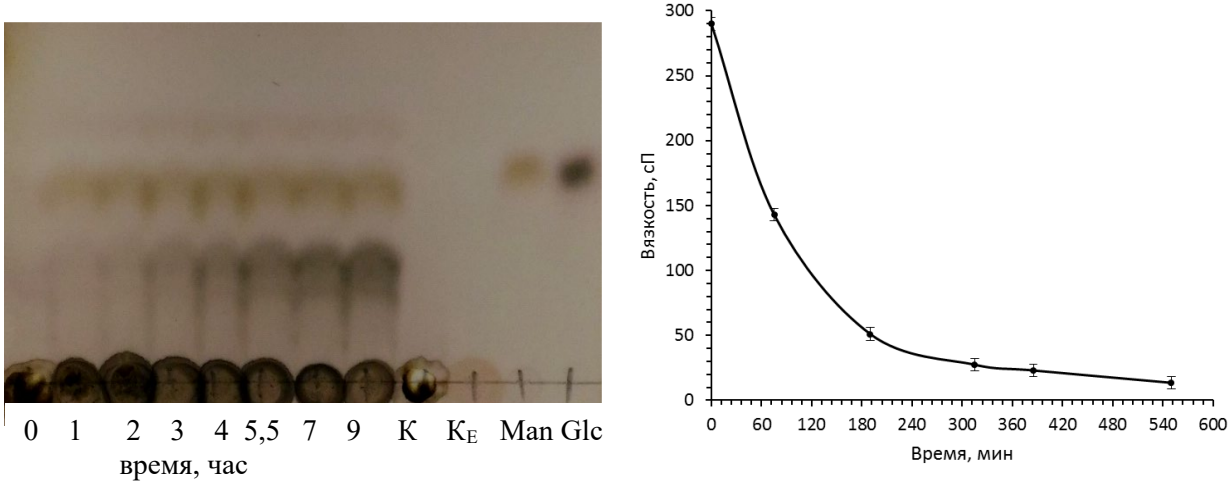


Рисунок 3 – Динамика биодеструкции ксантана (E415) концентрированной фракцией ферментного препарата, секретируемого изолятом X1. ТСХ-анализ реакции расщепления ксантана (0,3 % (вес/об.)) и образование низкомолекулярных продуктов (слева) и кривая снижения вязкости ксантана во времени (вискозиметр Brookfield DV2T-LV, насадка 42Z, 3 rpm, 1 мл образца) (справа). 0 – нулевая точка реакции; 1, 2, 3, 4, 5,5, 7, 9 – время реакции, часы; К – контроль ксантана; КЕ – контроль ферментного препарата; Man – манноза; Glc – глюкоза.

Дальнейшее изучение разнообразия ферментов и их особенностей из нового изолята X1, а также оптимизация методики ферментативной обработки ксантана представляет собой как актуальную задачу прикладного характера, поскольку разработка эффективного и недорогого «коктейля» ферментов для быстрого разложения биополимера крайне важна. Кроме этого, исследование биохимических особенностей каждого из ключевых ферментов для биодеструкции ксантана в отдельности имеет значимую фундаментальную роль и позволит расширить современные представления о роли и функциях этих ферментов, а также поможет усовершенствовать или получить новые биокатализаторы с требуемыми свойствами.

По полученным результатам можно заключить, что нами выделен ксантан-деградирующий штамм бактерии Paenibacillus sp. XI, который способен деполимеризировать высокостабильный биополимер, приводя к снижению вязкости раствора ксантана и изменению его химической структуры. Ферментная система, производимая штаммом X1, имеет большой потенциал для применения в процессах повышения нефтеотдачи пластов и бурения нефтяных скважин для модификации структуры биополимера. Кроме того, концентрированный ферментный препарат имеет большие перспективы при разработке и оптимизации подходов к решению задачи полной утилизации отработанного ксантан-содержащего бурового раствора, закачиваемого в подземные нефтяные скважины.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075–15–2019–1663.

ЛИТЕРАТУРА

1. Becker A. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective / Becker A., Katzen F., Pühler A., Ielpi L. // Applied Microbiology and Biotechnology – 1998. – Т. 50 – № 2 – С. 145–152.
2. Echt T. Impact of the drilling fluid system on the effectiveness of a high pressure jetting assisted rotary drilling system / Echt T., Stoxreiter T., Plank J. // Heliyon – 2020. – Т. 6 – № 6 – С.e04179.
3. Kumar A. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review / Kumar A., Rao K.M., Han S.S. // Carbohydrate Polymers – 2018. – Т. 180 – С. 128–144.
4. Chen X. Isolation and characterization of xanthan-degrading Enterobacter sp. nov. LB37 for reducing the viscosity of xanthan in petroleum industry / Chen X., Wang M., Yang F., Tang W., Li X. // World Journal of Microbiology & Biotechnology – 2014. – Т. 30 – № 5 – С. 1549–1557.
5. Chen Q. Low molecular weight xanthan gum suppresses oxidative stress-induced apoptosis in rabbit chondrocytes / Chen Q., Shao X., Ling P., Liu F., Shao H., Ma A., Wu J., Zhang W., Liu F., Han G., Wang F. // Carbohydrate Polymers – 2017. – Т. 169 – С. 255–263.
6. Weisburg W.G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. / Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. // Journal of Bacteriology – 1991. – Т. 173 – № 2 – С. 697–703.
7. Lever M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates / Lever M. // Analytical Biochemistry – 1972. – Т. 47 – № 1 – С. 273–279.
8. Jensen P.F. Structure and Dynamics of a Promiscuous Xanthan Lyase from Paenibacillus nanensis and the Design of Variants with Increased Stability and Activity / Jensen P.F., Kadziola A., Comamala G., Segura D.R., Anderson L., Poulsen J. – C.N., Rasmussen K.K., Agarwal S., Sainathan R.K., Monrad R.N., Svendsen A., Nielsen J.E., Lo Leggio L., Rand K.D. // Cell Chemical Biology – 2019. – Т. 26 – № 2 – С. 191–202.e6.
9. Sun Z. Proteomic Analysis of the Xanthan-Degrading Pathway of Microbacterium sp. XT11 / Sun Z., Liu H., Wang X., Yang F., Li X. // ACS omega – 2019. – Т. 4 – № 21 – С. 19096–19105.
10. Ashraf S. Production of Xanthanases by Paenibacillus spp.: Complete Xanthan Degradation and Possible Applications / Ashraf S., Soudi M.R., Ghadam P. // Iranian Journal of Biotechnology – 2017. – Т. 15 – № 2 – С. 120–127.

УДК 66.047

ПРИМЕНЕНИЕ ОБОРУДОВАНИЯ FLOTTWEG В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

М.М. Аксенов, О.В. Дубровская

ООО «Флоттвег Москау», Химки, Россия

В данном материале подробно представлена техническая разработка – центрифуга Flottweg Sedicanter® для разделения дрожжевых суспензий, ферментационных бульонов с целью последующего выделения протеинов из дрожжевых ферментатов и экстрактов растительных протеинов, проводится сравнение с другими технологиями, применяемыми в настоящее время.

Sedicanter® находит все большее применение в биотехнологии там, где присутствуют процессы ферментации. На заключительном этапе процесса возникает потребность в отделении продуцента от ферментационного бульона, это происходит все зависимости от того, что является целевым продуктом – выделяемые микроорганизмом продукты жизнедеятельности (находящиеся в жидкой фазе) или непосредственно сама биомасса (если ценный компонент содержится внутри клетки).

Использование Sedicanter® позволяет существенно упростить последующие этапы производства (фильтрацию, очистку, рафинацию и другие). Данная центрифуга позволяет сделать основной биотехнологический процесс непрерывным, например, проводить его в ферментационной батарее, в которой находится продуцент, лишь подавая в неё субстрат в необходимом количестве.

Итак, Sedicanter® – это центрифуга нового типа, которая была разработана для переработки тяжело осаждающихся продуктов: избыточных пивных дрожжей и белковых суспензий типа соевых, гороховых и люпиновых изолятов. Обычные декантеры и другие центрифуги при переработке таких продуктов часто показывают неудовлетворительные результаты разделения и низкую производительность.

Избыточные дрожжи образуются в танках брожения / дображивания (ЦКТ) на этапе основного брожения, а в конце процесса брожения происходит процесс осаждения дрожжей. Эта дрожжевая суспензия имеет в среднем 6–16 % масс. сухих веществ, то есть содержание пива в ней все еще очень значительно. Приблизительно 2–3 % пива от годовой производительности завода теряется вместе с дрожжами.

Использование современных технологий позволяет уменьшить потери за счет возврата восстановленного пива обратно в пивоваренный процесс.

В таблице 1 приводится сравнение технологий извлечения пива из избыточных дрожжей (для систем с эффективной производительностью в диапазоне 15–35 гл/час).

Таблица 1. Сравнение технологий извлечения пива из избыточных дрожжей.

Сравнение технологий извлечения пива из избыточных дрожжей (для систем с эффективной производительностью в диапазоне 15–35 гл/ч)				
Показатель	Тип оборудования			
	Sedicanter®	Мембрана (CF)	Декантер	Сопловой сепаратор
Содержание СВ в подаче, % масс.	6-16	6-12	10-16	6-10
Качество фугата, % об.	< 0,3	0	< 2	0,1
Содержание СВ в дрожжах на выходе, % масс.	< 25	< 22	< 22	< 20
Энергопотребление, кВт	32	60	22	40-55
Удельное энергопотребление, кВт/гл центрата	1,6	4	1,3	3,7
Разведение исходного продукта	Нет	1:2	Нет	1:2
Потребление воды, гл/ч	0,5	14	0,5	14
Дополнительное охлаждение	Нет	Да	Нет	Да
Стоимость обслуживания в год, %	2	4–6	2	5
Система безразборной мойки	Общая	Отдельная	Общая	Общая

Немецкий производитель Flottweg предлагает уникальное решение для переработки – Sedicanter® .

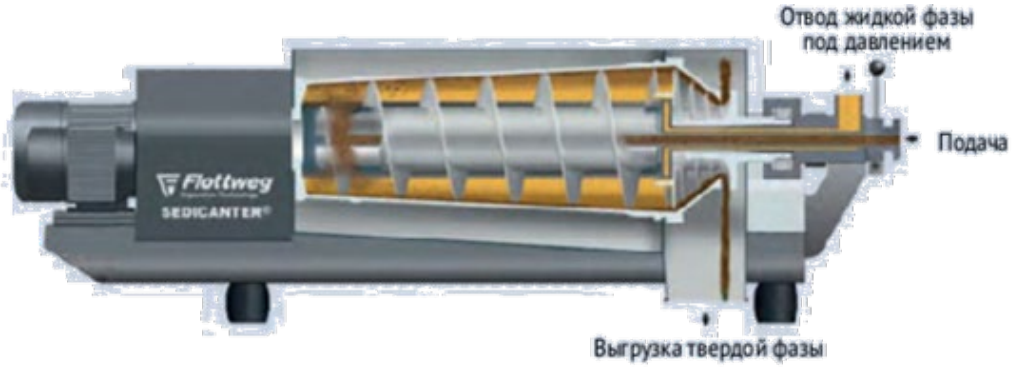


Рис. 1. Sedicanter® , вид в разрезе.

Горизонтальная, двухконусная центрифуга со сплошной стенкой для непрерывного разделения суспензий из жидкости и сложных для обезвоживания мелких твердых частиц. Осветленная жидкая фаза выгружается под давлением через импеллер в цилиндрическом конце барабана. Легко регулируемый импеллер дает возможность точной настройки глубины загрузки в барабане во время эксплуатации для адаптации машины к изменяющимся условиям работы. Обезвоженная твердая фаза движется к коническому концу барабана, где она выгружается через порты выгрузки благодаря гидравлическому давлению, внутреннему шнеку и высокой инерции.

Sedicanter® чрезвычайно универсален, так как способен работать с различными концентрациями избыточных дрожжей в подаче, а также может быть легко адаптирован и настроен для работы в диапазоне 6–16 % масс. в подаче. Перед подачей не требуется разбавления продукта водой, эффективность сепарации не снижается при меняющихся параметрах суспензии в подаче. Содержание сухих веществ в дрожжевом «пироге» в момент выгрузки >24 % масс. В центрате (регенерированном пиве) содержание дрожжей менее чем 0,3 % об. (< 1 млн. дрожжевых клеток в мл).

Отдельно необходимо отметить непрерывный процесс работы оборудования: не требуется обратная промывка для восстановления требуемого уровня производительности. Все параметры (дифференциальная скорость, позиция импеллера и т. д.) могут быть настроены во время работы без остановки подачи или всей системы. Температура при эксплуатации равна температуре хранения дрожжей (обычно 3–5 °C). Не требуется дополнительного охлаждения. Весь барабан герметизирован с CO2, чтобы избежать захвата воздуха.

Под корпусом расположена камера твердой фазы. При добавлении воды на данном этапе через распылители, установленные на внутренней стороне корпуса, дрожжевой «пирог» разбавляют до получения пригодной для перекачки насосом консистенции и направляют в танки хранения дрожжей.

Sedicanter® и вспомогательное оборудование могут быть легко интегрированы в систему CIP. Промывка с использованием каустика, кислот и воды осуществляется через загрузочную трубу, и специальные дополнительные жидкости для мойки не требуются. Благодаря возврату CIP-растворов через линию центрата и камеру выгрузки твердой фазы отсутствуют специфические потери моющих сред. При условии использования Sedicanter® в режиме 24/7, интервалы промывки – макс. 4 часа 1–2 раза в неделю.

Вне зависимости от того, на каком оборудовании пиво было извлечено из дрожжей, данный продукт следует возвращать обратно в процесс, принимая меры предосторожности.

Регенерированное пиво может создать биологические и органолептические проблемы, если его не подвергнуть дополнительной обработке. Значение pH такого пива обычно выше 5,0, что ведет к выделению протеинов, горьких веществ и жирных кислот. Жирные кислоты со средней длиной цепи (продукты автолиза дрожжей) даже в незначительной концентрации оказывают отрицательное влияние на вкус и стойкость пены. Таким образом, при переработке избыточных дрожжей следует уделять особое внимание их физиологическому состоянию (отсутствию признаков автолиза). С увеличением количества мертвых дрожжевых клеток значительно снижается фильтруемость пива.

Восстановленное с помощью Sedicanter® пиво добавляется к исходному продукту в количестве 2–5 % от объема на одном из трех этапов производства:

1) в вирпул, 2) на этапе фильтрации готового пива (необходима дополнительная пастеризация)

3) перед началом процесса главного брожения (необходима дополнительная пастеризация) (рис. 2).

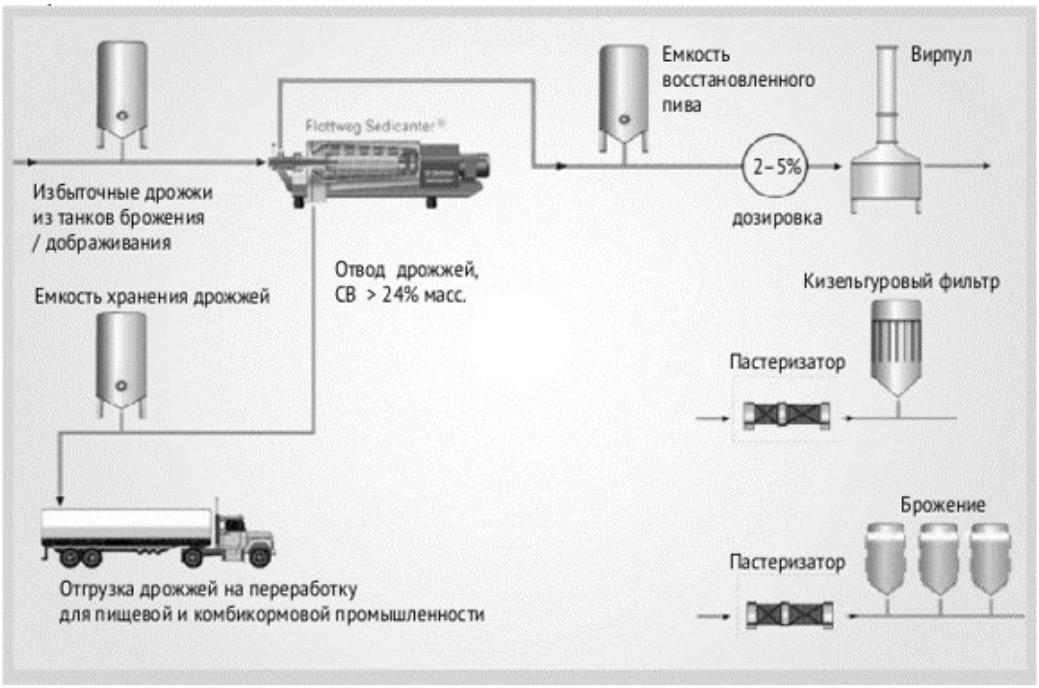


Рис. 2. Способы возврата восстановленного пива

Третий способ считается наиболее оптимальным, так как в этом случае дрожжи активно потребляют растворенные в восстановленном пиве продукты автолиза и используют их для строительства клетки. Таким образом, исключается негативное влияние восстановленного пива на качество готового продукта.

Кроме примера использования центрифуги Sedicanter® на сепарации "дрожжевого пирога" следует выделить обезвоживание растительных протеинов на основе гороха, сои и люпина, а также различные экстракты и ферментаты.

Широкое применение Sedicanter® также находит в производстве соевого молока для выделения тонкодисперсной окары.

Весьма новое применение Sedicanter® находит для выделения микроводорослей пищевого назначения. Например, небезызвестный протеиновый концентрат Спирулина – концентрат на основе Спиреллы и Хлореллы (вид протеиновых микроводорослей) – эффективно выделяется с помощью Sedicanter® .

В настоящее время морские водоросли во все возрастающей степени используются в качестве сырья для производства косметической, пищевой и биотопливной продукции. Перед сбором урожая морские водоросли выращиваются в бассейнах для выращивания морских водорослей или фотобиореакторах. Сбор урожая осуществляется путем отделения морских водорослей от субстрата для выращивания. Технология сбора урожая морских водорослей включает отстой или флотацию, центрифугирование и фильтрацию. В любом случае метод сбора урожая является решающим относительно эффективности всего процесса с точки зрения капиталовложений и производственных расходов.

Технологический процесс сбора урожая от компании Flottweg – это двухстадийный процесс, состоящий из предварительного концентрирования посредством статического отстойника, фильтрации, флокуляции или пневматической флотации и сбора урожая с помощью Sedicanter® с целью обезвоживания концентрата.

В сравнении с одностадийным процессом лишь малая часть суспензии морских водорослей отделяется путем центрифугирования, существенно сокращая, таким образом, расход энергии. В отличие от предварительного концентратора, обеспечивающего фазу чистой воды, Sedicanter® обезвоживает концентрат морских водорослей с целью получения сплошной массы (осадка) с содержанием сухого вещества в 22–25 %.

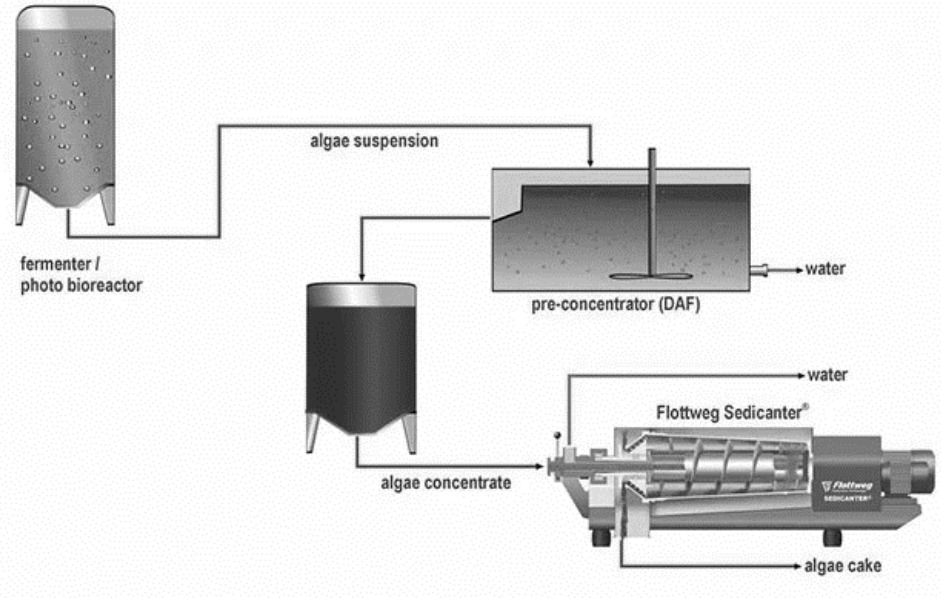


Рис. 3. Технологический процесс Flottweg: сепарация водорослей

Уникальная конструкция Sedicanter® позволяет перерабатывать продукт с высоким содержанием взвешенных веществ и достигать эффективность сепарации близкую к показателям терельчатых сепараторов.

Компания Flottweg (Германия) имеет уже более чем вековую историю: созданная Густавом Отто в 1911 году в Мюнхене, она изначально выпускала самолеты, затем в 20-х годах уже под брендом Flottweg большую популярность и коммерческий успех ей принесло производство велосипедов и мотоциклов. Постоянно совершенствуясь и развиваясь, компания Flottweg в 1956 году выпустила свой первый декантер. С тех пор немецкими инженерами был создан целый ряд инновационных машин для центробежного разделения в самых разнообразных отраслях промышленности: в 1971 году на рынок была выведена трехфазная центрифуга – Tricanter®. Затем в 1994 году были разработаны и успешно применяются по всему миру Sedicanter® для тонкодисперсных суспензий и Sorticanter®. Кроме того, компания выпускает высокопроизводительные ленточные прессы, а с 2001 года – тарельчатые сепараторы.

Сегодня компания Flottweg представлена по всему миру и является признанным лидером в производстве центробежной техники. Ее специалисты помогают многочисленным клиентам компании на всех этапах сотрудничества, от первоначального экспертного выбора оборудования, проектирования комплектных решений для конкретных производственных задач, до поставки и запуска в промышленную эксплуатацию.

ЛИТЕРАТУРА

Современные технологии рациональной переработки отходов пивоваренного производства / Аксенов М.М., Дубровская О.В. – Журнал "Пиво и напитки", 3, 2019, – стр. 50.

Выделение микробиологических и растительных протеинов с помощью центрифуги Flottweg Sedicanter® / Хрулев А.А., Аксенов М.М., Бесчетникова Н.А. – Журнал «Пищевая промышленность», 12–2017, стр. 2.

Регенерация пива из дрожжевого осадка с помощью седикантера Флоттвег / Ф. Колезан, Ст. Патерсон – Журнал "Пиво и напитки", 4, 2006, – стр. 44.

Седикантер Флоттвег для глубокой очистки фугата спиртовой барды / Хрулев А.А. – журнал "Производство спирта и ликероводочных изделий", 2, 2008, стр. 20.

Сепарация барды – успешное решение Флоттвег / Хрулев А.А. – журнал "Производство спирта и ликероводочных изделий", 2, 2013, стр. 20.

УДК 575.113.1:634.8

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК ДЛЯ СКРИНИНГА ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ВИНОГРАДА

В.А. Полтораченко[1], Я.И. Алексеев[1,2], Вей Чен[3], В.А. Володин[2], С.М. Гориславец[2], В.И. Рисованная[2], С.А. Блинова[1,4]

[1]– ООО «Синтол», Москва, Россия
[2] ВНИИ виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, республика Крым, Ялта
[3] Юньнаньский аграрный университет, Китай
[4] ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

Растения рода Vitis имеют большое значение для сельского хозяйства. Внутри рода наибольшее распространение в мировой винодельческой промышленности получил европейский вид Vitis vinifera L. Подавляющее большинство сортов винограда относятся к Vitis vinifera vinifera (2n=38), почти все сорта высокогетерозисные, гермафродитные и клейстогамные, но несмотря на это, легко переопыляются. Из-за высокой степени генетического разнообразия, частого внесения во вторичные центры одомашнивания и наличия возможных гибридных форм, тысячи сортов винограда обычно классифицируют от конечного получаемого продукта. Огромное количество синонимичных генотипов привело к тому, что в мировых коллекциях зародышевой плазмы по данным разных авторов находится от 10 000 до 14 000 образцов (This et al., 2006).

Среди основных молекулярно-генетических методов сортовой идентификации винограда особое место занимают маркеры простых нуклеотидных повторов (SSR), которые на сегодняшний день остаются одним из основных диагностических инструментов (Arroyo-Garcìa et al, 2006; Grassi et al., 2003). В последнее время все большее распространение для изучения сортового различия геномов винограда получают маркеры однонуклеотидных замен (SNP), представленные как заменами, так и делециями / инсерциями. Маркеры SNP обладают низким показателем ошибки генотипирования и низкой вероятностью появления мутаций по сравнению с SSR маркерами, в связи с чем их использование позволяет повысить точность и надежность генетического типирования сортов (Carmona et al., 2008; Emanuelli et al., 2013).

Изучение полиморфизма генов актуально для анализа эволюционных аспектов создания сорта, а также для определения зависимости наличия разнообразных мутаций от интенсивности проявления признака, полученные данные можно использовать также для проведения селекционного процесса.

Ранние изучения Крымских сортов привели к возникновению гипотезы о синонимичности аборигенных сортов винограда Кефесия, Эким Кара, а сорт Крона был выделен в отдельный, однако очень близкий к сорту Эким Кара. В более поздние годы были проведены фенотипические исследования, результаты которых ставят под сомнения сведение в синонимы указанных сортов. Спорное предположение о происхождении аборигенных крымских сортов Эким Кара, Кефесия и Крона явилось толчком к изучению взаимосвязей и генетического полиморфизма целевых сортов на основе направленного анализа данных массового параллельного секвенирования (МПС).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве целевых генов для идентификации родства сортов Кефесия, Эким Кара и Крона были выбраны 10 генов хозяйственно ценных признаков (Е.Т. Ильницкая, М.В. Макаркина, 2016). Среди них три гена, определяющих устойчивость винограда к возбудителю милдью, гены Rpv3 и Rpv3–1, а также ген Rpv10, унаследованный от Vitis amurensis; *г*ен устойчивости к оидиуму (возбудитель Erysiphe necator (ранее Uncinula necator)) – Run2 (VVIn16); маркер p3-VvAGL11, который является наиболее полезным в селекционных программах на бессемянность; ген Rcg1, определяющий устойчивость к возбудителю бактериального рака (Agrobacterium sp.); маркер DXS7, ассоциируемый с синтезом монотерпенов, придающих вину «мускатный вкус»; маркер Vvib23, тесно связанный с геном, определяющим пол цветка; маркер VMC1E11 ассоциированный с началом созревания плодов и ген UFGT, кодирующий фермент антоцианидин 3-О-гликозилтрансферазу. Большое мультигенное семейство гликозилтрансфераз вовлечено в процессы конъюгации гормонов, вторичных метаболитов, биотических и абиотических гормонов, непосредственно воздействуя на клеточный гомеостаз. Экспрессия UFGT не происходит в неокрашенных сортах винограда из-за ретротранспозон-индуцированной мутации в кодирующем факторе транскрипции гена VvmybA1, что является молекулярной основой белой окраски винограда (Ford et al., 1998; Nicole et al., 2013).

Данные полной нуклеотидной последовательности, полученной методом МПС на приборе NovaSeq (Illumina, США) для сортов Кефесия (две биологические повторности), Эким Кара (одна биологическая повторность) и Крона (одна биологическая повторность), предоставили коллеги из ФГБУН ВННИИВиВ «Магарач» РАН в виде парно-концевых последовательностей в формате fastq. В качестве референсной последовательности был выбран геном Vitis vinifera cultivar PN40024 из базы данных NCBI.

Оценку качества прочтений проводили с помощью программы FastQC. Выравнивание прочтений на референсную последовательность осуществляли с помощью приложения Bowtie2, без мультикартирования (-k1). Обработка выходных данных проводилась программой samtools; однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), с дальнейшей фильтрацией, получали с помощью программы VarScan v. 2.3.9. Полученные результаты визуализировали в графическом геномном браузере IGV v. 2.8.2., в нём же проводили анализ полученных результатов (рис. 1).

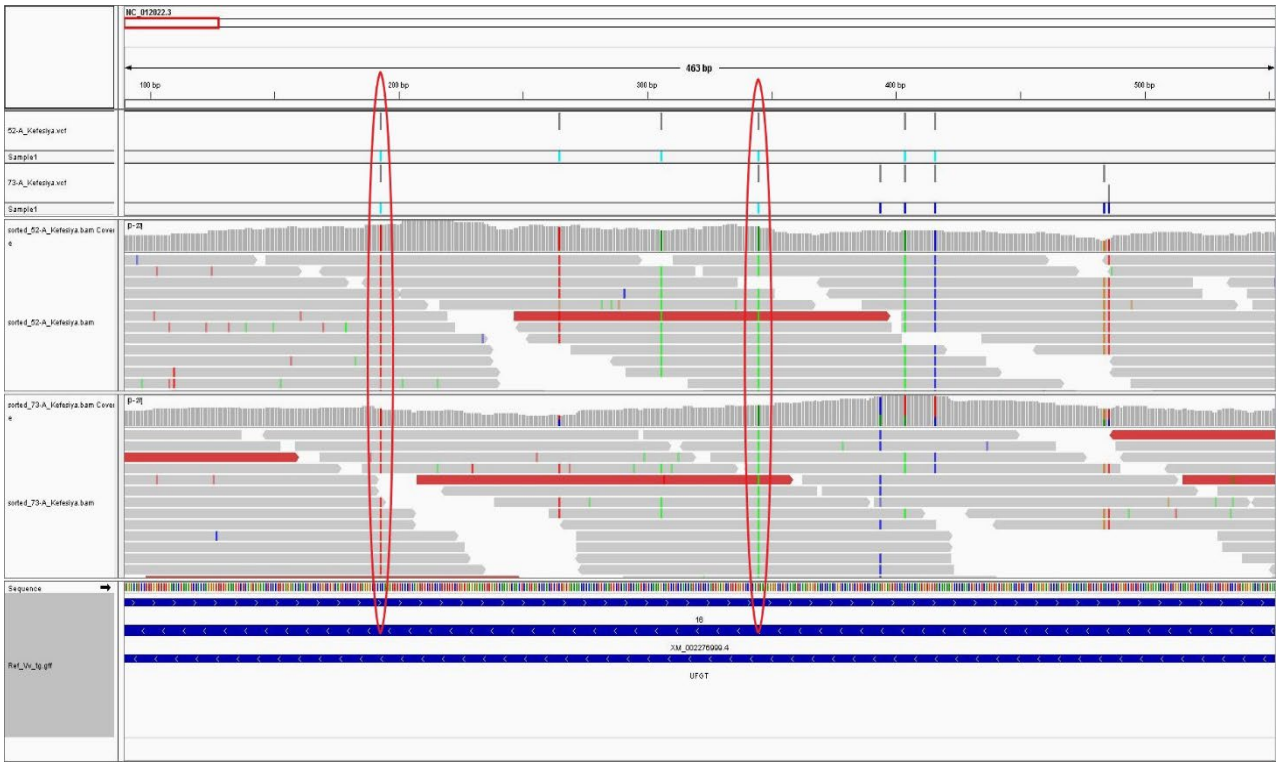


Рисунок 1. Пример анализа результатов поиска однонуклеотидных полиморфизмов в гене UFGT, в графическом геномном браузере IGV v. 2.8.2.

Растительный материал для выделения ДНК был получен из коллекции ФГБУН ВННИИВиВ «Магарач» РАН. Образец сорта Эким Кара был отобран в АО «Солнечная долина». Выделение нуклеиновых кислот проводили методом тотального осаждения, лизис с использованием цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) и депротеинизацией хлороформом.

Для подтверждения найденных с помощью анализа полного генома нуклеотидных замен было проведено секвенирование по Сенгеру. Дизайн праймеров был проведен таким образом, чтобы в зону расшифровки попали исследуемые однонуклеотидные замены. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционном буфере, в состав которого входили 3 мМ $MgCl_2$, 0,25 мМ смеси дНТФ, 2,5 единицы активности SynTaq ДНК-полимеразы (ООО «Синтол», Россия), концентрация праймеров F/R в реакционной смеси составляла 0,4 мкМ, при общем объёме реакционной смеси – 50 мкл. В реакцию брали 20 нг выделенной ДНК матрицы. Использовали следующую программу амплификации: 95 °С – 5 мин, (95 °С – 15 сек, 60 °С – 20 сек, 72 °С – 30 сек) 35 циклов, финальная элонгация 72 °С – 10 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа, достоверных отличий между сортами по исследуемым признакам обнаружено не было. Однако, однонуклеотидные полиморфизмы по отношению к референсному геному сорта Пино Нуар, приводящие к аминокислотным заменам, были обнаружены в трёх из десяти исследованных мишеней – генах UFGT, Rpv10(GF09–46) и маркере VMC1E11 (Таблица 1).

Таблица 1. Однонуклеотидные полиморфизмы в целевых генах, приводящие к аминокислотным заменам.

UFGT – NC_012022.3 – 16 chr – 2333144…2334712 – 1569 b.p. Anthocyanidin-3-O-glucosyltransferase 2 – Berry skin colour						
Позиция	Реф.	Изм.	Реф. кодон	Изм. кодон	Реф. аминокислота	Изм. аминокислота
253	G	C	GCU	CCU	Аланин	Пролин
873	A	G	AUA	GUA	Изолейцин	Валин
1225	A	T	UAU	UUU	Тирозин	Фенилаланин
1377	G	A	GGA	AGA	Глицин	Аргинин
VMC1E11 – NC_012011.3 – 9 chr – 13707950…13712118 – 4169 b.p. Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase Atsg10290 – Veraison						
Позиция	Реф.	Изм.	Реф. кодон	Изм. кодон	Реф. аминокислота	Изм. аминокислота
2215	G	A	GGA	AGA	Глицин	Аргини
3580	T	G	UUG	GUG	Лейцин	Валин
Rpv10(GF09–46) – NC_012024.3 – 18 chr – 769295…771986 – 2692 b.p. Subtilisin-like protease SBT1.4 – Mildew						
Позиция	Реф.	Изм.	Реф. кодон	Изм. кодон	Реф. аминокислота	Изм. аминокислота
319	G	A	GCC	ACC	Аланин	Треонин

Информация о биоинформатически выявленных полиморфизмах была проверена поиском по базам данных белков, а также по литературным данным.

VMC1E11, ДНК-маркер, ассоциированный с геном, отвечающим за начало созревания винограда, кодирует рецепторо-подобную серин / треонин-протеин киназу Atsg10290. Информация по найденным в этом маркере двум однонуклеотидным заменам, приводящим к заменам соответствующих аминокислот в белковых базах данных найдено не было, так как для Vitis vinifera данные об этом белке в белковых базах данных отсутствуют.

Продукт гена Rpv10(GF09–46) – субтилизин-подобная протеаза SBT1.4, является одним из ключевых компонентов, участвующих в механизме устойчивости к ложной мучнистой росе винограда (Милдью). В базе данных Uniprot, тип доказательства белка – выведен из гомолога, белок не кристаллизован (Uniprot [электронный ресурс]). Данных по найденным аминокислотным заменам в литературных источниках и белковых базах данных нет.

Ген UFGT – отвечает за окраску ягод винограда. В базе данных Uniprot тип доказательства белка – экспериментальные данные на уровне белка, белок кристаллизован. Фермент, кодируемый геном UFGT осуществляет реакцию гликозилирования с накоплением антоциановых пигментов, в присутствии необходимых цветовых факторов. Он участвует в образовании красных винных пигментов. Экспрессия UFGT в белом винограде не обнаружена (C.M. Ford et al, 1998). Замена в позиции 1225 описана в базе данных и является заменой на природный аминокислотный вариант. Замена в позиции 1377 так же описана в базе данных, в природном варианте по отношению к сорту Пино Нуар замена глицина на аргинин, что также подтверждено в нашем исследовании. Аминокислота находится в спиральной части вторичной структуры белка, влияние на каталитическую активность не описано. Замена в позиции 873 в базе данных также описана как замена на природный вариант аминокислоты. Замена в позиции 253 в базе данных Uniprot не описана, в кристаллизованном варианте в данной позиции находится аминокислота пролин, что также подтверждено в данном исследовании. В ферменте, кодируемом геном UFGT сорта Пино Нуар, в этой позиции находится аминокислота аланин. Влияние на каталитическую активность не описано.

Результаты секвенирования по Сенгеру для гена Rpv10(GF09–46) показали, что у всех исследуемых сортов в позиции 319, выявлен аденин, что подтверждает данные МПС. Помимо этого, в полученной в результате секвенирования по Сенгеру последовательности Пино Нуар, также оказался аденин, в отличии от референсной последовательности Пино Нуар, взятой из геномной базы данных.

Это говорит от том, что такой нуклеотидный вариант возможен для сорта Пино Нуар в качестве альтернативной аллели. Для гена, с которым ассоциирован ДНК-маркер VMC1E11, в позиции 2215 подтвердился альтернативный аденин, в двух сортах из трёх исследуемых, для третьего сорта не удалось получить качественную расшифровку результатов секвенирования. В позиции 3580 альтернативный гуанин подтвердился для всех трёх сортов, а также в полученной геномной последовательности сорта Пино Нуар, в указанной позиции был выявлен тимин, как и в референсном геноме Пино Нуар.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная цель данной работы заключалась в попытке выяснить являются ли сорта Кефесия, Эким Кара и Крона синонимами, а не обособленными сортами винограда. Исходя из проведенного анализа полученных результатов нельзя сказать, что указанные сорта не являются синонимами, достоверных отличий по исследуемым генам выявлено не было. Для того, чтобы повысить точность установления степени родства между этими сортами необходимо расширить спектр исследуемых генов и маркеров генов, а также увеличить количество биологических повторностей.

Был проведен биоинформатический анализ полногеномных данных для поиска различий между близкими сортами винограда, а также поиск однонуклеотидных полиморфизмов в генах, отвечающих за хозяйственно ценные признаки. Результаты биоинформатического анализа были подтверждены классическим секвенированием.

В дальнейшем планируется продолжить поиск однонуклеотидных полиморфизмов и других изменений в генах, с целью анализа их возможного влияния на уровень экспрессии генов, каталитическую активность ферментов, а также на фенотип Крымских сортов винограда.

ЛИТЕРАТУРА

Arroyo-Garcìa R., Ruiz-Garcia L., Bolling L. et al. Multiple origins of cultivated grapevine (Vitis vinifera L. ssp. sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms // Mol Ecol. – 2006; 15. – p. 3707–3714. doi: 10.1111/j. 1365–294X.2006.03049.x.

Carmona M.J., Chaib J., Martinez-Zapater J.M. et al. A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine // J Exp Bot. – 2008. 59. – p. 2579–2596. doi: 10.1093/jxb/ern160.

Emanuelli F., Lorenzi S., Grzeskowiak L. et al. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape // BMC Plant Biol. – 2013; 13. – 39 P. doi: 10.1186/1471–2229–13–39.

Ford C.M., Boss P.K., Hoj P.B. Cloning and characterization of Vitis vinifera UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize Bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo // Biol Chem. – 1998; 273(15). – p. 9224–9233. doi: 10.1074/jbc.273.15.9224.

Grassi F., Labra M., Imatio S. et al. Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis // Theor Appl Genet. – 2003; 107. – p. 1315–1320. doi: 10.1007/s00122–003–1321–1.

Nicole S., Barcaccia G., Erickson D.L. et al The coding region of the UFGT gene is a source of diagnostic SNP markers that allow single-locus DNA genotyping for the assessment of cultivar identity and ancestry in grapevine (Vitis vinifera L.) // BMC Res Notes. – 2013; 6. – 502 P. doi: 10.1186/1756–0500–6–502

This P., Lacombe T., Thomas R.M. Historical origins and genetic diversity of wine grapes // Trends Genet. – 2006; 22. – p. 511–519. doi: 10.1016/j.tig.2006.07.008.

Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В. Применение ДНК-маркеров в современных селекционно-генетических исследованиях винограда // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2016; 20(4). – с. 528–536 DOI 10.18699/VJ16.163.

Uniprot [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.uniprot.org/. – (Дата обращения 02.06.2020)

УДК 664.661

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Н.А. Лесникова[1], Т.В. Котова[1,2]

[1] Уральский государственный экономический университет, Екатеринбург, Россия
[2] Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, Кемерово, Россия

Повышение качества продукции хлебопекарной промышленности тесно связано с улучшением качества сырья, совершенствованием технологического процесса приготовления хлеба, с добавлением специальных добавок. На основании использования научных разработок и передового опыта предприятий по производству хлебобулочных изделий совершенствуются технологические схемы производства, оптимизируются основные параметры режима приготовления теста, проводятся работы по совершенствованию методов оценки качества продукции [1, 2].

Одним из основных направлений исследования улучшения качества хлеба и расширения ассортимента в отечественном хлебопечении является разработка и внедрение новых технологий при производстве хлеба с натуральными пищевыми добавками, которые значительно повышают биологическую ценность изделия. Особенно актуальными являются добавки, которые обогащают хлеб питательными для здоровья человека веществами и, в то же время, благоприятно влияют на биотехнологию производства хлебобулочных изделий. Одним из таких продуктов может быть мука из пшеничных зародышей. Это самая ценная и активная часть зерна; идеально сбалансированный комплекс разнообразных полезных веществ, витаминов, микроэлементов, имеющий оптимальное сочетание количественного и качественного составов [3]. Для совершенствования технологии приготовления хлеба из муки пшеничной с использованием муки зародышей пшеницы предложено применить молочную закваску. Данная закваска является не только биологическим улучшителем качества хлеба, но и оказывает благотворное влияние на организм человека. Использование кисломолочных полуфабрикатов позволит улучшить микрофлору кишечника, которая поможет значительно снизить интенсивность гнилостных процессов [4].

Работа проводилась в условиях ООО «Артемовский хлебокомбинат» Свердловской области и лаборатории Уральского государственного экономического университета. Проведение эксперимента заключалось в отработке технологии приготовления хлеба молочного «Уральский» из пшеничной муки первого сорта с добавлением муки зародышей пшеницы. Ранее экспериментально установлена оптимальная дозировка муки зародышей пшеницы в количестве 6 % от массы пшеничной муки при приготовлении хлеба. Но данный образец отличался более вязкими свойствами теста и пониженной формоустойчивостью подового хлеба в сравнении с образцом без муки зародышей пшеницы [5]. Поэтому для улучшения качества готовой продукции тесто замешивали на малой густой опаре с внесением 6 % муки зародышей пшеницы с использованием различных дозировок молочной закваски.

Для получения молочной закваски применяли чистую стартовую культуру молочнокислых бактерий BIOLAC, которая позволяет управлять процессами брожения теста. Отличительной особенностью культуры BIOLAC от других чистых культур молочнокислых бактерий, используемых в хлебопекарной промышленности, является то, что в её состав на ряду со штаммами гомоферментативных бактерий вида Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, входят штаммы мезофильных молочнокислых стрептококков (Lactococcus lactis) и штамм на основе болгарской палочки (Lactobacillus delbruckii subsp.bulgaricus). Состав культуры BIOLAC несёт за собой особенности в разведении молочной закваски, где питательной смесью является молочная суспензия, приготовленная из сухого обезжиренного молока. На первом этапе разводочного цикла пакет культуры BIOLAC растворяли в воде с температурой 30–35 ºС и оставляли на 20 минут. Затем вносили растворённый BIOLAC в ёмкость с разведённым в тёплой воде сухим молоком и оставляли в термостате при температуре 30–35 ºС на 12–16 часов до кислотности 12–16 град. На втором этапе в заквашенное молоко вводили муку пшеничную первого сорта, дрожжи прессованные и воду, выбраживали 3–4 часа до кислотности 6–10 град. На третьем заключительном этапе разводочного цикла в выброженную закваску добавляли питательную смесь из сухого обезжиренного молока, муки пшеничной первого сорта и воды, оставляли бродить в условиях цеха 3–4 часа до кислотности 6–10 град. Готовая закваска активно бродила и имела характерный молочный аромат.

Производственный цикл заключался в отборе 50 % молочной закваски на приготовление теста и возобновлении её питательной смесью такой же как в разводочном цикле и в том же объёме. Влажность закваски в пределах 65–70 %, время отбора через каждые 3–4 часа при кислотности 6–8 град.

Тесто для хлеба молочного «Уральский» с заменой 6 % муки пшеничной первого сорта на муку из пшеничных зародышей готовили без молочной закваски (контрольный образец) и с использованием 10 %, 20 %, 30 % молочной закваски к массе муки пшеничной первого сорта.

На рис. 1 показана зависимость объёма теста в процессе брожения от дозировки молочной закваски. Приведённые на рис. 1 данные показывают, что внесение 20 % молочной закваски в тесто благоприятно влияет на объём теста в процессе брожения. Возможно, это объясняется наличием в закваске мезофильных молочнокислых стрептококков (Lactococcus lactis), образующих в процессе брожения не только молочную кислоту, но и углекислый газ, принимающий участие в разрыхлении теста. Наименьший объём в процессе брожения наблюдается у образца с дозировкой молочной закваски 30 %, что, вероятно, связано с наибольшим образованием молочной и других кислот, способных тормозить развитие дрожжей (Saccharomyces cerevisiae) и угнетать процесс спиртового брожения, характерный для пшеничного теста [6].

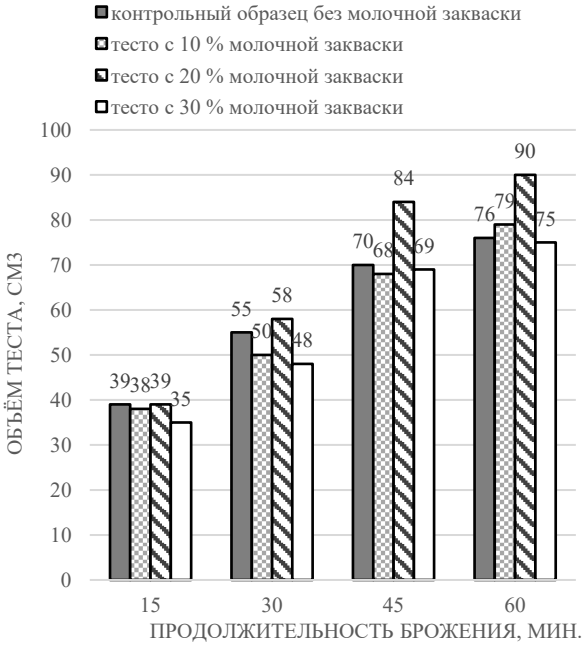


Рисунок 1 – Зависимость объема теста в процессе брожения от дозировки молочной закваски

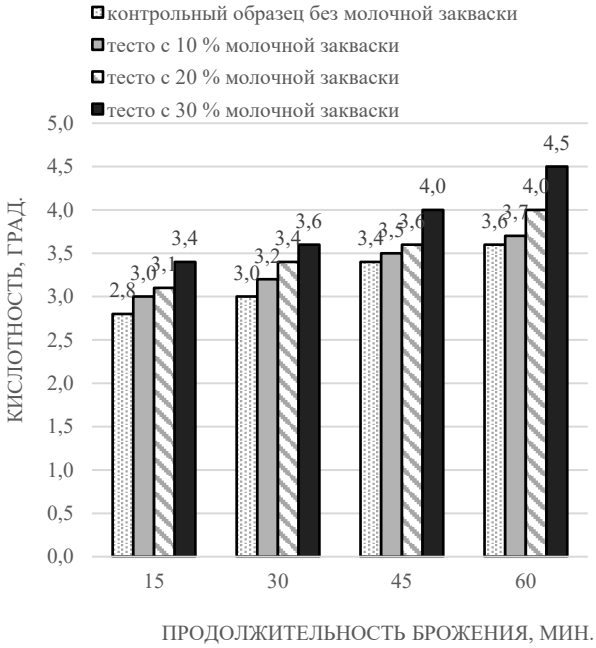


Рисунок 2 – Зависимость кислотности теста в процессе брожения от дозировки молочной закваски

На рис. 2 представлена зависимость кислотности теста в процессе брожения от дозировки молочной закваски. Из рис. 2 видно, что кислотность нарастает быстрее с увеличением дозировки молочной закваски в сравнении с контролем. Чем больше дозировка закваски, тем интенсивнее протекает процесс молочнокислого брожения с образованием молочной кислоты.

Реологические свойства теста с различной дозировкой молочной закваски определяли на структурометре СТ-1 в режиме № 1. График зависимости упругой деформации теста от дозировки молочной закваски представлен на рис. 3. Из рис. 3 следует, что с увеличением дозировки молочной закваски тесто получается более упругое в сравнении с контролем. Молочная и другие кислоты, выделяющиеся в процессе молочнокислого брожения, способствуют набуханию белков, инактивации действия протеолитических ферментов, укреплению клейковины и, тем самым, улучшению структурно-механических свойств теста [7].

Далее определяли органолептические и физико-химические показатели подового хлеба. Органолептические показатели готовых изделий представлены в табл. 1. Из описания, представленного в табл. 1 видно, что выпеченные образцы хлеба по внешнему виду и состоянию мякиша отвечают требованиям нормативной документации, характеризуются приятным вкусом и ароматом. Исключение составляет образец с использованием 30 % молочной закваски, обладающий выраженным кисломолочным запахом и вкусом, имеющий бледную корку.

Физико-химические показатели готовых изделий приведены в табл. 2. На рис. 4 показана зависимость формоустойчивости подового хлеба (H:D) от дозировки молочной закваски.

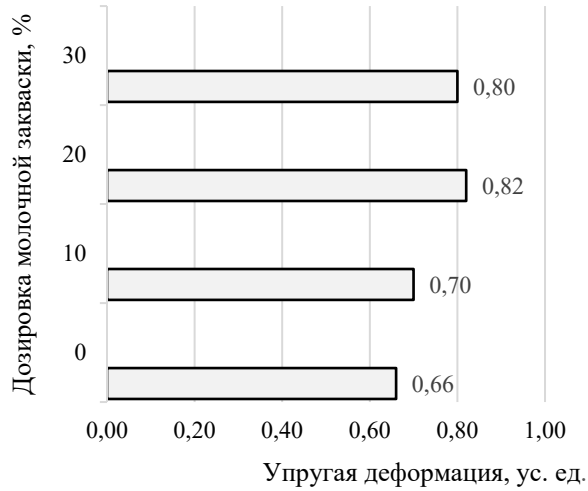


Рисунок 3 – Зависимость упругой деформации теста от дозировки молочной закваски

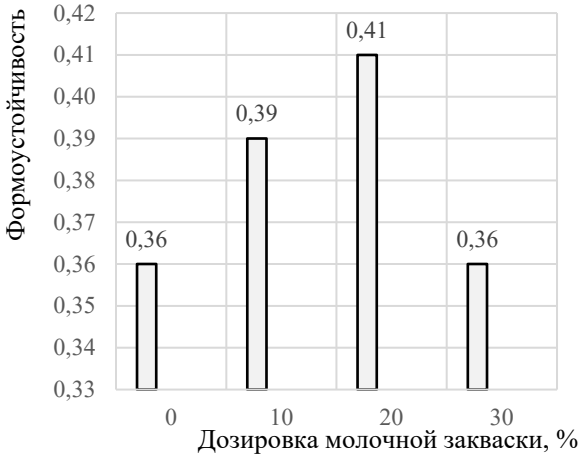


Рисунок 4 – Зависимость формоустойчивости подового хлеба от дозировки молочной закваски

Таблица 1 – Органолептические показатели готовых изделий

Показатели	Характеристика			
	контрольный образец	опытный образец 10 %	опытный образец 20 %	опытный образец 30 %
Цвет корки	темно-жёлтый с ярко окрашенной верхней коркой	жёлтый с ярко окрашенной верхней коркой		жёлтый с бледно окрашенной верхней коркой
Состояние поверхности корки	гладкая, с куполообразной верхней коркой			гладкая, с более плоской верхней коркой
Структура пористости	поры мелкие и средние, тонкостенные, равномерно распределены по всему мякишу			поры различной величины, тонкостенные, распределены неравномерно
Запах	свойственный пшеничному хлебу со слабым запахом злаков	свойственный пшеничному хлебу со слабым запахом топлёного молока		свойственный пшеничному хлебу с кисломолочным запахом
Вкус	свойственный пшеничному хлебу, без постороннего привкуса		свойственный пшеничному хлебу, с лёгким кисломолочным привкусом	свойственный пшеничному хлебу, слегка кислый

Таблица 2 – Физико-химические показатели готовых изделий

Показатели	Характеристика			
	контрольный образец	опытный образец 10 %	опытный образец 20 %	опытный образец 30 %
Влажность мякиша, %	45,0	45,2	44,9	45,1
Кислотность мякиша, град.	3,2	3,3	3,5	4,2
Пористость мякиша, %	74,0	74,5	75,5	72,5

Из данных табл. 2 и рис. 4 следует, что образец хлеба с использованием молочной закваски в количестве 20 % к массе муки отличается наибольшими пористостью и формоустойчивостью в сравнении с контрольным и другими образцами. Образец с применением 30 % закваски не соответствует требованиям ГОСТ 31805–2018 «Изделия хлебобулочные из пшеничной хлебопекарной муки. Общие технические условия» по показателю кислотность (4,2 град.). В соответствии с вышеуказанным нормативным документом этот показатель должен быть не более 4,0 град [8]. Поэтому оптимальной является биотехнология приготовления хлеба с внесением 6 % муки зародышей пшеницы от общего количества муки пшеничной первого сорта на малой густой опаре, с использованием молочной закваски в количестве 20 % к массе муки.

Использование муки зародышей пшеницы совместно с биоактивной молочной заквакой целесообразно в производстве хлеба из пшеничной муки, так как расширяется ассортимент хлеба, улучшаются его структурно-механические свойства, интенсифицируется технологический процесс, совершенствуются биотехнологические характеристики производства, повышаются потребительские свойства, особенно вкусовой и ароматический комплекс хлеба.

ЛИТЕРАТУРА

Гасиева, В.А. Способ повышения качества и безопасности хлебобулочных изделий из пшеничной муки путем совершенствования технологии хмелевой закваски / В.А. Гасиева, А.К. Тебоева, Я.С. Фарниева, И.К. Сатцаева // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2016. – № 2. – С. 118–124.

Фёдорова, Р.А. Исследование возможности снижения стресса путем введения в хлеб новых пищевых добавок / Р.А. Фёдорова, И.Е. Кострова // Известия Санкт-Петербургского государственного университета низкотемпературных и пищевых технологий. 2008. – № 2. – С. 19–20.

Рыбаков, Ю.С. Использование механоактивации зародышей пшеницы в производстве хлебобулочных изделий / Ю.С. Рыбаков, Н.А. Лесникова, Л.Ю. Лаврова, Е.Л. Борцова, Т.В. Мажаева // Аграрный вестник Урала. 2014. – № 4 (122). – С. 50–53.

Еникеев, Р.Р. Применение заквасок в хлебопечении / Р.Р. Еникеев, А.Г. Кашаев, А.В. Зимичев // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2010. – № 2–3. – С. 7–9.

Рыбаков, Ю.С. Расширение ассортимента хлебобулочных изделий за счет использования вторичных сырьевых ресурсов / Ю.С. Рыбаков, Н.А. Лесникова, Л.Ю. Лаврова, Е.Л. Борцова // Аграрный вестник Урала. 2016. – № 7 (149). – С. 51–56.

Гришина, Е.С. Совершенствование биотехнологии производства хлебобулочных изделий / Е.С. Гришина, Н.Б. Гаврилова, С.А. Коновалов // Вестник алтайской науки. 2015. – № 1 (23). – С. 359–363.

Овсянникова, Л.В. Влияние молочной кислоты на качество хлебобулочных изделий и потери микроэлементов при выпекании и хранении / Л.В. Овсянникова, Т.А. Кричковская // Food Science and Technology. 2016. – Т. 10. – № 2. – С. 37–41.

ГОСТ 31805–2018 «Изделия хлебобулочные из пшеничной хлебопекарной муки. Общие технические условия». – М.: Стандартинформ, 2018. – 16 с.

УДК 636.2:591.39:576.5

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОМАТИЧЕСКОГО КЛОНИРОВАНИЯ И РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Г.Н. Сингина[1], П.В. Сергиев[2], А.В. Лопухов[1], Е.Н. Шедова[1], Т.Е. Тарадайник[1]

[1] ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская обл., Подольск, Россия
[2] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Технология геномного редактирования в сочетании с репродуктивными биотехнологиями, такими как соматическое клонирование имеет широкие перспективы применения для решения задач, направленных на создание новых генотипов, в том числе с измененными хозяйственно-полезными признаками [1–2]. В частности, получение клонированных эмбрионов с использованием эмбриональных фибробластов редактированных в направлении нокаута гена β-лактоглобулина и их трасплантация животным-реципиентам ожидаемо позволит получить коров способных производить молоко с пониженными аллергенными свойствами [3].

В качестве инструментов геномного редактирования в работах на домашних животных находят применение системы ДНК-транспозонов и сайт-специфических нуклеаз, таких так ZFN, TALEN и системы на основе CRISPR/Cas9 [4]. ZNF и TALEN были с успехом использованы для редактирования геномов сельскохозяйственных животных, главным образом, на начальных этапах развития технологий на основе сайт-специфических нуклеаз. Однако вследствие высокой трудоемкости конструирования рекомбинантных векторов были практически полностью вытеснены системами на основе CRISPR/Cas9 [5,6]. В отличие от ZNF и TALEN, сборка которых требует несколько последовательных шагов клонирования, в основе конструирования систем CRISPR/Cas9 лежит использование короткого олигомера. Благодаря своей высокой эффективности, а также простоте и малой трудоемкости, система CRISPR/Cas9 находит все более широкое применение в технологии геномного редактирования [4].

Получение потомства млекопитающих с использованием технологий геномного редактирования требует проведения модификации на уровне генеративных клеток. При этом наиболее предпочтительным способ привнесения CRISPR/Cas9-обусловленных модификаций является SCNT (технология переноса ядер соматических клеток, somatic cell nuclear transfer) с использованием генетически модифицированных клеток. Метод SCNT позволяет проводить отбор мутантных клеток перед началом дорогостоящих экспериментов на животных и гарантировать получение потомства с запланированными модификациями генов. Однако в мировой практике эффективность соматического клонирования с точки зрения получения редактированных эмбрионов высокого качества остается низкой, высока частота аномального эмбрионального развития, а рожденное потомство менее жизнеспособно, что сдерживает внедрение данной технологии в практическое животноводство. К лимитирующим факторам следует отнести неадекватность условий получения клонированных эмбрионов, а также процедуры выращивания клонов индивидуальных соматических клеток.

В этой связи в рамках представляемой работы была поставлена цель оценить эффективность клонирования с использованием эмбриональных фибробластов крупного рогатого скота с точки зрения параметров активации и объединения энуклеированного ооцита (цитопласта) и перенесенного в его перивителлиновое пространство соматической клетки (кариопласта). Изучали влияние продолжительности воздействия цитоплазмы ооцита на донорское ядро до активации и повторного электрослияния цитопласта и кариопласта на формирование клонированных эмбрионов и их развитие до стадии бластоцисты. Кроме того, проведено моделирование условий получение культуры индивидуальных эмбриональных фибробластов с нокаутом гена β-лактоглобулина.

Для SCNT выделенные post mortem ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) созревали в среде ТС-199, дополненной 10 % фетальной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл фолликулостимулирующего и 10 мкг/мл лютеинизирующего гормонов. Через 20–24 ч созревания ОКК обрабатывали 0,1 % раствором гиалуронидазы, механически удаляли кумулюсные клетки и отбирали ооциты с первым полярным тельцем. Эмбриональные фибробласты культивировали до сформированного монослоя, контактно ингибировали в течение 2 сут и готовили к процедуре переноса в энуклеированный ооцит в виде суспензии. Микрохирургические манипуляции (группами по 15–20 ооцитов) проводились в каплях среды объемом 20 мкл, нанесенных на дно чашек Петри, покрытых слоем легкого минерального масла

с использованием инвертированного микроскопе совмещенного с микроманипуляционной техникой Narishige (Япония).

В процессе реконструирования ооциты фокусировали с помощью удерживающей пипетки в поле зрения микроскопа в положении позволяющего четко визуализировать первого полярного тельца (ППТ) в перивителлиновом пространстве ооцита на 1 или 5 часов условного циферблата. Микропипетку для биопсии (внутренний диаметр 13–15 мкм) подводили вплотную к оболочке ооцитов, прокалывали зону пеллюцида в месте локализации ППТ и хромосомы яйцеклетки удаляли в слепую аспирацией ППТ и 10–20 % прилежащей цитоплазмы. Соматическую клетку вводили в перивителлиновое пространство зафиксированного ооцита микропипеткой, используемой ранее для биопсии ППТ, через отверстие, сформированное в процессе энуклеации. Для объединения ооцитов и перенесенных в их перивителлиновое пространство клеток применяли два последовательных прямоугольных импульса постоянного тока при напряжении 35 В продолжительностью 20 мкс (однократно или в случае отсутствия признаков объединения клеток двукратно). Полученные цитогибриды активировали иономицином через 1,0 или 2,0 ч после слияния и культивировали до стадии бластоцисты. Доля раздробившихся ооцитов не различалась между экспериментальными группами и варьировала от 60,7 до 70,4 %. Также не различалась доля развития бластоцист, когда использовалось однократное или двукратное слияние (соответственно 29,4 и 22,8 % соответственно). При интервале между слиянием и активацией 1,0 ч выход бластоцист составлял 17,4 %. Удлинение продолжительности указанного периода до 2,0 ч достоверно повышало этот показатель ($p < 0,05$). Таким образом, показано, что эффективность клонирования зависит от интервала между слиянием и активацией. Оптимальным параметром применительно к описанному нами протоколу и использованным соматическим клеткам является 2 ч. Также очевидно, что повторное электрослияние энуклеированного ооцита и соматической клетки не оказывает отрицательного воздействия на качество образовавшихся цитогибридов, а, следовательно, может быть использовано в рамках процедуры получения клонированных эмбрионов у крупного рогатого скота.

Для получения индивидуальных колоний с нокаутом гена β-лактоглобулина проведена электропорация эмбриональных фибробластов коровы ранних пассажей смесью плазмид, кодирующих Cas9 и гРНК, направленных на инактивацию генов PAEP и LOC100848610. После сортировки общий пул клеток, экспрессирующих гены компонентов системы CRISPR/Cas9, растили в течение 2–3 суток, после чего клетки высевали индивидуально в 96-ти или 48-ми луночные планшеты и культивировали до формирования ими монослоя. Доля жизнеспособных колоний на один 96-луночный планшет составляла в среднем 21.4 % и была выше, чем в случае их культивирования в 48-ми луночном планшете (15.4 %). Рекомендовано использовать 96-луночные планшеты в последующей работе по получению культуры индивидуальных фибробластов с нокаутом гена β-лактоглобулина. Одна часть каждой полученной колонии после однократного пересева была заморожена для возможного дальнейшего использования при получении клонированных эмбрионов, а другую часть для выделения ДНК и анализа на наличие соответствующих мутаций.

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

ЛИТЕРАТУРА

Salamone D., Barañao L., Santos C., et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow // Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 124, N2. P. 469–472.

Wang J., Yang P., Tang B., et al. Expression and characterization of bioactive recombinant human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows // Jornal of Dairy Science. 2008. Vol. 91, N12. P. 4466–4476.

Yu S., Luo J., Song Z., et al. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle // Cell Research. 2011. 21. P. 1638–1640.

Зиновьева Н.А., Волкова Н.А., Багиров В.А. Геномное редактирование: современное состояние исследований и применение в животноводстве // Биотехнология. 2018. Т.34, № 3. С. 9–22.

Zhou W., Wan Y., Guo R., et al. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. PLoS ONE. 2017; 12(10):e0186056.

Cong L., Ran F.A., Cox D., et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. Science. 2013; 339(6121):819–23.

УДК 615.241.3 + 615.275.4 + 615.322 + 612.084

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ФИТОЭКДИСТЕРОИД СОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ШПИНАТА

В.А. Шипелин, Н.А. Петров, С.Н. Зорин, С.Х. Сото, В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время подверженность человека психоэмоциональному стрессу, синдрому хронической усталости, физическим и умственным нагрузкам делает актуальным использование в питании специализированных пищевых продуктов с доказанным адаптогенным действием, имеющих в своем составе функциональные пищевые ингредиенты (ФПИ), способствующие формированию неспецифической резистентности организма при отсутствии недостатков, имеющихся у фармакологических препаратов [0]. Уже не одно десятилетие шпинат, традиционно известный как пищевой продукт богатый витаминами и минералами [0], изучается с позиции его нейропротекторных [0], анксиолитических [0], антиоксидантных, антипролиферативных и противовоспалительных свойств [0]. Такой широкий спектр биологической активности в значительной степени связывают с наличием в составе шпината флавоноидов и фитоэкдистероидов. Так, химический состав шпината представлен каротиноидами, фенольными соединениями – кверцетином и кемпферолом, производными патулетина, спинацетина, спинатозида, жасеидина и флавона, а также различными фенольными кислотами, в первую очередь феруловой и п-кумаровой [0]. Применение технологий концентрирования и ультрафильтрации низкомолекулярных фракций позволяет достигать высоких концентраций биологически активных веществ в составе ФПИ. Целью настоящего исследования являлась оценка неспецифической резистентности организма в свете проявления фармакологических эффектов, вызванных сочетанным воздействием фитоэкдистероидов и других минорных БАВ, входящих в состав разработанного ФПИ из шпината в условиях иммобилизационного психоэмоциального стресса у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплекс фитоэкдистероидов и полифенолов экстрагировали из сухого порошка листьев замороженного шпината огородного (Spinacia oleracea L.) при температуре 25 °С водным раствором 40 % этилового спирта при соотношении порошок: экстрагент 1:39. После центрифугирования отбирали супернатант, подвергали микро- и ультрафильтрации; выделяли низкомолекулярную фракцию и концентрировали на установке обратного осмоса, с последующим удалением щавелевой кислоты хроматографией низкого давления. Полученный продукт лиофильно высушивали. Общее содержание полифенолов в полученном ФПИ составило 403±4,0 мг/г, 20Е-гидроксиэкдизона – 12,1±1,2 мг/г.

В 25-дневном эксперименте оценивали влияние разработанного ФПИ на адаптогенный потенциал крыс, подверженных иммобилизационному стрессу. Использовали 36 крыс-самцов линии Вистар с исходной массой тела 80±5 г, рандомизированно (по массе тела и результатам теста «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) согласно [0]) распределенных на 3 группы: К1 (n=12), К2 (n=12) и Г3 (n=12). В течение эксперимента крысы групп К1 и К2 получали стандартный полусинтетический рацион, а в рацион животных группы Г3 вносили ФПИ в количестве 0,05 г./100 г. корма. Для формирования психоэмоционального стресса животных из групп К2 и Г3 подвергали ежедневной принудительной иммобилизации в прозрачных домиках-фиксаторах длительностью 40 мин. Поведение и краткосрочную память животных оценивали, используя тест «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ) на оборудовании и по методам, описанным ранее [0]. Обучение проводили на 14 сутки эксперимента, проверку обучения (закрепление памятного следа) на 15 сутки эксперимента. Динамику уровня тревожности крыс на 23 сутки по сравнению с началом эксперимента оценивали, используя тест ПКЛ. На 24 сутки эксперимента животные групп К2 и Г3 подвергались истощающей иммобилизации в течение 3 часов. Сразу по окончании истощающей иммобилизации крыс вместе с животными группы К1 помещали в обменные клетки для сбора суточной мочи. Через 24 часа животных, депривированных голодом на протяжении ночи, выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом, отбирали кровь на антикоагулянт и выделяли плазму.

На протяжении эксперимента крысы получали воду и рационы в режиме неограниченного доступа. Учет поедаемости корма проводили через день. Массу тела животных регистрировали на 5, 7, 12, 18 и 25 день. Животных содержали по 2 крысы в клетке в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20–26 °С, относительная влажность 30–60 %, 12 часовой цикл освещения).

По окончании эксперимента в моче животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли содержание норадреналина, адреналина и дофамина. В плазме крови крыс на автоматическом биохимическом анализаторе изучали содержание показателей белкового обмена (общий белок, альбумин, глобулины), липидного обмена (общий холестерин, холестерин ЛПВП, холестерин ЛПНП, триглицериды), минерального обмена (фосфор) и функционального состояния печени (общий билирубин, АЛТ, АСТ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На адаптацию лабораторных грызунов к стрессу влияют индивидуальные различия особей. Воздействие одного и того же стрессорного фактора может приводить к возникновению различных ответных реакций у животных одной популяции, поэтому для рандомизированного разделения по группам после семидневного карантина была проведена оценка состояния тревожности и двигательной активности каждой особи в условиях переменной стрессогенности в тесте ПКЛ. На протяжении эксперимента общее состояние всех животных по внешнему виду, качеству шерстного покрова, потреблению воды и поведению при ежедневном осмотре было удовлетворительным. Среднее потребление корма животными группы К2, подверженных ежедневной иммобилизации, было достоверно ниже по сравнению с контрольной группой. Добавка ФПИ в группе Г3 стабилизировала потребление корма на уровне тенденции, тем не менее достоверные различия с группами К1 и К2 отсутствовали (Рис. 1).

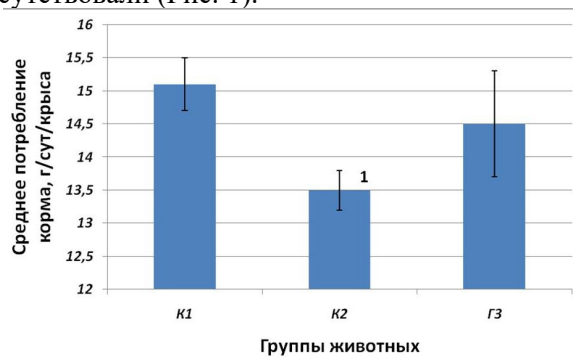


Рис. 1. Среднее потребление корма животными, г/сутки/крыса
Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1, p<0,05

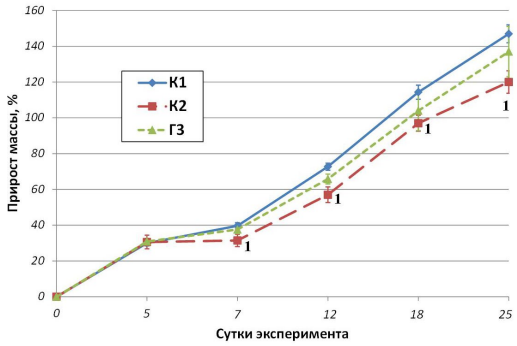


Рис. 2. Прирост массы тела крыс, %.
Примечания: * – различия достоверны относительно группы К1; # – отличия достоверны относительно группы Г3

Уже на 7 сутки эксперимента выявлено достоверное снижение прироста массы тела животных группы К2 относительно животных контрольной группы К1 (Рис. 2). Отставание в приросте массы тела животных группы К2 отмечалось на протяжении всего эксперимента, и, по-видимому, связано как с меньшим потреблением корма, так и с ежедневным стрессорным воздействием иммобилизацией. Достоверных различий прироста массы тела животных группы Г3 относительно обеих контрольных групп выявлено не было. Потребление ФПИ в определенной степени снижало негативные последствия иммобилизационного стресса.

По результатам тестирования крыс в тесте ПКЛ (Рис. 3) в начале эксперимента (тест 1) было установлено, что при первом тестировании отсутствовали достоверные различия двигательной активности и временных интервалов, проведенных животными в открытых и закрытых рукавах лабиринта между всеми сравниваемыми группами. На 23 сутки (тест 2) кормления поведение животных в ПКЛ изменилось: показатель пройденной дистанции отличался достоверно для всех групп по сравнению с первым тестированием (Рис. 3В). Животные контрольной группы К2 и животные, получавшие ФПИ (Г3), подверженные ежедневной иммобилизации, имели повышенную двигательную активность во время второго тестирования, что выражалось достоверно большей пройденной дистанцией по сравнению с животными контрольной группы К1 (Рис. 3В).

Животные, получавшие ФПИ, отличались также наибольшей среди всех групп поисковой активностью, что проявлялось в достоверном увеличении количества переходов по сравнению с контрольной группой К1 (Рис. 3Г). Животные опытной группы Г3, получавшие ФПИ, проводили достоверно меньше времени в закрытых рукавах лабиринта по сравнению с первым тестированием (Рис. 3Б). Более того, при втором тесте эти крысы проводили достоверно меньше времени в закрытых рукавах и, соответственно, больше времени в открытых рукавах (Рис. 3А) по сравнению с животными контрольной группы К2, тем самым демонстрируя анксиолитический эффект.

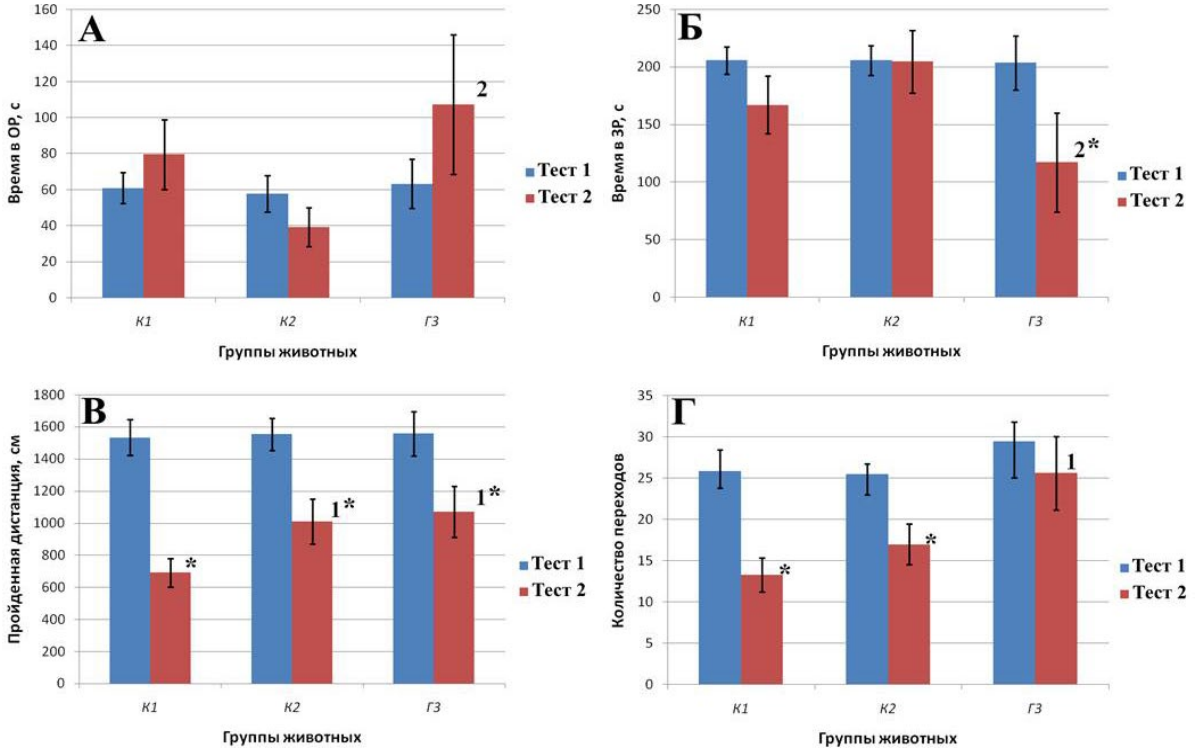


Рис. 3. Результаты тестирования крыс в приподнятом крестообразном лабиринте
Примечания: Тест 1 – до начала кормления экспериментальными рационами; Тест 2 – на 23 сутки эксперимента; * – различия достоверны по сравнению с 1 тестом; 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1; 2 – различия достоверны по сравнению с группой К2; 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 (везде $p<0,05$)

Таблица 1. Биохимические показатели плазмы крови крыс по окончании эксперимента

Показатель, ммоль/л	К1	К2	Г3
ЛПВП	0,58±0,03	0,66±0,08	0,60±0,05
ЛПНП	0,17±0,01	0,15±0,01	0,15±0,02
Триглицериды	0,68±0,05	0,84±0,09	0,46±0,05[1,2]
Холестерин	1,24±0,02	1,31±0,07	1,24±0,09
АЛТ	45,5±1,6	42,5±2,5	48,7±3,4
АСТ	119,6±4,7	116,5±9,0	132±0,6
Биллирубин общий	2,96±0,14	3,57±0,30[1]	2,65±0,13[2,3]
Глобулин	19,3±0,4	17,9±0,4[1]	19,3±0,8
Альбумин	24,4±0,2	24,8±0,3	24,1±0,7
Белок общий	43,6±0,5	42,5±0,6	43,4±1,5
Фосфор	1,95±0,04	1,92±0,06	1,89±0,07

Примечание: надстрочные числовые индексы – номера групп, различие с которыми достоверно, $p<0,05$; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартатаминотрансфераза

Процессы сохранения краткосрочной памяти, а также когнитивные функции оценивали в тесте УРПИ. Обучение проводили на 14 сутки эксперимента – 1 день тестирования, проверку обучения (памятного следа) на 15 сутки эксперимента – 2 день. На вторые сутки тестирования краткосрочной памяти достоверных отличий между группами не выявлено (данные не показаны). Полученный результат свидетельствует об отсутствии как отрицательного, так и положительного влияния выбранных стрессорных воздействий на обучаемость и память животных в тесте УРПИ.

Анализ биохимических показателей крови (Таблица 1) у животных группы Г3, получавших ФПИ, показал достоверное снижение уровня триглицеридов крови по сравнению с группами К1 и К2, что свидетельствует о гиполипидемическом эффекте разработанного ФПИ на фоне стресса иммобилизацией.

У животных, стрессированных иммобилизацией (К2), выявлено достоверное увеличение общего билирубина, а потребление разработанного ФПИ полностью и достоверно нормализовало данный показатель у животных опытной группы Г3 даже ниже контрольных значений. По мимо этого, на фоне иммобилизации у животных не получавших ФПИ, достоверно снизились уровни глобулинов как по сравнению с интактными животными К2, так и с получавшими добавку.

Изучение содержания дофамина, норадреналина и адреналина в суточной моче показало, что ежедневная иммобилизация приводит к достоверному снижению содержания биогенных аминов по сравнению с показателями у интактных животных контрольной группы К1 (Таблица 2), причем потребление животными диеты, обогащенной фитоэкдистероидами в составе ФПИ, оказывало положительное влияние на баланс изученных активаторов стресса, нормализуя их экскрецию с мочой.

Таблица 2. Концентрация катехоламинов в суточной моче животных на 25 сутки эксперимента

Показатель, мкг/сутки	К1	К2	Г3
Норадреналин	2,4±0,3	1,2±0,2[1]	1,8±0,3
Адреналин	2,6±0,4	1,3±0,3[1]	1,7±0,4
Дофамин	5,9±0,7	2,6±0,6[1]	4,1±0,5
Примечание: надстрочные числовые индексы – номера групп, различие с которыми достоверно, $p<0,05$			

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных, можно заключить, что 23-дневное потребление комплекса полифенолов и фитоэкдистероидов в составе ФПИ из листьев шпината в условиях иммобилизационного психоэмоциального стресса у крыс, способствует увеличению исследовательской активности животных на фоне анксиолитического действия, положительно влияет на липогенез и клиренс билирубина, а также нормализует экскрецию биогенных аминов с мочой. Таким образом, адаптогенные свойства разработанного из листьев шпината ФПИ, делают его перспективным компонентом специализированных пищевых продуктов для определенных категорий лиц, подверженных психоэмоциональному стрессу.

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

ЛИТЕРАТУРА

Ray A., Gulati K., Anand R. Stress, adaptogens and their evaluation: an overview // J. Pharm. Rep. 2016. Vol. 1, № 2. Article ID 1000110.

Roberts J.L., Moreau R. Functional properties of spinach (Spinacia oleracea L.) phytochemicals and bioactives // Food Funct. 2016. Vol. 7, № 8. P. 3337–53.

Cartford M.C., Gemma C., Bickford P.C. Eighteen-month-old Fischer 344 rats fed a spinach-enriched diet show improved delay classical eyeblink conditioning and reduced expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNFbeta in the cerebellum // J Neurosci. 2002. Vol. 22, № 14. P. 5813–6.

Son H., Jung S., Shin J.H., et al. Anti-stress and anti-depressive effects of spinach extracts on a chronic stress-induced depression mouse model through lowering blood corticosterone and increasing brain glutamate and glutamine levels // J. Clin. Med. 2018. Vol. 7, № 11. P. E406.

Lomnitski L., Bergman M., Nyska A., Ben-Shaul V., Grossman S. Composition, efficacy, and safety of spinach extracts // Nutr Cancer. 2003. Vol. 46, № 2. P.222–31.

Fiorito S., Preziuso F., Epifano F., et al. Novel biologically active principles from spinach, goji and quinoa // Food Chem. 2019. Vol. 276. P.262–5.

Mzhelskaya K.V., Shipelin V.A., Shumakova A.A., et al. Effects of quercetin on the neuromotor function and behavioral responses of Wistar and Zucker rats fed a high-fat and high-carbohydrate diet // Behav Brain Res. 2020. Vol. 378. P. 112270.

УДК 664.681.1:633.112

НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В РЕЦЕПТУРЕ ОБОГАЩЕННОГО ХЛЕБА

Т.Н. Тертычная[1], Л.И. Лыткина.[2], Д.В. Коптев.[2], С.Ф. Яковлева[2]

[1] Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Воронеж, Россия

[2] Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

В последние годы в нашей стране произошли глубокие качественные изменения структуры питания населения. В результате технологической обработки, использования неполноценного с точки зрения химического состава пищевого сырья, организм человека не получает необходимое количество незаменимых для его качественной жизнедеятельности компонентов. Одним из путей ликвидации дефицита в этом отношении и повышения стрессоустойчивости организма человека к различным неблагоприятным факторам окружающей среды является регулярное употребление продуктов питания с улучшенным химическим составом [1].

Объектом изучения стала природная биологически активная добавка – фотоавтотрофная микроводоросль Scenedesmus с богатым сбалансированным биохимическим составом, отличающимся высоким содержанием белка (более 60 % ее биомассы), включающего почти все аминокислоты, β-каротина, витаминов и минеральных веществ [2]. Специфика метаболизма микроводоросле. й, связанная с продуцированием метаболитов с ценными для человека свойствами, сделала их важным объектом биотехнологии. Микроводоросль была получена при культивировании в биореакторе с применением импеллерных мешалок для культивирования биомассы микроводоросле [3].

В рецептуре хлеба использовались отруби пшеничные пищевые диетические, масло подсолнечное дезодорированное. Способ приготовления теста – на сухой подкисляющей пищевой закваске «Цитросол». За.готовки ра. скла. дыва. ли в формы, пре. два. рите. льно сма. за. нные ра. стите. льным ма. слом, на. пра. вляли на ра. сстойку на 50–60 мин, выпе. ка. ли при те. мпе. ра. туре 220–230 °С в те. че. ние 50±5 мин. Вла.жность те. ста 47,5 %. Методами математического планирования эксперимента установлено, что оптимальными дозировками внесения в рецептуру хлеба из смеси ржаной обдирной и пшеничной муки 1 сорта порошка из микроводоросли Scenedesmus являются 4,0–9,0 % к массе муки в тесте. Благодаря наличию в добавке растительного происхождения пищевых волокон, витаминов, макро- и микроэлементов новый продукт может быть отнесен к группе изделий функционального назначения.

Содержание белков в хлебе, приготовленном по разработанным рецептурам, 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.

Разработка рецептур хлебобулочных и мучных кондитерских изделий с использованием перспективных фитообогатителей представляет большой теоретический и практический интерес и создает предпосылки к расширению ассортимента, улучшению качества, повышению пищевой и биологической ценности готовой продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Научное обеспечение производства микроводорослей и их применение в технологии мучных кондитерских изделий функционального назначения: монография / Т.Н. Тертычная, А.А Шевцов, Е.А. Шабунина, И.В. Мажулина. – Воронеж: ВГАУ, 2019. – 191 с.

2. Тертычная Т.Н. Обогащение хлеба биологически активными компонентами микроводоросли / Т.Н. Тертычная, Л.И. Лыткина, Д.В. Коптев // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3 (30). – С. 249.

3. Патент РФ № 2650804. Аппарат для культивирования автотрофных микроорганизмов 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). / А.В. Дранников, А.А. Шевцов, Д.В. Коптев и [др.]; заявитель и патентообладатель Воронеж. гос. университет инженерных технологий». – № 2017108749; заявл. 16.03.2017; опублик. 17.04.2018. Бюл. № 11.

УДК 640

СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ КЕРАТИНОЛИТИЧЕСКИХ ЭКЗОПРОТЕАЗ МИКРОМИЦЕТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

С.Н. Тиморшина, А.А. Осмоловский

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

В настоящее время разработка и развитие методов утилизации трудноразлагаемых отходов стали приоритетными направлениями исследований современной науки. В связи с глобальным ростом населения Земли ежегодно увеличивается нагрузка на отрасли сельского хозяйства, в том числе на животноводство, что ведет к образованию большого количества отходов, содержащих трудноразлагаемые фибриллярные белки, например, такие, как кератин. На данный момент в мире ежегодно образуется более 40 млн тонн свободных куриных перьев, являющихся основным побочным продуктом птицеводства и более чем на 80 % состоящих из кератина (Tesfaye et al., 2017). К основным методам утилизации отходов агропромышленного комплекса относятся захоранивание, сжигание и химический гидролиз. Эти подходы приводят к образованию веществ, загрязняющих окружающую среду, а также не являются экономически выгодными. Переход к биодеградации как основному пути переработки трудноразлагаемых белковых материалов позволит не только снизить негативное влияние на окружающую среду, но также использовать соединения, образующиеся в результате ферментативного гидролиза, для производства продуктов с высокой добавленной стоимостью. Вторичное использование продуктов переработки кератина (аминокислот и олигопептидов) возможно в качестве компонентов удобрений, кормовых добавок, субстрата для производства биотоплива, а также компонентов косметических и медицинских препаратов (Hassan et al., 2020).

Таким образом, изучение кератиназ и кератинолитических микроорганизмов является важной задачей современной биотехнологии. Однако стоит отметить, что на данный момент, несмотря на широкую изученность бактериальных протеаз, гидролизующих кератин, кератинолитические ферменты микромицетного происхождения остаются малоизучены, в то время как многие штаммы микроскопических грибов известны в качестве продуцентов широкого спектра протеаз (de Souza et al., 2015). В связи с этим данная работа была посвящена отбору непатогенных или условно патогенных кератинолитических штаммов микромицетов, применение которых возможно в биодеградации отходов животноводства, а также в качестве продуцентов кератиназ, востребованных в медицине, фармацевтике и других отраслях экономики.

Объектами исследования были микромицеты отдела Ascomycota, выделенные из различных почв и растительных субстратов (лесных подстилок и листового опада) на территориях средней полосы России, Камчатки и Вьетнама и полученные из коллекций кафедры микробиологии и кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Всего в работе были использованы 32 штамма микроскопических грибов, относящихся к родам Aspergillus, Penicillium, Ulocladium, Paecilomyces, Cladosporium и Chaetomium. Скрининг проводили с использованием полуселективных агаризованных сред, следующего состава (%): KH_2PO_4 – 0.05, $MgSO_4$ – 0.025, пептон – 0.5, агар – 1.5.

Таблица 1. Энзиматические индексы микромицетов на средах с различными белковыми субстратами

Культура	$EI_{каз.}$	$EI_{кер.}$	$EI_{жел.}$
Aspergillus aculeatus A2	1.00	1.00	1.00
A. alliaceus 7dN1	1.06	1.00	1.09
A. amstelodami A6	1.59	2.00	1.48
A. candidus A4	1.55	1.00	1.54
A. chevalieri 1197	1.09	1.13	1.14
A. chevalieri 1205	1.10	1.13	1.15
A. crustosus A29	1.44	1.00	1.66
A. fischeri A11	1.03	1.06	1.00
A. flavus 4059	1.30	1.00	1.49
A. giganteus A16	1.95	1.39	2.21
A. janus A17	1.33	1.00	1.55
A. niger 443	1.00	1.00	1.00
A. niger 3640	1.00	1.00	1.00
A. niger GS	1.00	1.00	1.00
A. ochraceus 247	1.29	1.25	1.77
A. raperi A13	1.20	1.00	1.43
A. sydowii 1	1.15	1.12	1.37
A. sydowii 21	1.18	1.08	2.29
A. unguis 16	1.89	1.00	1.90
A. unguis 2167	1.64	1.00	1.73
A. ustus 1	1.13	1.00	1.43
A. ustus A9	1.11	1.00	1.56
Chaetomium globosum 2382	1.00	1.00	1.00
Cladosporium sphaerospermum 1779	2.18	1.33	2.57
C. sphaerospermum 3118	1.94	1.10	2.80
Paecilomyces varoitii 444	1.00	1.00	1.00
P. varoitii 2228	1.00	1.00	1.00
Penicillium aurantiogriseum 20	1.66	1.00	1.77
P. chrysogenum 1	1.31	1.00	1.49
P. chrysogenum 24	1.40	1.00	1.70
P. expansum 31	1.50	1.00	1.00
Ulocladium botrytis 4037	1.09	1.00	1.11

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

В качестве основного источника углерода и азота в среды добавляли 1.0 % казеина по Хаммерштайну или желатина, или 0.5 % кератина. На 7 сутки культивирования при 28 °С негидролизованные белки осаждали 10 % раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и проводили измерения диаметров колоний и зон гидролиза. Энзиматические индексы (EI) рассчитывали по формуле: $EI = d_2/d_1$, где d_1 – диаметр колонии (мм), а d_2 – диаметр зоны гидролиза (мм). Для культур микромицетов с наибольшими рассчитанными энзиматическими индексами также были получены данные при культивировании штаммов на аналогичных средах с фибрином и эластином.

В таблице 1 представлены результаты скрининга микроорганизмов при росте на трёх агаризованных средах, содержащих казеин ($EI_{каз.}$), кератин ($EI_{кер.}$) и желатин ($EI_{жел.}$). Как видно из полученных данных некоторые представители родов Aspergillus, Cladosporium и Penicillium являются активными продуцентами экзопротеаз, что согласуется с данными литературы и делает их интересными объектами для исследований в области биотехнологии, однако лишь 10 культур микромицетов из 32 показали возможность к гидролизу кератина.

Для следующего этапа исследования были отобраны штаммы с высокими значениями энзиматических индексов на всех трёх средах, а именно Aspergillus giganteus A16, A. amstelodami A6, A. ochraceus 247 и Cladosporium sphaerospermum 1779 (рис. 1). Для данных культур также были рассчитаны энзиматические индексы на средах с фибрином ($EI_{фибр.}$) и эластином ($EI_{эл.}$). Соотношения энзиматических индексов отобранных культур на средах с различными белковыми субстратами к энзиматическим индексам на среде с казеином приведены в таблице 2.

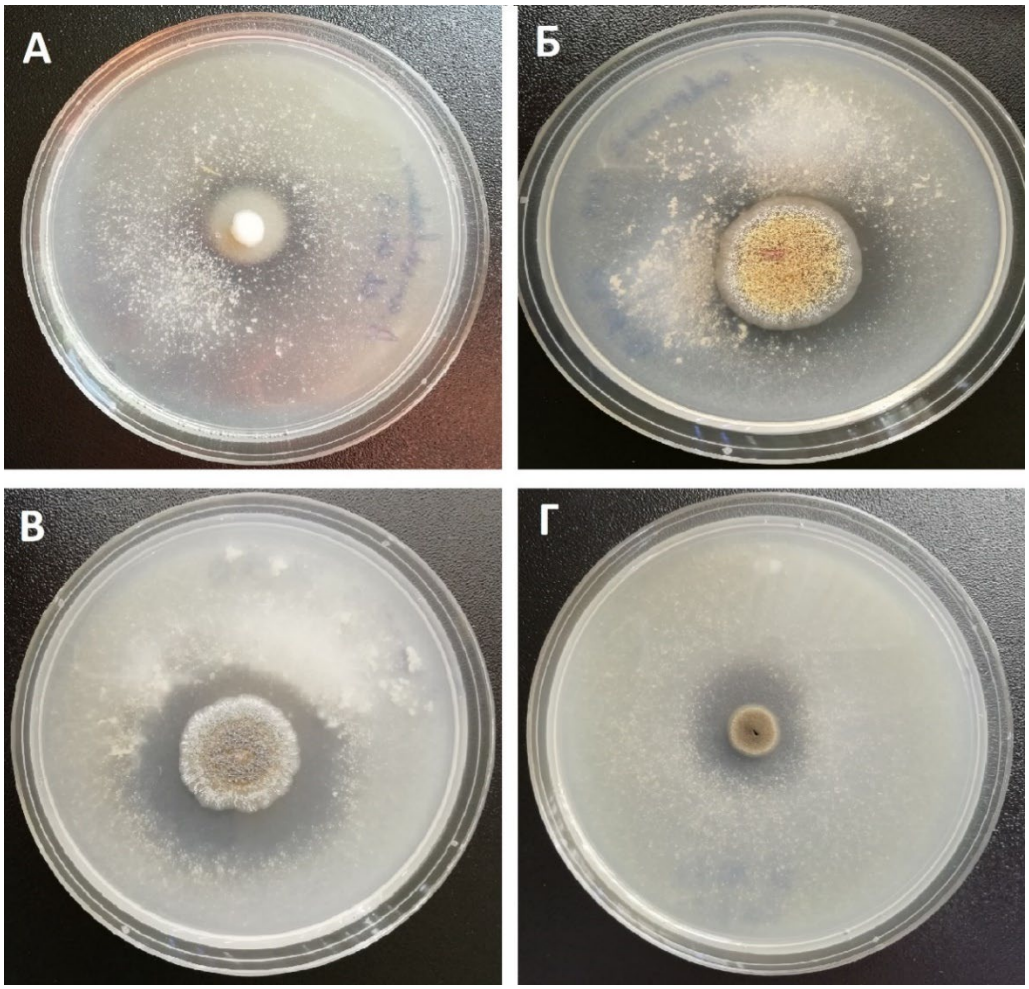


Рис. 1. Микромицеты Aspergillus amstelodami A6 (А), A. ochraceus 247 (Б), A. giganteus A16 (В) и Cladosporium sphaerospermum 1779 (Г) на среде с казеином.

Таблица 2. Соотношения энзиматических индексов микромицетов Aspergillus giganteus A16, A. amstelodami A6, A. ochraceus 247 и Cladosporium sphaerospermum 1779

Культура	$EI_{кер.}$ / $EI_{каз.}$	$EI_{жел.}$ / $EI_{каз.}$	$EI_{фибр.}$ / $EI_{каз.}$	$EI_{эл.}$ / $EI_{каз.}$
A. amstelodami A6	1.26	0.93	1.28	0.70
A. giganteus A16	0.71	1.13	0.75	0.58
A. ochraceus 247	0.97	1.37	1.05	0.90
C. sphaerospermum 1779	0.61	1.18	0.72	0.67

Как видно из таблицы 2, соотношения энзиматических индексов на среде с эластином к энзиматическим индексам на среде с казеином ($EI_{эл.}$ / $EI_{каз.}$) у всех исследуемых микромицетов меньше единицы, что может свидетельствовать о низкой специфичности экзопротеаз данных культур по отношению к эластину. Низкий уровень эластолитической активности обычно указывает на низкую степень патогенности микроорганизмов (Kothary et al., 1984; Tamura et al., 1992; Khosravi et al., 2012), что является необходимым свойством для промышленных продуцентов.

Протеолитические ферменты, секретируемые A. amstelodami A6, по-видимому, обладают высоким сродством к кератину (1.26) и фибрину (1.28), но не к желатину (0.93), являющимся частично гидролизованным коллагеном, что может говорить о специфичности этих протеаз по отношению к фибриллярным белкам. Ферменты других отобранных штаммов микромицетов не показали высокой специфичности к фибриллярным белкам, однако абсолютные значения их энзиматических индексов позволяют предположить о существовании у них потенциала в качестве продуцентов кератиназ.

Таким образом, в результате данной работы были отобраны штаммы микроскопических грибов, способных к синтезу экзопротеаз с кератинолитической активностью, что делает их перспективными объектами для изучения в области биотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА:

De Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases //Brazilian Journal of Microbiology. 2015. V. 46. № 2. P. 337–346.

Hassan M.A., Abol-Fotouh D., Omer A.M., Tamer T.M., Abbas E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review //International Journal of Biological Macromolecules. 2020. V. 154. P. 567–583.

Khosravi A.R., Mahdavi Omran S., Shokri H., Lotfi A., Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis //Journal de mycologie medicale. 2012. V. 22. № 2. P. 167–172.

Kothary M.H., Chase T. Jr., Macmillan J.D. Correlation of elastase production by some strains of Aspergillus fumigatus with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice //Infection and Immunity. 1984. V. 43. № 1. P. 320–325.

Tamura Y., Suzuki S., Sawada T. Role of elastase as a virulence factor in experimental Pseudomonas aeruginosa infection in mice //Microbial pathogenesis. 1992. V. 12. № 3. P. 237–244.

Tesfaye T., Sithole B., Ramjugernath D. Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route – current status and future prospects //Clean Technologies and Environmental Policy. 2017. V. 19. № 10. P. 2363–2378.

УДК 664.843

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГРИБА ASPERGILLUS ORYZAE В ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТАЦИИ КАПУСТЫ

Е.И. Кипрушкина, А.А. Сергеева, В.В. Бакланова, В.А. Максимчук

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Большинство пищевых технологий основаны на биокаталитических методах конверсии сельскохозяйственного сырья. Ферментативный катализ субстратов обеспечивает радикальное изменение функциональных свойств и фракционного состава сырья на различных этапах его переработки, расширяет возможности совершенствования традиционных пищевых технологий, а также создания новых видов пищевых продуктов [1, 2].

Ферментированные продукты в настоящее время переживают повторное открытие, что обусловлено новыми достоверными данными об их пользе для здоровья. И если кисломолочные продукты, пиво и вино были предметом интенсивных исследований, ферментированные пищевые продукты на растительной основе, даже при их широком потреблении (квашеная капуста, кимчи, чайный гриб, или комбуча), получили меньше научного внимания. Кимчи – популярный гарнир в Корее, представляющий собой продукт кислой ферментации молочнокислыми бактериями, является из них наиболее изученным, и его потребление ассоциируется с многочисленными преимуществами для здоровья, включая профилактику рака и ожирения, снижение уровня холестерина и укрепление иммунной системы [3, 4].

Микробиота в настоящее время является одной из самых востребованных областей научных и медицинских исследований и оказывает заметное влияние на человека во время гомеостаза и заболеваний. В дополнение к общепризнанным последствиям питания для здоровья пищеварительной системы (например, дисбактериоза) и благополучия, в настоящее время имеются доказательства воздействия ферментированных продуктов питания и напитков на общее состояние здоровья, а именно, их значение для баланса кишечной микробиоты и функциональности мозга. Обнаружено, что употребление в пищу активных пробиотиков, особенно содержащихся в ферментированных пищевых продуктах, значительно улучшает баланс кишечной проницаемости и барьерную функцию [5–9].

Ферментированные продукты – это продукты, наделенные определенными функциональными свойствами, в процессе ферментации которых задействованы молочнокислые микроорганизмы, естественным образом существующие на поверхности сырья или добавленные (заквасочные культуры, дрожжи и т. д.).

Мицелиальные грибы Aspergillus oryzae имеют широкое применение в пищевой промышленности, т. к. не обладают патогенными и токсическими свойствами. Биосинтетическая способность по отношению к амилолитическим и протеолитическим ферментам, характерная для представителей микромицетов Aspergillus oryzae, используется в пищевой промышленности в виде ферментных препаратов при переработке растительного и животного сырья, в производстве соевого соуса, в спиртовом и пивоваренном производствах и др. [10].

A. oryzae как чистая микробиальная культура может быть рекомендована для осуществления биотехнологического процесса ферментации продуктов растительного происхождения, что повысит ассортимент квашеных овощей. Живые микроорганизмы применяются с намерением использовать их микробный метаболизм и улучшить качество ферментированной капусты. Aspergillus oryzae содержит пектиназы и целлюлазы, катализирующие разрушение 1,4 – гликозидных связей в молекуле целлюлозы с образованием набора олигосахаридов различной степени полимеризации вплоть до мономера – глюкозы. Поэтому коджи может быть рекомендован к использованию при квашении капусты, так как способен ускорять процесс квашения капусты с усилением вкусовых качеств.

Производство квашеной (ферментированной) капусты высокого качества является очень сложной задачей, поскольку существуют некоторые риски, связанные с протеканием процесса ферментации. Для положительного развития процесса необходимо, чтобы питательные вещества, содержащиеся в капусте, были сразу доступны молочнокислым бактериям. В этом случае нежелательная микрофлора не будет иметь потенциала для развития и, при накоплении значительных количеств молочной кислоты, будет уничтожена. Именно поэтому необходимо, чтобы процесс ферментации начинался как можно скорее с роста молочнокислых бактерий и, следовательно, с

быстрого уменьшения pH для предотвращения роста патогенных микроорганизмов. При этом должны сохраняться максимально анаэробные условия, так как если в процессе ферментации произойдет попадание воздуха, то это приведет к обесцвечиванию поверхности капусты, образованию неприятного аромата и понижению микробиологического качества продукта.

В свежей капусте содержится очень низкое количество молочнокислых бактерий, но этого количества обычно бывает достаточно для того, чтобы процесс ферментации начался. При этом, необходимо, чтобы происходило быстрое уменьшение pH в начале процесса, для того чтобы добиться быстрого увеличения кислотности, которая доминирует над нежелательной микрофлорой и подавляет её рост.

Добавочная культура – плесневые грибки Aspergillus oryzae вносится в сырье в начале процесса ферментации для улучшения качества ферментируемого сырья и обеспечения направленного проведения молочнокислого брожения. A. oryzae в течение ферментации дегидрирует клетки за счет ферментов пектиназы и целлюлазы и высвобождает клеточное содержимое. В качестве чистой культуры-инокулята при проведении экспериментов был выбран препарат коджи – Тане в виде порошкообразных спор Aspergillus oryzae, произведенные фирмой Vision Brewing (Япония), штамм ATCC 11866. Для ферментации капусты выбран сорт белокочанной капусты Белорусская, выращиваемый в Ленинградской области. Сорт относится к холодостойким, светолюбивым овощным культурам с высоким содержанием сахаров. Использовали два варианта приготовления сырья: способ традиционного сухого посола с использованием эпифитной микрофлоры сырья. Состав контрольного варианта состоит из капусты и соли.

Способ традиционного сухого посола с внесением дополнительной культуры при закваске A. oryzae, в количестве 0,1 % сухого концентрата от массы капусты.

Квашеную капусту солят с помощью сухого посола. Соль помогает предотвратить возможное размягчение сырья капусты и уменьшить развитие нежелательной микрофлоры. Так же она оказывает влияние на аромат конечного продукта. Обычно концентрация соли в ферментированной капусте находится в диапазоне 2–3 %. Однако сегодня потребители предпочитают более низкую концентрацию соли в своей еде, в основном из-за внимательного отношения к своему здоровью, именно поэтому все внимание сейчас сконцентрировано на том, чтобы производить ферментированную капусту с низким содержанием соли. Ученые доказали, что в процессе молочнокислого брожения, возможно, понизить концентрацию NaCl от 0,5 до 2,0 % без потери микробиологического или сенсорного качества готового продукта [4]. Также квашеная капуста может быть успешно произведена с использованием минеральной соли в низких концентрациях.

В связи с этим в эксперименте была использована минеральная соль в соответствии с ГОСТ Р 51574–2018 в количестве 1,5 % от общей массы продукта.

Добавочная культура – плесневые грибки Aspergillus oryzae должна быть внесена в сырье обязательно до начала процесса ферментации для улучшения качества ферментируемого сырья и обеспечения направленного проведения молочнокислого брожения. Ферментация капусты разными способами посола была проведена при температуре 20 °C в течение 7 сут. Сенсорный анализ качества ферментированного продукта проводился в соответствии с ГОСТом Р 53972–2010 «Овощи соленые и квашеные. Общие технические условия.» Определение кислотности биопродуктов в пересчете на молочную кислоту проводилось по ГОСТу 25555.0–82 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения титруемой кислотности (с Изменениями № 1, 2)».

Качество конечного продукта зависит от условий ферментации (рисунок 1). Ниже оценки по консистенции, аромату и вкусу получил биопродукт, приготовленный по традиционному способу посола с использованием эпифитной микрофлоры сырья. Контрольный вариант посола обладал слабо выраженным ароматом, но с преобладающим хрустом при раскусывании. Ферментированная капуста с использованием A. oryzae имела ярко-выраженный аромат, вкус и послевкусие, более мягкую структуру. Вероятно, размягчение квашеной капусты являлось следствием более интенсивного процесса образования молочной кислоты в результате дополнительной деструкции растительных клеток в присутствии активных пектиназ и целлюлаз, продуцируемых вносимой культуры A. oryzae.

Стоит отметить вкусовые характеристики квашеной капусты 2-го и 3-го способов посола: каждый из вариантов имеет ярко выраженный вкус квашеной капусты и послевкусие, соответствующее содержащимся компонентам.

В качестве физико-химического показателя определялась массовая доля титруемых кислот в расчете на молочную кислоту. Результаты титрования представлены на диаграмме (рисунок 2).

Органолептические исследования подтверждаются результатами физико-химических показателей, указанных на диаграмме. Анализ различных видов посола показал, что процесс квашения зависит от используемого вспомогательного сырья. По стандарту массовая доля титруемых кислот в пересчете на молочную кислоту должна находиться в интервале 0,7–1,5 %. На основе проведенных исследований можно утверждать, что квашеная капуста с использованием A. oryzae достигла нужной кислотности на 4-ые сутки квашения. A. oryzae ускоряет процесс ферментации, что приводит к сокращению временных затрат на производство квашеной капусты

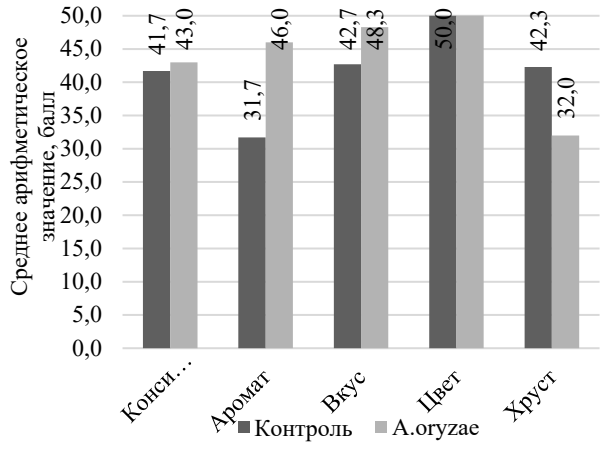


Рисунок 1 – Органолептическая оценка качества ферментированной капусты

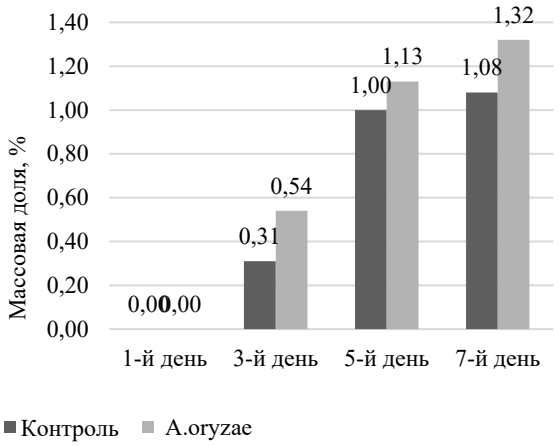


Рисунок 2 – Накопление титруемых кислот при ферментации капусты в пересчете на молочную кислоту

По результатам исследования возможности применения гриба Aspergillus oryzae в технологии ферментации капусты получены следующие выводы:

– при культивировании свежей белокочанной капусты мицелиальной массой Aspergillus oryzae при квашении происходит резкое нарастание молочной кислоты, что приводит к быстрому снижению pH и гарантированному процессу ферментации;

– использование A. oryzae в качестве дополнительной культуры при закваске ускоряет процесс ферментации, и квашеная капуста может быть произведена за более короткий период, по сравнению с естественной ферментацией;

– качественные признаки ферментированного продукта, а также его технологические, пищевые и функциональные параметры могут быть улучшены при применении Aspergillus oryzae.

ЛИТЕРАТУРА

Римарева Л.В., Серба Е.М., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Игнатова Н.И. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности // Вопр. питания. 2017. Т. 86. № 5. С. 62–74.

Серба Е.М., и др. Научно-практические аспекты получения БАД на основе конверсии вторичных биоресурсов // Хранение и переработка сельхозсырья. 2015. № 2. С. 44–50.

Шишлова Е.С., и др. Основы ферментирования белокочанной капусты // Вестник ВГУИТ. 2018. Т. 80. № 2. С. 242–248.

Redzepi R., Zilber D. The Noma Guide to Fermentation // Hardcover. – 2018. – 443 c.

Claesson M J, Jeffery I B, Conde S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. Nature, 2012; 488: 178–184.

Stilling R, Dinan T, Cryan J. Microbial genes, brain&behavior – epigenetic regulation of the gut-brain axis. Genes, Brain and Behav. 2013; 13: 69–86

Шагина В.Н., Блохина И.И., Серов И.С. Влияние кишечной микрофлоры на здоровье человека // Молодой ученый, 2019. № 28. – С. 200–203.

Taira, T.; Dietary polyphenols increase fecal mucin and immunoglobulin a and ameliorate the disturbance in gut microbiota caused by a high fat diet. J. Clin. Biochem. Nutr. 2015, 57, 212–216.

Кипрушкина Е.И., и др.Значение фактора питания в формировании кишечного микробиома // Вестник MAX, 2020. № 2. – С. 52–60.

Gibbons, John et al. «Эволюционный отпечаток одомашнивания на вариации генома и функции мицелиального гриба Aspergillus oryzae». Современная биология. 22: 1403–1409 (2016)., 2016.

УДК 631.811.98

СТИМУЛИРОВАНИЕ СИНТЕЗА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ PAL-АССОЦИИРОВАННЫЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПУТЬ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (TRÍTICUM AESTÍVUM L.)

П.В. Федураев, Л.Н. Скрыпник, А.В. Рябова, А.В. Пунгин, Э.В. Токупова, П.В. Масленников

Балтийский федеральный университет им. И. Канта», Калининград, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Ароматические аминокислоты, такие как фенилаланин и тирозин, являющиеся конечными звеньями шикиматного пути, выступают в качестве субстратов для фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) и играют для данного фермента роль своеобразных эффекторов, стимулируя синтез вторичных метаболитов [1].

PAL является первым и ключевым регуляторным ферментом метаболизма фенилпропаноидов. Фактически, он осуществляет «переключение» от первичного метаболизма растения ко вторичному метаболизму, приводя к образованию широкого спектра вторичных метаболитов с фенилпропаноидным скелетом. PAL может активироваться при различных воздействиях окружающей среды, таких как механическое повреждение тканей растений, повышенные концентрации тяжелых металлов в почве, а также дефицит основных компонентов питания растений. Это делает его отличным индуктором, запускающим реакции направленные на увеличение устойчивости растений [2].

Изучение особенностей метаболизма растений является естественным шагом на пути к улучшению их роста и производительности, в частности злаковых растений и пшеницы, что неизменно приводит к повышению качества и количества с/х продукции. Стоит отметить, что проблема устойчивости наиболее часто рассматривается в контексте выращивания сельскохозяйственных монокультур. Подобный способ выращивания сопряжен с повышенной нагрузкой на растения со стороны как биотических, так и абиотических факторов [3].

Таким образом целью настоящего работы является оценка роли фенилаланина и тирозина на PAL ассоциированные метаболические пути, и, в частности, на биосинтез и накопление фенольных соединений, в том числе и лигнина у растений пшеницы (Triticum aestivum L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Семена пшеницы (Triticum aestivum L.) сорта “Ванек” были получены на посевной станции Министерства сельского хозяйства Калининградской области. Для стерилизации семена инкубировали в течение 2 ч в 10 % растворе NaClO, затем растительный материал 10 раз промывали дистиллированной водой. Для проведения лабораторных экспериментов семена Triticum aestivumL. первоначально проращивали в дистиллированной воде. Проростки в возрасте 3–4 дней пересаживали на перлит, пропитанный 50 % питательным раствором Хогланда. Растения выращивали под люминесцентными лампами при плотности потоков квантов ФАР 200 мкмоль/($м^2$ с), 16-часовом фотопериоде и температуре +25 °C.

С целью исследования раздельного влияния тирозина и фенилаланина на метаболические процессы растений, использовались растворы указанных веществ в концентрациях: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 мкМ. Растения в возрасте 30 дней (соответствует 4, 5 стадии по шкале Фики) переносили на экспериментальные растворы (с добавлением соответствующих аминокислот). Растения экспонировались на указанных субстратах с добавлением в действующих веществ в течение 1, 2, 4 и 8 часов. В качестве контроля использовали 50 % раствор Хогланда. Для дальнейших экспериментов использовались листья растений.

Подготовка растительного экстракта для анализа фенольных соединений: 0,1–0,2 г растительного материала гомогенизировали с 10 мл 96 %-ного раствора этанола, центрифугировали при 4500g в течение 30 мин. Супернатант использовали для анализа суммы фенольных соединений. Общее содержание фенольных соединений определяли методом Фолина–Чокальтеу. Кратко, экстракт смешивали с 0,2 М реагента Фолина–Чокальтеу и инкубировали в течение 10 мин в условиях затенения. После этого в каждую пробирку добавляли 6,75 % раствора карбоната натрия (Na_2 CO_3), после чего пробирки инкубировали в течение 30 мин, также в условиях затенения. Поглощение полученной смеси измеряли при 765 нм (UV-3600, Shimadzu, Киото, Япония). Концентрационное значение суммы фенольных соединений представлено в виде мкг эквивалента галловой кислоты на грамм сухой массы (мкг ЭГК $г^{-1}$) [4].

Тотальную РНК из эксперементальных образцов пшеницы экстрагировали с использованием тризола (“Invitrogen”, США) [5]. Для синтеза кДНК пробы РНК обрабатывали ДНКазой 1 (“Thermo Scientific”, США). Синтез одноцепочечной кДНК из тотальной РНК проводили с использованием набора Revert Aid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Thermo Scientific”, США). Проводили спектрофотометрическое измерение концентрации кДНК на спектрофотометре SmartSpec Plus Spectrophotometer (“BioRad”, США).

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на амплификаторе CFX96™ Real-Time System (“Bio-Rad”, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBRGreen I (“Invitrogen”, США). Праймеры были сконструированы с использованием аннотированного генома пшеницы, депонированного в GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Для оценки относительных уровней экспрессии анализируемых генов использовали метод ΔΔCt [6].

Было показано, что экспрессия PAL6, C4H1, 4CL1, C3H1, в частности, имеет достоверную корреляцию с содержанием лигнина [7], а гены CHS, CHI, F3H и DFR достоверно коррелируют с уровнем фенольных соединений растений пшеницы [8], по этой причине данные гены были выбраны для анализа. Ген ARF (ADP-ribosylation factor) и ген кодирующий актин были использованы в качестве генов сравнения.

Эксперименты выполнены как минимум в трех повторностях. Уровень значимости был установлен при p-значении $p \leq 0,05$. Данные были проанализированы с использованием SigmaPlot 12.3 (Systat Software GmbH, Эркрат, Германия). Тест Шапиро – Уилкса использовался для проверки нормальности. Кроме того, экспериментальные данные были проверены на однородность дисперсии. Эти тесты позволили нам использовать ANOVA, который был представлен для каждого фактора отдельно (время воздействия, концентрация аминокислоты). Результаты были представлены как среднее ± стандартное отклонение (при n=3). Графики были подготовлены с использованием OriginPro 9 (OriginLab Corporation, Нортгемптон, Массачусетс, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень фенольных соединений является отличным маркером потребления фенилаланина и тирозина, которые могут выступать в качестве специфических предшественников в биосинтезе ряда простых фенольных компонентов клетки, а также довольно сложных конденсированных форм флавоноидов. В экспериментальных растениях оценивался суммарный уровень фенольных соединений (рис. 1).

Перенос опытных растений в питательные среды с добавлением фенилаланина привел к значительному увеличению уровня фенольных соединений уже при концентрации активного вещества 100 мкМ, и эта тенденция сохранялась на протяжении всего периода воздействия (в течение 8 ч.). При переносе растений на питательную среду, содержащую тирозин, не было значительного увеличения уровня фенольных соединений в условиях низкой концентрации предшественника (100, 200 мкМ).

Однако стоит отметить, что изменение накопления фенольных соединений с увеличением концентрации фенилаланина и тирозина в питательной среде от 500 мкМ до 800 мкМ оказалось незначительным. Еще одной общей тенденцией в накоплении фенольных соединений было достижение своеобразного концентрационного плато, через 4 ч воздействия на растения экспериментальных растворов.

Одним из результатов этих испытаний была идентификация определенного времени и оптимальных концентраций введенных прекурсоров. Таким образом, обработка растений 500 мкМ раствором фенилаланина и тирозина в течение 4 ч приводила к значительному ($p \leq 0,05$) увеличению (по сравнению с другими экспериментальными вариантами) оцениваемых соединений.

Уровень экспрессии ряда генов оценивали у растений, экспонированных на питательной среде, обогащенных аминокислотами, ферментативные продукты которых участвуют, с одной стороны, в синтезе лигнина (PAL6, C4H1, 4CL1, C3H1), и ответственны за образование флавоноидов (CHS, CHI, F3H, DFR), с другой. Уровень экспрессии генов анализировали с помощью qRT-PCR в листьях образцов пшеницы, инкубированных на среде, содержащая 500 мкМ фенилаланина и тирозина соответственно, в течение 4 ч (рис. 2).

Присутствие как фенилаланина, так и тирозина в питательной среде приводило к значительному изменению в накоплении транскриптов гена PAL6. Стоит отметить, что этот ген кодирует фермент, который потенциально катализирует превращение обеих аминокислот (фенилаланин и тирозин), играя ключевую роль в последующей регуляции биосинтеза фенилпропаноидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участие ароматических протеиногенных аминокислот в PAL/TAL ассоциированных метаболических путях, приводит к увеличению биосинтеза вторичных соединений фенольной природы. Такие изменения можно рассматривать с двух точек зрения; с одной стороны, вторичные соединения являются характерными индукторами устойчивости растений, а с другой стороны, усиление потока через ключевой фермент фенилпропаноидного пути позволяет накапливать физиологически активные вещества, необходимые для потребления человеком.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kong, J.Q. Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering. RSC Adv. 2015, 5, 62587–62603.
2. Cheng, G.W.; Breen, P.J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 1991, 116, 865–869.
3. Lien, G.; Hardaker, J.B.; Flaten, O. Risk and economic sustainability of crop farming systems. Agric. Syst. 2007, 94, 541–552.
4. Feduraev, P.; Chupakhina, G.; Maslennikov, P.; Tacenko, N.; Skrypnik, L. Variation in Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from Rumex crispus L. and Rumex obtusifolius L. at Different Growth Stages. Antioxidants 2019, 8, 237.
5. Ermilova E.V., Zalutskaya Zh. M., Nikitin M.M., Lapina T.V., Fernández E. Regulation by light of ammonium transport systems in Chlamydomonas reinhardtii // Plant Cell Environ. 2010. V. 33. P. 1049–1056.
6. Livak K.J., Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
7. Nguyen, T.N., Son, S., Jordan, M.C., Levin, D.B., & Ayele, B.T. Lignin biosynthesis in wheat (Triticum aestivum L.): its response to waterlogging and association with hormonal levels. BMC plant biology, 2016, 16(1), 28.
8. Hong, M.J., Yoon, Y.H., Kim, D.S., Kim, S.H., Kang, S.Y., Kim, D. Y… & Kim, J.B. Phenotypic and molecular responses of wheat (Triticum aestivum L.) to chronic gamma irradiation. Journal of Agricultural Science and Technology, 2018, 20(1), 167–178.

УДК: 636.087.7/8.

НАПРАВЛЕННОСТЬ И ИНТЕНСИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В РУБЦЕ ОВЕЦ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В РАЦИОН ПРИРОДНЫХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК С РАЗЛИЧНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Ю.П Фомичев, Н.В. Боголюбова

ФНЦ животноводства ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы. Россия

В пищеварительной системе жвачных первостепенную роль играет рубец, который рассматривается как бродильная камера с подвижными стенками. В рубце за счет ферментов микроорганизмов удовлетворяется до 80 % потребности в энергии, 30–50 % в белке, в значительной мере в макро- и микроэлементах и витаминах, в основном, группы В. В нем переваривается от 50 до 70 % сырой клетчатки. Имеется тесная связь между химическим составом и питательностью кормового субстрата, численностью микроорганизмов рубца и продуктивностью животных. Субстраты с высоким содержанием азота, протеина, жира, БЭВ оказывают больший стимулирующий эффект на рост и размножение микрофлоры рубца по сравнению с субстратами с меньшим содержанием этих нутриентов. Субстратный состав рациона также оказывает влияние на состояние среды рубца. Оптимальной для размножения микроорганизмов рубца кормовым субстратам характерен уксуснокислый тип брожения и pH среды ближе к нейтральной – от 6,6 до 6,9. Менее оптимальным кормовым субстратам свойственен пропионово-масляный тип брожения и более кислый pH среды от 6,2 до 6,5. При этом большая дополнительная нагрузка по нейтрализации рубцового содержимого ложиться на слюнные железы. В практике кормления высокопродуктивных коров с целью создания оптимальной среды в рубце для жизнедеятельности микроорганизмов и переваривания различных кормовых субстратов рациона применяют кормовые добавки с различными биологическими свойствами таких, как эрготропики, грибковые культуры, модификаторы, антиоксиданты, ферменты, и др., [1–4]. В последнее время предпочтение отдается природным биологически активным веществам, как альтернатива применению антибиотиков [5–7].

В данных исследованиях был изучен характер влияния на ферментативно-микробиологические процессы в рубце, овец кормовых добавок (КД) с различными биологическими свойствами с целью их использования в питании жвачных для управления пищеварительными процессами в рубце, повышения переваримости и использования нутриентов рационов путем придания им определенных функциональных свойств [8]. В данном исследовании были изучены дигидрокверцетин (ДКВ), органический йод (OJ), мицеллат-Са (М-Са), спирулина и шунгит.

ДКВ получаемый из лиственницы Даурской, обладает широким спектром биологических свойств; 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, не токсичен Признан как эталонный антиоксидант и широко применяется в медицине, пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства [6]. Дигидрокверцетин применяли в форме КД Экостимул 2 АО «Аметис» содержащей 80 % дигидрокверцетина.

Также перспективным для нужд животноводства является кормовая добавка «Прост», ООО «ИНБИОТЕХ» изготавливаемая на основе OJ и представляющая из себя смесь полноценных белков сыворотки молока, содержащих 2,5 % ковалентно-связанных с ними атомов йода. Йод встроен в молекулу аминокислоты тирозина или гистидина и имеет положительную валентность (J^{+}), в которой он проявляет свои свойства. Благодаря ковалентной связи йода с белками биойод обладает высокой стабильностью при нагреве до 300® С, устойчивостью к свету и нагревании при длительном хранении, что гарантирует его содержание при производстве различных премиксов и стартерных кормов для животных. В основе физиологического действия тиреоидных гормонов лежит регуляция интенсивности дыхания клеток, их непосредственное влияние на поглощение кислорода митохондриями и другими частями клеток, усиление окислительных реакций и основного обмена в организме. Они оказывают значительное воздействие на активность ферментов и генный аппарат клеток, оказывают влияние на морфогенез и воспроизводительную функцию [9, 10].

М-Са ЗАО «Петрохим» является комплексным препаратом в форме суспензии, содержащим в качестве основного компонента карбонат кальция и является одним из регуляторов его обмена в организме. При поступлении коллоидного раствора в желудочно-кишечный тракт он нейтрализуется соляной кислотой с образованием ионов кальция (восполнению дефицита кальция способствует только его ионизированная форма), а также активных форм кислорода (АФК). АФК формируются в небольшом количестве в водной среде, их концентрация не выходит за рамки физиологической нормы. АФК способствуют образованию большого количества свободных электронов. Внесение М-Са в воду инициирует электронную активацию, что приводит к коррекции нарушений, вызванных различными патологическими факторами. При этом нормализуется работа системы окислительного фосфорилирования и повышается антиоксидантный статус клеток. Это обеспечивает нормализацию работы ранее ослабленных функций органов и тканей, в том числе ответственных за процессы костного ремоделирования и регенерацию поврежденных костей: замедляются деструктивные процессы в костной ткани, изменяется соотношение регуляторов остеокластогенеза в сторону их сбалансированности, стимулируется регенерация эпителиальной ткани, улучшается периферическая микроциркуляция [11–16]. Микроводоросль спирулины (Spirulina platensis) НПО МГУ «Биосоляр» является уникальным продуктом природы. Биомасса спирулины содержит абсолютно все вещества, которые необходимы человеку и животным для нормальной жизнедеятельности. Ряд особых веществ – биопротекторов, биокорректоров и биостимуляторов – не встречается больше ни в одном продукте натурального происхождения Спирулина обладает широким спектром биологической активности: стимулирует обмен веществ, укрепляет костяк, нормализует состояние кожно-волосяного покрова и слизистых оболочек, нейтрализует токсины, улучшает функции пищеварительной системы. Поликислоты в составе спирулины оказывают положительное действие на репродуктивную систему организма и ее функцию. Увеличивает количественный и улучшает качественный состав лактобацилл и бифидобактерий в кишечнике. Способствует поддержанию на высоком уровне содержание гемоглобина и эритроцитов в крови. Соотношение между аминокислотами, витаминами и микроэлементами является оптимальным, физиологически сбалансированным, что приводит к нормализации окислительно-восстановительных реакций в организме животного, благодаря чему спирулина является самодостаточным препаратом и исключает необходимость использования аналогичных средств (белковые добавки, витаминные комплексы и т. д.). За счет содержания высокого качества протеинов и витаминов сокращает потребность в корме. Оказывает на организм общее оздоравливающее действие за счет гамма-линолевой кислоты. В результате этого повышается продуктивность животных и их устойчивость к различным заболеваниям. Среди биологически активных соединений, особенно важными являются изопреноиды, положительно влияющие на активность различных ферментов, а также на синтез нуклеиновых кислот и фотосинтез. Антиоксидантные характеристики цианобактерии связаны с фитогормонами и ферментами. Синий пигмент фикоцианина из сине-зеленых водорослей стимулирует нервную и иммунную системы. [17, 18]. Шунгит Карельского мсторождения – уникальный природный минерал, необычен по происхождению, структуре, входящего в его состав углерода и структуре самих пород. Шунгитовый углерод – это окаменевшая древнейшая нефть, или аморфный, фуллереноподобный углерод. Шунгитовый углерод – элементарный углерод со специфичной шунгитовой структурой. Основу ее представляет многослойная глобула размером около 10 нм. Такая структура очень активна в окислительно-восстановительных реакциях, обладающая сорбционными и каталитическими свойствами. Содержание углерода в породе около 30 %, а 70 % составляют силикатные минералы. В минеральной части содержатся окиси более 20 макро- и микроэлементов. Основным представителем которых является кремний. Минеральная часть шунгита (углерод, силикаты), также как и цеолиты и бентониты, обладает адсорбционными, связывающими, буферными и ионообменными свойствами, дисперстностью и влагопоглощаемостью. Окиси кремния способствуют повышению усвоения кальция, фосфора, магния, железа, марганца, цинка и др., влияют на показатели естественной резистентности животного организма, на метаболизм витаминов А. К, Д3 и каротина Фуллерены в составе шунгита повышают устойчивость мембран клеток к повреждающим факторам; имеют антиоксидантные свойства и обладают радиопротекторными свойствами за счет подавления избыточного уровня свободных радикалов [19–21].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 6 фистулированных овцах в возрасте 2-х лет, 3 из которых романовской породы и 3 – гибриды романовской с архаром методом групп–периодов – контрольного и опытного продолжительностью 14 дней каждого. В контрольный период овцы получали основной рацион (ОР), состоящий из 1,5 кг сена, 0,4 кг концентратов, общей питательностью 13,2 МДж ОЭ (1,32 ЭКЕ) с содержанием 180 г. протеина, 40 г. жира, 380 г. клетчатки. В опытный период овцам к ОР добавляли ДКВ по 100 мг/гол/сут+OJ по 1,05 мг/гол/сут), или ДКВ по 100 мг/гол/сут.; спирулину (сухой порошок) по 1,25 г./гол/сут в смеси с 23,75 г. наполнителя; М-Са по 50 мкл/гол/сут. в форме рабочего раствора, который вводили непосредственно в рубец через фистулу, или – шунгит в количестве 0,3; 0,9 и 1,5 % от сухого вещества ОР. Биологически активные вещества давали овцам в форме смесей. Смесь 1, состояла из наполнителя – сухих размолоченных ростков, КД «Экостимул -2» (ДКВ 80 %) и КД «Прост» (7 мг йода в 1 г), а смесь 2 из наполнителя и КД «Экостимул -2». Смеси давали овцам по 10 г./гол/сут. В конце каждого периода для изучения показателей желудочного пищеварения и видового состава микрофлоры рубца отбирали пробы рубцового содержимого за час до утреннего кормления и через 3 часа после кормления. В содержимом рубца изучали: pH, ОВП (мВ), общее количество летучих жирных кислот – методом паровой дистилляции в аппарате Маркгама; аммиачный азот – микродиффузным методом по Конвею; амилолитическую активность – фотометрическим методом, количество биомассы простейших и бактерий в рубцовом содержимом методом дифференцированного центрифугирования на центрифуге BECKMAN (Германия) modelJ2–21 Centrifuge экспозицией 20 минут при 15000 оборотах, видовой состав микроорганизмов и ТБК – активные продукты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсивность и направленность процессов пищеварения в рубце жвачных, а, следовательно, и эффективность использования корма, неразрывно связаны с составом водной среды химуса, которая определяется кислотно-щелочным балансом – значениями pH и ОВП и зависит от структуры и питательности рациона, качества питьевой воды, интенсивности секреции слюнных желез и состоянием микробиоценоза. [11]. В свою очередь жизнеспособность микроорганизмов значительно зависит от ОВП. С повышением ОВП воды улучшаются ее биэнергетические, метаболические и иммуностимулирующие свойств, что обеспечивает благоприятные условия для развития микроорганизмов [15, 16].

Сравнительное изучение кормовых добавок природного происхождения, включающих дигидрокверцетин, органический йод, мицеллат-Са, спирулину и шунгит, при добавлении в рацион овец показало их специфическое действие на окислительно-восстановительные и ферментативно-микробиологические процессы в рубце, что может быть использовано в практике кормления жвачных животных для придания рационам определенных функциональных свойств В размножении и жизнеспособности микроорганизмов в средах важную роль играет ОВП. В контрольный период ОВП химуса равнялось -272 мВ, в 1-й опытный + 107, а в 2-й опытный -404 мВ. Данные значения показывают степень и направленность окислительно-восстановительных процессов. Включение OJ в рацион овец привело к усилению окислительных процессов, в то время как ДКВ, наоборот, усилило восстановительные процессы, что хорошо согласуется с данными по окисленности и pH химуса и является характерным проявлением окислительных у йода и восстановительных у дигидрокверцетина как антиоксиданта свойств. Добавление к рациону овец ДКВ отдельно и совместно с органическим йодом оказало значительное влияние на физико-химические показатели химуса, на ферментативные и микробиологические процессы. В контрольный период pH химуса рубца был равен 5,69 при окисленности 0,146 ед. эк. В 1-й опытный период при включении в рацион ДКВ с OJ pH химуса повысился до 5,85 на фоне значительного в 2,8 раза увеличения его окисленности. Во 2-м опытном периоде под действием ДКВ pH химуса повысился до 6,41 при значительном снижении в 1,8 и 5,08 раза окисленности соответственно по отношению к контрольному и 1-у опытному периоду. В размножении и жизнеспособности микроорганизмов в средах важную роль играет ОВП. В контрольный период ОВП химуса равнялось -272 мВ, в 1-й опытный + 107, а в 2-й опытный -404 мВ. Данные значения показывают степень и направленность окислительно-восстановительных процессов.

Включение ОJ в рацион овец привело к усилению окислительных процессов, в то время как ДКВ, наоборот, усилило восстановительные процессы, что хорошо согласуется с данными по окисленности и рН химуса и является характерным проявлением окислительных у йода и восстановительных у дигидрокверцетина как антиоксиданта свойств. Так, по действию на рН содержимого рубца наиболее эффективными были ДКВ и спирулина. При их добавлении к рациону рН химуса повысился на 12,6 и 9,5 %, соответственно в то время, как действие остальных КД в применяемых дозировках было на уровне 100–103,6 %. По действию на образование ЛЖК наиболее эффективными были шунгит при всех дозировках и М-Са. При их включении в рацион увеличение содержания ЛЖК в химусе составило 119,9; 126,3, 122,8 и 106,6 % соответственно. Действие ДКВ+ОJ, ДКВ и спирулины на содержание ЛЖК в химусе было негативным и составило 93,5, 81,2 и 81,8 % по отношению к контрольному периоду. Включение в рацион изучаемых КД за исключением ДКВ+ОJ привело к снижению содержания аммиака в химусе. Наибольшее снижение, на 23,7 и 26,4 %, произошло под влиянием ДКВ и М-Са. Шунгит также оказал значительное влияние на содержание аммиака в химусе, но оно зависело от его дозы применения. С увеличением дозы повышалось и содержание аммиака, которое по отношению к контрольному периоду составило 81,3, 85,1 и 91,6 %, соответственно его включению в количестве 0,3, 0,9 и 1,5 % СВ. Включение в рацион ДКВ+ ОJ оказало противоположное действие на содержание аммиака в химусе, что выразилось увеличением его содержания на 16,5 % по отношению к контрольному периоду, что возможно связано с повышением окислительных процессов под действие йода и снижением в связи с этим образования ЛЖК. Действие изучаемых КД на амилолитическую активность химуса также было различным. Её повышение на 6,1, 1,7 и 1,4 %, отмечалось при применении соответственно спирулины, М-Са и ДКВ+ОJ. Под действие шунгита произошло значительное её снижение, которое зависело от дозы применения и составило 18,0. 17,2 и 19,1 % по отношению к контрольному периоду соответственно при дозировке 0,3, 09, 1,5 % СВ. Под действием ДКВ это снижение было минимальным и составило 7,3 %. Состояние ферментативных процессов и их изменение под действием изучаемых КД непосредственно отразилось на микробиоте как количественно, та и на ее видовом составе. Наибольший эффект в увеличении микробной массы в химусе был получен при включении в рацион шунгита, но этот эффект зависел от его дозировки. С повышением содержания шунгита в СВ рациона наблюдалось снижение общего количества микроорганизмов и менялось процентное соотношение инфузории / бактерии, которое составило 200,0, 147,7 и 125,2 % по отношению к контрольному периоду и 75,2/24,5, 78,9/21,1, 54,4/45,6 соответственно при включении в рацион 0,3, 0,9 и 1,5 % шунгита в СВ. Включение в рацион овец ДКВ+ОJ, ДКВ и М-Са также оказало влияние на увеличение микробиальной массы в химусе, но оно было значительно меньшим по сравнению с действием шунгита и соответственно составило 115,4, 102,3 101,3 % по отношению к контрольному уровню при соотношении инфузории / бактерии 125,3/108,7, 72,7/122,5 и 100,6/102,2. Под действием спирулины произошло снижение общего количества микроорганизмов на 24,9 % за счет как инфузорий, так и бактерий соответственно на 19,2 и 8,6 %, что может быть связано с неадекватным содержанием энергии в рационе. Так, в опыте на молочных коровах чернопестрой породы при добавлении к рациону 20 г. /гол/сут премикса, содержащего 2г биомассы спирулины оказало положительное влияние на физиологические и микробиологические процессы в рубце, поддерживая его состояние в физиологической норме. При этом было установлено повышение образования ЛЖК на 32,95 % в начале и на 9,4 % в конце опыта, увеличение количества инфузорий на 37,7 % в начале и на 11,29 % в конце опыта, а также наблюдалось и увеличеиие количества МАФанМ на 5,2 %, а лактобацилл на 6,9 % по сравнению с коровами контрольной группы, что свидетельствует о пробиотических свойствах спирулины [18]. При анализе влияния различных КД на микробиоценоз рубца прослеживается положительная связь с индексом отношения аммиак/ЛЖК, который может характеризовать степень конверсии корма в микробный протеин. Однако в случае применения ДКВ+ОJ и спирулины данный индекс имел отрицательное значение, что может быть обусловлено как рН, так и значением ОВП химуса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чернышев Н.И., Панин И.Г., Шумский Н.И., Гречишников В.В. Антипитательные факторы кормов. Справочная книга. – Воронеж, ОАО «Воронежская областная типография». – 2013. – 206 с.
2. Ward J., Probiotic yeast for optimal rumen balance. – All About feed, – 2017, – Vol. 25, – № 8, – p. 24–25. 3. Понамаренко Ю.А. Питательные и антипитательные вещества в кормах. Монография. Минск, 2007, – 948 с
4. Романов В.Н., Боголюбова Н.В., Лаптев Г.Ю., Ильина Л.А. Современные способы улучшения здоровья и роста продуктивности жвачных животных. – Подольск, 2018. – 128 с.
5. Максимов Р.Т. Новые кормовые добавки // Ветеринария сельскохозяйственных животных, -2008, – № 3, – С. 64–65
6. Фомичев Ю.П., Никанова Л.А., Дорожкин В.И. и др., Дигидрокверцетин и арабиногалактан – природные биорегуляторы: применение в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Монография. М:. «Научная библиотека» -700 с.
7. Артемьева О.А., Переселкова Д.А., Фомичев Ю.П. Биологически активный препарат как альтернатива использования антибиотиков против патогенной микрофлоры. // Сельскохозяйственная биология. -2015, – № 34, – С. 513–519.
8. Кормовые добавки, термины и определения.
9. Тохметов Т.М., Профилактика дефицита йода в рационах коров // Сельское, лесное и водное хозяйство, -2013. № 3, [Электронный ресурс] – URL http://agro.snauka.ru/2011/12/75.
10. Шантыз А.Х., Перспективы применения йодсодержащих препаратов в ветеринарии: Автореф. дис. док. вет. наук, – Краснодар, 2014, -40 с.
11. Block, E. Manipulation of dietary cation-anion difference on nutritionally related production disease, productivity and metabolic responses of dairy cows. – J. Dairy Sci. -1994. -77: 1437–1450.
12. Рахманин Ю.А., Стехин А.А., Яковлева Г.В. Биофизика воды; Квантовая нелокальность в технологиях водоподготовки; регуляторная роль ассоциированной воды в клеточном метаболизме, нормирование биоэнергетической активности питьевой воды. – М.: Ленард/URSS, – 2016, – 352 с.
13. Зацепина О.В., Стехин А.А., Яковлева Г.В. Особенности изменений электрохимических параметров воды, активированной структурно напряженным карбонатом кальция в мицеллярной фор ме. // Гигиена и санитария, -2013, – № 5, – С. 37–39.
14. Аметов А.С., Доскина Е.В., Капустина Н.В. Роль модифицированной формы кальция к подготовке к проведению патогенетической антирезорбтивной терапии у пациентов. больных остеопорозом с гипо- или нормокальциемией. // Эндокринология, – 2016, – № 4, – С. 65–72 .
15. Шибильскис П. Активированная вода, http://woter-ionizer.ru-infjrmaition/aktivirovannaya – voda, 16.03.2019. 16. Рекомендации по использованию ионизированной воды. https //akvalive.club/ru/rekomendadsii-po-primeneniyu-ionizirovannoj-vody.html
17. Кедик, С.А., Ярцев, Е.И. Гультяева. Н.В. Спирулина – пища XXI века – Москва «Фарма Центр», 2006, 166 с.
18. Rimkus M., Simkus A., Syvys R., Birutis S. Dry powdery fodder additive, supplement or fodder containing algae spirulina platensis. Патент. WO2010106468A1
19. Калинин Ю.К. Экологический потенциал шунгита. // Шунгит и безопасность жизнедеятельности человека. Материалы 1-й Всерос. науч.-прак. конф. Петрозаводск, 3–5 окт. 2006 г., – С. 51–53.
20. Ветров С.И., Ленкова Н.И., Харчевников М.Е. // Шунгит Российский минерал. М., -2–10, -37 с.
21. Боголюбова Н.В., Романов В.Н., Девяткин В.А., Калинин Ю.К. Оптимизация процессов пищеварения и обмена веществ в организме овец при использовании комплекса эрготропных веществ в составе минерала шунгита. // Ветеринария и кормление. – 2014. – № 5. – С. 88–90.

УДК 547.455. 6; 615.012.1

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ КАК ОДНА ИЗ ВАЖНЕЙШИХ (ЗАВЕРШАЮЩИХ) СТАДИЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ГЛЮКОЗЫ

Л.С. Хворова

Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов, Россия

Кристаллическая глюкоза широко применяется в медицине, пищевой промышленности, ветеринарии. спортивной медицине. Глюкозу в зависимости от температуры кристаллизации получают в гидратной (<50 ℃) или ангидридной (>50 ℃) форме. Биотехнология получения кристаллической глюкозы довольно сложный и длительный многостадийный процесс. При получении её из крахмала его подвергают гидролизу с помощью ферментов [1]. При этом получают гидролизаты с высоким содержанием до 98 % глюкозы. Полученные гидролизаты фильтруют, обесцвечивают активным углем, подвергают деминерализации ионообменными смолами. Очищенный сироп концентрируют в вакуум-аппарате и направляют на кристаллизацию. Кристаллизация выполняет важнейшие функции: выделение кристаллов из раствора, очистку их от примесей, которые остаются в маточном растворе, и создание готового кристаллического продукта с заданными свойствами. Гидратную глюкозу получают в политермических условиях в кристаллизаторе при охлаждении утфеля от 45 до 28 ℃ в течение 48–72 ч. При этом требуется большое количество затравки, до 30 % снижающей полезный объем кристаллизатора, и имеется риск размножения нежелательных микроорганизмов в продукте, приводящий к снижению микробной чистоты глюкозы [1].

Наиболее благоприятным режимом является режим кристаллизации глюкозы в ангидридной форме в изотермических условиях [2]. Процесс кристаллизации осуществляется при уваривании утфеля в вакуум-аппарате с подкачками жидкого сиропа (50–55 % СВ). Нуклеация кристаллов происходит в течение 5 мин при незначительном количестве затравки 10–15 г. на тонну сиропа. Наращивание зародышей происходит также с высокой скоростью, в течение 7–8 ч при температуре 70–75 ℃, исключающей инфицирование продукта плесневыми грибами и дрожжами. Высокая скорость кристаллизации и температурный режим обеспечивают высокий выход глюкозы с высокой микробиологической чистотой, что особенно важно при использовании её для приготовления инъекционных растворов.

Глюкозу в ангидридной форме получают и в политермических условиях при проведении процесса с охлаждением утфеля в кристаллизаторе. Длительность кристаллизации при снижении температуры от 75 до 55 ℃ возрастает до 16 ч [3]. Затруднения наблюдаются на стадии нуклеации кристаллов, которая продолжается 3–4 ч. Образующиеся при этом кристаллы имеют неравномерный состав, что осложняет отделение их от маточного раствора при центрифугировании, снижает их качество и выход.

В результате проведенных нами исследований разработан более эффективный, комбинированный способ кристаллизации, совмещающий стадию нуклеации кристаллов со стадией концентрирования сиропа в вакуум-аппарате [4]. Преимуществом процесса является быстрое, в течение 5 мин, образование необходимого количества зародышей, сливаемых с сиропом в кристаллизатор, где происходит их наращивание до технических размеров в течение 12 ч. При этом способе длительность кристаллизации сокращается на 4 ч, возрастает равномерность кристаллов, их чистота и выход.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хворова Л.С. Условия кристаллизации гидратной глюкозы из сиропов, полученных с применением ферментов. Хранение и переработка сельхозсырья. 2008. № 6. С. 48–49.
2. Андреев Н.Р., Хворова Л.С., Золотухина Н.И. Кинетика зародышеобразования ангидридной глюкозы в изотермических условиях. Сахар. 2010. № 12. С. 55–58.
3. Способ получения кристаллической агидридной глюкозы. Фиданко Сталиянов Сретенов. АС № 15472, Болгария. – Заявл. 07.05.70 г. – Опубл. 03.05.74 г.
4. Способ получения кристаллической ангидридной глюкозы. Хворова Л.С., Селезнева О.Н., Лукин Н.Д. Патент на изобретение RUS 2521510 27.06.2014. Заявка № 2012158069/13 от 29.12.2012.

УДК 632.954:579.841.11

БАКТЕРИИ РОДА PSEUDOMONAS: ПОТЕЦИАЛ В НИВЕЛИРОВАНИИ ГЕРБИЦИДНОГО СТРЕССА РАСТЕНИЙ

С.П. Четвериков

Уфимский Институт биологии Уфимского ФИЦ РАН, Уфа, Россия

При возделывании сельскохозяйственных угодий традиционно большое внимание уделяется борьбе с засоренностью посевов. Наряду с предпосевной обработкой почвы и севооборотами химические гербициды служат основным методом борьбы с нежелательной растительностью. По объемам применения они лидируют среди других средств защиты растений [Aktar et al., 2009]. Настолько широкое и интенсивное использование провоцирует распространение устойчивых к ним сорных растений, что в свою очередь побуждает сельхозпроизводителей увеличивать дозы и сочетать одновременно несколько действующих веществ для одной обработки [Zargar et al., 2019]. Повышение дозы гербицидов для подавления многолетних и стойких сорняков может также угнетать культурные растения и приводить к накоплению гербицидов в почве. Сложившееся положение, очевидно, сохранится до появления следующего поколения препаратов, ориентированных на новые мишени в растительных клетках.

Анализ механизмов взаимодействия культурных растений с почвенными микроорганизмами – одна из задач сельскохозяйственной биологии. Благотворное влияние на растение микробных препаратов, как правило, бывает обусловлено наличием у бактерии набора полезных свойств, таких как способность к азотфиксации, растворению фосфатов, синтезу фитогормонов, антимикробных соединений [Spaepen et al., 2009; Bakaeva et al., 2017], конкуренции за питательные вещества и места колонизации с патогенами [Kloepper et al., 2004]. Интересным представляется изучение взаимодействий растений и микробиоты в условиях стресса, вызванного неблагоприятными факторами среды. По литературным данным, именно на фоне стресса обработка посевов ростстимулирующими бактериями (plan growth promoting bacteria – PGPB) оказывается наиболее эффективной [Rubin et al., 2017]. И большая часть PGPB представлена бактериями рода Pseudomonas.

Поэтому актуальным становится поиск средств для уменьшения гербицидного стресса у сельскохозяйственных культур. Возможность использования для этого специализированных штаммов микроорганизмов стала рассматриваться лишь недавно и отражена в немногочисленных публикациях. Сообщается об антистрессовом действии на фоне отдельных гербицидов штаммов Rhizobium sp. MRL3 [Ahemad, Khan, 2010], Pseudomonas putida [Bourahla et al., 2018], Azotobacter salinestris KF470807 [Chennappa et al., 2018].

Цель работы – оценка устойчивости к гербицидам разной химической структуры способствующих росту растений бактерий из коллекции УИБ УФИЦ РАН и из коммерческих биопрепаратов, скрининг новых устойчивых микроорганизмов и определение их потенциала в нивелировании гербицидного стресса растений.

Объектами исследования служили культуры микроорганизмов, выделенные из сельскохозяйственных и антропогенно нарушенных почв, а также бактерии из коллекции УИБ УФИЦ РАН, обладающие фунгицидной и ростстимулирующей активностью, в том числе запатентованные в качестве основы для биопрепаратов «Азолен», «Елена», «Азопол» (Pseudomonas koreensis ИБ 4, P. chlororaphis ИБ 51, Paenibacillus sp. ИБ 1), а также штаммы бактерий из коммерческих биопрепаратов «Псевдобактерин-2», «Планриз», «Фитоспорин» (P. aureofaciens BS 1393, P. fluorescens AP-33, Bacillus subtilis 26Д).

При скрининге использовали два методических подхода: посев на микробиологические среды непосредственно из свежеотобранной почвы и создание накопительных культур на основе почвенных образцов, обогащенных гербицидами, из которых через месяц инкубации при температуре 28°С проводили микробиологический посев на селективные питательные среды. В качестве основы для сред использовали минеральную среду Раймонда [Raymond, 1961] с добавлением в качестве селективных агентов гербицидов Октапон экстра (2,5 г/л), Флоракс (2,5 г/л), Дикамба (1 г/л), Наномет (1 г/л), Спецназ (1 г/л) или Чисталан (2,5 г/л).

Перечисленные препараты представляют собой используемые на посевах пшеницы селективные гербициды на основе 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты, 2-этилгексилового эфира 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, (2,6-дифторфенил)-8-фтор-5 метокси-1,2,4-триазоло [1,5-с] пиримидин-2-сульфонамида, 3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоты, метсульфурон-метила, трибенурон-метила. Концентрации гербицидов в среде были выбраны исходя из концентрации их рабочего раствора согласно рекомендациям производителей.

Антагонизм к фитопатогенам определяли методом совместного выращивания бактерий и грибов в чашках Петри [Chetverikov, Loginov, 2009]. Тестировали на следующих мицелиальных грибах: Bipolaris sorokiniana (Sacc.) Shoemaker (= Helminthosporium sativum Pam., King et Bakke), Fusarium culmorum (W.G. Smith) Sacc. ВКМ F-844, F. gibbosum Appel et Wollenw ВКМ F-848, F. graminearum Schwabe ВКМ F-1668, F. solani (Mart) Sacc. ВКМ F-142, F. oxysporum Schltdl ВКМ F-137, F. nivale (Fr.) Ces. Ex Sacc. ВКМ F-3106, F. semitectum ВКМ F – 1938, F. avenaceum ВКМ F – 132, Alternaria alternate (Fr.) Keissl. ВКМ F-3047, Rhizoctonia solani J.G. Kuehn ВКМ F-895.

Для определения нитрогеназной активности применялся ацетиленовый метод, как описано [Коршунова et al., 2013]. Способность штамма к синтезу ИУК определяли с применением метода иммуноферментного анализа [Bakaeva et al, 2020]. Солюбилизацию фосфатов оценивали по образованию прозрачных зон вокруг бактериальных колоний на среде Пиковской [Pikovskaya, 1948].

Большой интерес представляет поиск деструкторов гербицидов и устойчивых бактерий среди уже используемых в сельскохозяйственной практике биопестицидов и биоудобрений и запатентованных микроорганизмов.

Среди коллекционных штаммов устойчивость к присутствию гербицидов была распространена не очень широко. К Октапону экстра были устойчивы 32 протестированные культуры, к Флораксу – 31. В растворе Чисталана сохраняли жизнеспособность лишь 8 штаммов бактерий. Гербицид Нанomет почти не проявлял токсичности по отношению к бактериям, что, возможно, обусловлено гораздо более низкой концентрацией его рабочего раствора по сравнению с рабочими растворами гербицидов на основе 2,4 – Д.

Результаты тестирования бактерий на устойчивость к гербицидам показали некоторую родовую специфичность по данному признаку. Большая доля устойчивых штаммов была характерна для представителей рода Pseudomonas (рисунок).

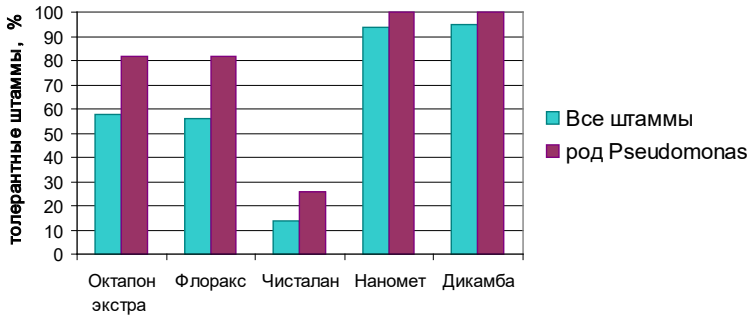


Рис. Родоспецифичность коллекционных штаммов по устойчивости к разным классам гербицидов

В табл. 1 представлены штаммы бактерий, способных к росту на средах с гербицидами в качестве единственного источника углерода. Взятые для исследования гербициды существенно отличались по своей способности служить питательным субстратом для микроорганизмов. Из протестированных микробных штаммов одиннадцать росли на минимальной среде с гербицидом Октапон экстра. Чуть меньше бактерий могло использовать как источник питания гербициды Флоракс (8 штаммов) и Дикамба (9 штаммов). На средах с Октапоном, Флораксом и Дикамбой визуально наиболее активный рост показали штаммы P. plecoglossicida 2,4 – D, P. putida ИБ 53а, P. koreensis ИБ 4. Способность данных микроорганизмов к использованию как Флоракса, так и Октапона экстра, очевидно, является следствием присутствия в составе обоих гербицидов 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4 – Д). Штамм P. plecoglossicida 2,4 – D уже был ранее описан в качестве эффективного деструктора хлор- и фторорганических соединения [Chetverikov et al., 2017]. Общие черты в структуре молекул 2,4 – Д и 3,6 – дихлор-2-метоксибензойной кислоты (Дикамба) объясняют наличие бактериальных культур, растущих на микробиологических средах с обоими веществами.

На среде с гербицидом Нанамет, значительно отличающимся по химической структуре от 2,4 – Д и Дикамбы, активно формировали колонии только 2 штамма бактерий P. koreensis ИБ 4 и Paenibacillus sp. ИБ 1. Способностью к росту на среде с Чисталаном отличался только штамм P. koreensis ИБ 4.

Таким образом, устойчивостью ко всем группам исследуемых гербицидов отличался только штамм P. koreensis ИБ 4 – основа коммерческого биоудобрения «Азолен».

При скрининге новых штаммов микроорганизмов предпочтение было отдано деструкторам гербицидов как имеющим большую практическую значимость. Поскольку желательным является сокращение периода персистенции гербицидов в почве и ускорение их естественного разрушения, способность биопрепаратов к использованию гербицидов как источника питания может сделать их более ценными и конкурентоспособными.

Штаммы бактерий, устойчивых к воздействию гербицидов выделяли из 178 образцов почвы, отобранных на территории сельскохозяйственных угодий и промышленных предприятий Республики Башкортостан (Россия), промышленных площадок в Республике Коми (Россия), культивируемых почв Турецкой Республики. Были выделены 14 новых штаммов микроорганизмов, способных расти на минеральной среде с гербицидами как питательным веществом. После изучения их свойств из них были отобраны 11 штаммов (табл. 2). Критериями отбора служило наличие агрономически ценных характеристик, устойчивость к гербицидам и способность расти, используя разные гербициды как источник питания. Все отобранные штаммы были способны использовать для роста гербициды Октапон экстра, Спецназ и Дикамба. Способность к разложению гербицидов Нанамет и Флоракс была распространена меньше. На среде с Нанометом росли 9 из отобранных штаммов, на среде с Флораксом – 10. К использованию Чисталана как источника питания были способны лишь 7 штаммов. При тестировании новых штаммов на устойчивость в баковых смесях было установлено, что наиболее токсичным из испытанных для бактерий являлся гербицид Чисталан (табл. 2). В его присутствии в рабочей концентрации выживали только 9 штаммов бактерий. По-видимому, токсичностью Чисталана обусловлена и меньшая вероятность выделения его деструкторов. В присутствии других гербицидов все отобранные штаммы сохраняли свою жизнеспособность.

Наиболее перспективными в рамках исследуемой проблемы по совокупности способностей представлялись изоляты **DA1.2, 6CH2, CH5 % 2**, которые были идентифицированы как Pseudomonas protegens, P. avallanae и P. plecoglossicida, соответственно. Их агрономически ценные характеристики PGPB представлены в таблицах 3 и 4.

Все три новых штамма обладали способностью к синтезу ауксинов, также были способны к фиксации атмосферного азота и солюбилизации фосфатов. Как известно, синтез фитогормонов, в частности, ауксинов, не только способствует стимуляции развития корневой системы растений и позволяет ускоренно проходить чувствительные к патогенам стадии своего развития, но и помогает в борьбе с дефицитом воды и другими стрессами растений.

Таблица 1. – Способность бактерий к росту в среде с гербицидами в качестве единственного источника углерода и энергии

Культура микроорганизмов	Гербициды					
	Октапон экстра	Флоракс	Нанамет	Спецназ	Дикамба	Чисталан
Bacillus subtilis 26Д	–	–	–	–	+	–
Paenibacillus sp. IB 1	++	++	++	+	–	–
Pseudomonas aureofaciens IB 6	+	+	–	–	+	–
P. aureofaciens BS 1393	+	–	–	–	+	–
P. chlororaphis IB 51	++	–	–	–	–	–
P. fluorescens AP-33	+	–	–	–	++	–
P. japonica IB 17	+	+	–	–	++	–
P. koreensis IB 4	**++**	**++**	**++**	**+**	**++**	**+**
P. plecoglossicida 2,4 – D	++	++	+	+	++	–
P. putida IB 53a	++	++	–	–	++	–
P. rhizosphaerae IB 56	+	+	++	+	++	–
Pseudomonas sp. IB 182	+	++	–	–	+	–
Примечание: «++» – активный рост; «+» – слабый рост; «–» – нет роста						

Таблица 2. – Способность новых изолятов к росту в среде с гербицидами в качестве единственного источника углерода и энергии

Изолят	Гербициды					
	Дикамба	Октапон экстра	Наномет	Флоракс	Чисталан	Спецназ
СН.3.1	-	++	-	+	-	+
12N1	++	++	++	++	-	+
СН5 % 1	+	++	+	++	+	+
СН5 % 2	**++**	**++**	**++**	**+**	**+**	**+**
6СН1	++	++	-	++	+	+
6СН2	**++**	**+**	**++**	**+**	**++**	**+**
5N1	++	++	++	++	-	+
ДД4	+	+	+	-	+	+
DA1.2	**++**	**++**	**++**	**++**	**++**	**+**
Н.ж.	++	++	++	++	++	+
Некр.5	++	++	+	++	-	++
Примечание: ++ активный рост, + слабый рост, – отсутствие роста						

Таблица 3. – Свойства потенциальных бактериальных антистрессантов

Штамм	Нитрогеназная активность, нмоль C_2H_4•ч$^{-1}$•мл$^{-1}$	Синтез ауксинов, нг/мл	Солюбилизация фосфатов
P. plecoglossicida **СН5 % 2**	20,7	323±16	+
P. avallanae **6СН2**	19,8	169±8	+
P. protegens **DA1.2**	20,8	870±44	+

Таблица 4. – Спектр антагонистической активности потенциальных бактериальных антистрессантов

Фитопатогенные микромицеты	Диаметр зоны ингибирования роста гриба, мм		
	P. plecoglossicida **СН5 % 2**	P. avallanae **6СН2**	P. protegens **DA1.2**
F. culmorum ВКМ F – 844	12,0±1,5	12,0±1,5	39,8±2,2
F. gibbosum ВКМ F – 848	10,8±1,0	16,8±2,0	32,0±2,5
F .graminearum ВКМ F – 1668	15,2±1,2	14,6±1,4	30,2±2,2
F. nivale ВКМ F – 3106	10,6±0,5	10,4±0,5	22,4±2,0
F. semitectum ВКМ F – 1938	14,8±1,3	14,2±1,2	32,5±3,2
F. solani ВКМ F – 142	≤5,0	16,2±1,5	36,0±3,5
F. avenaceum ВКМ F – 132	18,2±1,6	20,6±2,2	35,5±3,2
F. oxysporum ВКМ F-137	14,4±1,3	14,4±1,3	33,4±3,5
Bipolaris sorokiniana (Sacc.) Shoemaker	19,8±1,3	≤5,0	40,0±2,4
Alternaria alternate ВКМ F-3047	12,0±1,3	≤5,0	34,9±3,0
Rhizoctonia solani ВКМ F-895	≤5,0	≤5,0	37,5±3,8

Изучение фунгицидных свойств штаммов показало их способность к антагонизму фитопатогенов. По величине активности они находятся на уровне штаммов псевдомонад, изученных нами ранее (Asabina et al., 2009), но в отличие от них устойчивы и способны расти в средах в присутствии гербицидов на основе малолетучих эфиров 2,4 – Д и сульфонилмочевины.

Таким образом, по совокупности представленных выше характеристик штаммы P. protegens DA1.2, P. avallanae 6СН2 и P. plecoglossicida СН5 % 2 СН5 % 2 наряду со штаммом P. koreensis ИБ 4 – основой коммерческого биоудобрения «Азолен», можно рекомендовать для создания биопрепаратов со свойствами биофунгицида и биоудобрения, и использования в качестве бактериальных антистрессантов по нивелированию гербицидного стресса в классических баковых смесях с гербицидами.

Исследование выполнено в рамках Гос. задания Минобрнауки России № 075–00326–19–00 по теме № АААА-А19–119021390081–1.

ЛИТЕРАТУРА

Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Мухаматдьярова С.Р., Логинов О.Н. Окислительная и нитрогеназная активность бактерии Ohrobactrum sp. ИБ ДТ-5.3/2 // Известия Самарского научного центра РАН. 2013. Т.15, № 3(5). 1637–1640.
Ahemad M., Khan M.S. Growth promotion and protection of lentil (Lens esculenta) against herbicide stress by Rhizobium species // Ann. Microbiol. 2010. V. 60. P. 735–745.
Aktar W., Sengupta, D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards // Interdisc. Toxicol. 2009. V. 2. № 1. P. 1–12.
Asabina E.A., Chetverikov S.P., Loginov O.N. Optimization of biosynthesis of phytopathogen growth inhibitors by bacteria of *Pseudomonas* genus // Biotechnology in Russia. 2009. № 3. С. 81–89.
Bakaeva M., Chetverikov S., Korshunova T., Loginov O. The new bacterial strain Paenibacillus sp. IB-1: A producer of exopolysaccharide and biologically active substances with phytohormonal and antifungal activities // Applied Biochemistry and Microbiology. 2017. V. 53. № 2. P. 201–208.
Bakaeva M., Kuzina E., Vysotskaya L., Kudoyarova G., Arkhipova T., Rafikova G., Chetverikov S., Korshunova T., Chetverikova D., Loginov O. Capacity of Pseudomonas strains to degrade hydrocarbons, produce auxins and maintain plant growth under normal conditions and in the presence of petroleum contaminants // Plants. 2020. V. 9. № 3. Article 379.
Bourahla M., Djebbar R., Kaci Y., Abrous-Belbachir O. Alleviation of bleaching herbicide toxicity by PGPR strain isolated from wheat rhizosphere Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Biologie Tom. XXV, Issue: 2, 2018, pp. 74–83.
Chennappa G., Sreenivasa M.Y., Nagaraja H. Azotobacter salinestris: A Novel Pesticide-Degrading and Prominent Biocontrol PGPR Bacteria. In: Panpatte D., Jhala Y., Shelat H., Vyas R. (eds) Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability, 2018. V. 7. Springer, Singapore/
Chetverikov S.P., Loginov O.N. New metabolites of Azotobacter vinelandii exhibiting antifungal activity // Microbiology. 2009. V. 78. № 4. P. 428–432.
Chetverikov S.P., Sharipov D.A., Korshunova T.Y., Loginov O.N. Degradation of perfluorooctanyl sulfonate by strain Pseudomonas plecoglossicida 2.4-D // Applied Biochemistry and Microbiology. 2017. V. 53. P. 533–538.
Kloepper J.W., Ryu M., Zhang S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus sp. // Phytopathology. 2004. V. 94. P. 1259–1266.
Pikovskaya R.I. Mobilization of phosphorous in soil connection with the vital activity of some microbial species. // Microbiologiya. 1948. V. 17. P. 362–370.
Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.
Rubin R.L., van Groenigen K.J., Hungate B.A. Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis // Plant and Soil. 2017. V. 416. P. 309–323.
Spaepen S., Vanderleyden J., Okon Y. Plant growth promoting actions of rhizobacteria // Advances in Botanical Research. 2009. V. 51. P. 283–320.
Zargar M., Bayat M., Lyashko M., Chauhan B. Postemergence Herbicide Applications Impact Canada Thistle Control and Spring Wheat Yields // Agronomy journal. 2019. V. 111. P. 2874–2880.

УДК 66.662.7

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ МАСЛИЧНЫХ СЕМЯН

А.А. Шевцов[1], Т.Н. Тертычная[2], Н.А. Сердюкова[3]

[1] Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия
[2] Воронежский государственный аграрный университет им. императора Петра I, Воронеж, Россия
[3] 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 [1]. 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 [2].

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 % [3].

Предлагаемая линия производства биодизельного топлива позволяет создать условия для реализации энергетически эффективной технологии в непрерывном режиме эксплуатации основного и вспомогательного оборудования с высокими показателями качества биодизельного топлива.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Новые подходы к разработке линии переработки семян масличных культур в биодизельное топливо / А.А. Шевцов, Т.Н. Тертычная, В.В. Ткач, Н.А. Сердюкова // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3 (30). – С. 276.
3. Патент РФ № 2693046. МПК7 C11C 3/10 (2006.01), C10L 1/02 (2006.01), C10G 3/00 (2006.01), C07C 67/02 (2006.01), СПК C11C 3/10 (2019.08), C10L 1/02 (2019.08), C10G 3/00 (2019.08), C07C 67/02 (2019.08) Способ получения биодизельного топлива и установка для его осуществления / Т.Н. Тертычная, С.А. Шевцов, В.В. Ткач, Н.А. Сердюкова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ. – № 2019114066; заявл. 06.05.2018; опублик. 14.02.2020. Бюл. № 5.

УДК 542.06

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЕКТИНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЯГОДНОГО СЫРЬЯ

В.А. Щелконогов [1,2], О.А. Баранова [1,2], А.В. Чеканов [1,2], К.Д. Казаринов [2], Э.Ю. Соловьева [1], А.И. Федин [1]

[1] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

[2] Институт радиотехники и электроники имени В.А. Котельникова РАН, г. Фрязино, Россия

В настоящее время очевидна связь нарастающего техногенного воздействия с ростом заболеваемости населения. В первую очередь это связанно с загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами и токсичными соединениями, которые попадают в организм с пищей, водой и вдыхаемым воздухом. Данные клинических и экспериментальных исследований показывают отчетливую взаимосвязь между ожирением и рядом хронических заболеваний (сосудистые заболевания сердца и головного мозга, онкология, сахарный диабет и др.) Актуальность работы заключается в том, что пектин является функциональным пищевым ингредиентом, оказывает положительное влияние на организм человека и совершенно безопасен, также он способен выводить из организма вредные и токсичные соединения [1,2].

Цель работы – исследование физико-химических свойств ягодных пищевых волокон – пектина и рассмотрено его использование в качестве ингредиента в продуктах питания. Практическая значимость полученных результатов заключается в том, что пектин, выделенный из ягодных выжимок, не уступает коммерческим образцам по физико-химическим показателям и может быть использован в пищевой промышленности.

Для проведения исследований были выбраны следующие образцы пектинов, полученных из выжимок наиболее распространенного в нашей стране ягодного сырья: вишни, жимолости, голубики, красной и черноплодной рябины, облепихи, брусники, черники, клюквы и красной смородины.

Было показано, что во всех образцах пектинов значения массовых долей ацетильных групп входят в допустимый предел (М.д. <1 %) для студнеобразующего пектина. Образцы пектинов, за исключением смородинового и вишневого, являются высокоэтерифицированными, поэтому для их гелеобразования необходимы сахара и кислоты. Для желирования образцов пектинов из смородиновых и вишневых и выжимок их необходимы соли металлов т. к. они низкоэтерифицированы. По определению значений pH во всех образах было установлено, что пектин – кислый гетерополисахарид (pH <7). По массовым долям золы в образцах было выявлено наличие незначительного содержания минеральных примесей в пектинах (малозольные). Был определён наилучший показатель вязкости виден у раствора пектина черноплодной рябины. Этот пектин обладает наибольшей степенью этерификации (74,6 %) из рассматриваемых образцов, что указывает на механизм, по которому будет проходить гелеобразование (сахарокислотное желирование).

Таким образом можно рекомендовать применение пектинов из клюквы, жимолости, брусники, голубики, черники, красной и черноплодной рябины для приготовления кондитерских изделий, содержащих общую долю сухих веществ не менее 55 % и кислот pH 3,0 – 3,3. А образцы из облепихи, красной смородины и вишни хорошо подойдут для приготовления десертных молочных продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мазур Л.М. Физико-химические процессы гелеобразования пектинов в пищевых технологиях / Л.М Мазур, И.В. Попова, Н.В. Симурова // Сахар – 2014. – № 1. – С. 2–5.
2. Rolin, C. Pectin / C. Rolin, J. Vries // Food Gels. C. 401–434.

УДК 581.169(063):633.174

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СОРТОВ СОРГО С УЛУЧШЕННОЙ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТЬЮ БЕЛКОВ ЗЕРНА

Л.А. Эльконин, В.М. Панин, О.А. Кенжегулов, С.Х. Сарсенова

Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия

Среди разнообразных направлений современной биотехнологии улучшение питательной ценности сельскохозяйственных культур методами генетической инженерии и геномного редактирования является одним из наиболее востребованных и интенсивно разрабатываемых. Особую актуальность это направление имеет для зернового сорго – высокоурожайной злаковой культуры, отличающейся высокой засухоустойчивостью, способной давать устойчивые урожаи зерна в условиях минимальной влагообеспеченности. Значение этой культуры особенно велико в регионах, регулярно подвергающихся действию засухи, в которых стабильное производство традиционных злаковых культур – пшеницы, кукурузы, ячменя – представляет серьезную проблему. Сорго входит в число пяти важнейших злаковых культур, возделываемых на Земном шаре. В связи с глобальным потеплением климата значение этой культуры будет неуклонно возрастать. Кроме того, зерно сорго не содержит клейковины и может служить источником белка для людей, больных целиакией и вынужденных соблюдать безглютеновую диету.

Однако зерно сорго, по сравнению с другими злаковыми культурами, характеризуется устойчивостью запасных белков (кафиринов) к протеолитическому расщеплению и низкой питательной ценностью самих кафиринов, которые бедны ценными аминокислотами – лизином, треонином, триптофаном (Bean et al., 2018). Слабая перевариваемость кафиринов протеолитическими ферментами (пепсином, трипсином) снижает перевариваемость крахмала, поскольку непереваренные белки уменьшают доступность амилолитических ферментов к крахмальным гранулам.

Причины устойчивости кафиринов к протеолитическому расщеплению имеют многофакторную природу (Belton et al., 2006; De Mesa-Stonestreet et al., 2010). К числу таких факторов относятся химическая структура молекул кафиринов, некоторые из которых (гамма- и бета-кафирины) изобилуют серо-содержащими аминокислотами, образующими S-S связи, препятствующими их расщеплению протеазами; взаимодействие кафиринов с веществами фенольной природы и полисахаридами; пространственная организация разных кафиринов в белковых тельцах клеток эндосперма. При этом считается, что гамма-кафирин, занимающий наружный слой белковых телец и наиболее устойчивый к протеолитическому расщеплению, препятствует расщеплению основного запасного белка – α-кафирина, располагающегося внутри белковых телец.

Решение проблемы улучшения перевариваемости запасных белков у сорго возможно с помощью разных биотехнологических подходов: экспериментальной индукции мутантов с нарушенным синтезом или измененным аминокислотным составом кафиринов; выявления существующих в природе аллельных вариантов кафиринов (Laidlaw et al., 2010; Cremer et al., 2014; Chiquito-Almanza et al., 2015; Duressa et al., 2020); введения генетических конструкций, вызывающих сайленсинг генов гамма- и / или альфа-кафиринов (da Silva et al., 2011; Kumar et al., 2012; Grootboom et al., 2014); редактирования нуклеотидных последовательностей генов гамма- и / или альфа-кафиринов с целью их нокаута (Li et al., 2018).

Нами была поставлена цель получения линий зернового сорго с улучшенной перевариваемостью кафиринов, путем введения в геном генетической конструкции, способной к индукции РНК-сайленсинга гена γ-кафирина. Эта конструкция состояла из фрагментов гена 28 кДа γ-кафирина в прямой и инвертированной ориентации, которые были разделены последовательностью гена ubi1-интрона кукурузы (Elkonin et al., 2016). Этой конструкцией управлял 35S-промотор. Такая конструкция должна подавлять экспрессию гена γ-кафирина с помощью РНК-интерференции, поскольку мРНК, транскрибируемая с этой последовательности, благодаря комплементарности прямой и инвертированной последовательностей, образует шпилечную конфигурацию.

Данная конструкция была введена в геномы двух сортов зернового сорго – Желтозерного 10 и Аванса – посредством агробактериальной трансформации. В качестве эксплантов использовали незрелые зародыши, которые после сокультивирования с агробактериальной клеточной суспензией формировали эмбриогенный каллус на среде с селективным агентом (глюфосинатом аммония). Из отобранных устойчивых каллусов были получены растения-регенеранты.

В экспериментах с сортом Желтозерное 10 было получено одно ПЦР-положительное растение. Потомство этого растения наследовало введенную генетическую конструкцию в течение нескольких поколений, что было подтверждено с помощью ПЦР-анализа с праймерами для маркерного гена bar и ubi-интрона, входящего в состав генетической конструкции для сайленсинга. SDS-электрофорез в нередуцирующих условиях показал, что в зерновках трансгенных растений уровень синтеза белка, соответствующего по молекулярной массе гамма-кафирину (28 kDa) был снижен, по сравнению с исходной нетрансгенной линией, что следовало ожидать в случае сайленсинга гена гамма-кафирина. Кроме того, у исходной нетрансгенного сорта Желтозерное 10 содержание полипептидов с Mr ≈ 66 и 45 kDa, возникающих в результате полимеризации гамма-кафирина, было значительно выше, чем у трансгенных растений.

Анализ эндосперма зерновок, развившихся на метелках растений T_1, выявил, что у трансгенных растений наряду с зерновками, в которых присутствовал стекловидный эндосперм нормальной толщины, присутствовали зерновки с мучнистым эндоспермом, у которых стекловидный слой был почти полностью редуцирован, либо зерновки, в которых эндосперм имел модифицированную текстуру: стекловидный слой был в значительной мере редуцирован или развивался в виде секторов или пятен, окруженных мучнистым эндоспермом. Возможно, формирование разных типов эндосперма, по-видимому, отражает особенности экспрессии встроенной генетической конструкции в процессе развития зерновки.

Наиболее значительным следствием сайленсинга гена гамма-кафирина является повышенная перевариваемость белков эндосперма (Elkonin et al., 2016). Трансгенные растения сорта Желтозерное 10 характеризовались значительно улученной перевариваемостью кафиринов in vitro. Сравнение электрофоретических спектров до и после действия пепсина показало, что у трансгенных растений поколения T_2 перевариваемость запасных белков достигла 94 % и была значительно выше, чем в исходного сорта (50–60 %). Примечательно, что растения поколения T_3 с толстым стекловидным эндоспермом также имели высокий уровень перевариваемости кафиринов (83–90 %). Таким образом, повышенная перевариваемость белков эндосперма у трансгенных растений сорго с сайленсингом гена ɣ-кафирина может не быть связана с полной редукцией стекловидного эндосперма, как это наблюдалось у растений с сайленсингом α-кафиринов. В этой связи, полученные нами трансгенные линии сорта Желтозерное 10 могут представлять особый интерес, поскольку они сочетают высокую перевариваемость со стекловидным или модифицированным типом эндосперма, имеющим более высокую ценность в селекции. По-видимому, снижение уровня γ-кафирина повышает перевариваемость α-кафиринов. Это увеличение может быть обусловлено как химическими причинами (такими как снижение полимеризации), так и физическими причинами (изменение пространственного расположения α-кафиринов в белковых телах, которые становятся более доступными для действия пепсина).

Важным следствием сайленсинга генов проламинов у злаков является повышенный синтез других белков, в том числе белков с высоким содержанием незаменимых аминокислот (лизина, треонина). В наших исследованиях у зерновок трансгенных растений поколения T_2 с высокой перевариваемостью кафиринов, как с модифицированным эндоспермом, так и с нормальным стекловидным эндоспермом, общее содержание аминокислот значительно уменьшилось (на 22–40 %) по сравнению с исходным нетрансгенным сортом. В то же время, относительное содержание двух основных незаменимых аминокислот, лизина и треонина, значительно увеличилось (Elkonin et al., 2016). Доля лизина увеличилась в 1,6–1,7 раза. Такое увеличение относительного содержания лизина и треонина в сочетании со значительным снижением общего уровня аминокислот, вероятно, было вызвано снижением содержания кафиринов, бедных лизином и треонином, тогда как синтез других белков оставался неизмененным. Соответственно, относительные пропорции лизина и треонина увеличились.

Примечательно, при анализе более поздних поколений полученных трансгенных линий Желтозерного 10 нами было обнаружено, что у растений поколения T_4, сохранивших высокую перевариваемость кафиринов, четко наблюдалась амплификация целевого фрагмента ubi-интрона, тогда как амплификация целевого фрагмента nos-промотора, управляющего в генетической конструкции маркерным геном bar, отсутствовала. У некоторых растений наблюдались только следы этого фрагмента nos-промотора. Мы предполагаем, что эти растения не содержали функционального nos-промотора. Учитывая, что nos-промотор регулирует экспрессию маркерного генного бара, эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы, что полученные трансгенные растения являются функционально безмаркерными.

Возможно, это является следствием разрушения генетической конструкции в процессе онтогенеза, поскольку у некоторых растений следы амплификации последовательности nos-промотора наблюдались в ДНК, выделенной из первого побега, но не из последующих побегов.

После экспериментов с модельным сортом Желтозерное 10, нами была поставлена задача получить трансгенные растения с улучшенной перевариваемостью кафиринов у нового коммерческого сорта Аванс, отличающегося комплексом улучшенных хозяйственно-ценных признаков. В результате экспериментов нами были получены 14 ПЦР-положительных растений, у которых наблюдалась амплификация целевых фрагментов как ubi-интрона, так и nos-промотора и, при этом отсутствовала амплификация целевого фрагмента гена chvA, которая имела бы место в случае агробактериальной контаминации. Частота трансформации варьировала в разных экспериментах от 6,7 до 12 %. ПЦР-анализ потомства T_1 одного из этих растений (# 1–1) показал амплификацию последовательностей-мишеней nos-промотора и ubi-интрона и подтвердил наследование введенной генетической конструкции (рис. 1).

Анализ перевариваемости белков эндосперма у зерновок, завязавшихся на этом растении, показал значительно более высокий уровень перевариваемости кафиринов у этого мутанта по сравнению с исходным нетрансгенным сортом (93 % против 57 %, по результатам денситометрии электрофореграмм) (рис. 2). Такая высокая перевариваемость запасных белков наблюдалась и в следующем поколении T_1. Анализ текстуры эндосперма трансгенных зерновок показал полное исчезновение стекловидного эндосперма (рис. 3). Примечательно, что стекловидный эндосперм у зерновок сорта Аванс имеет темный цвет, что свидетельствует о наличии таннинов, которые снижают питательную ценность зерна. Таким образом, два фактора – удаление стекловидного эндосперма, содержащего таннины, и улучшение перевариваемости кафиринов – указывают на потенциально более высокую питательную ценность зерна полученного мутанта по сравнению с зерном исходного сорта Аванс.

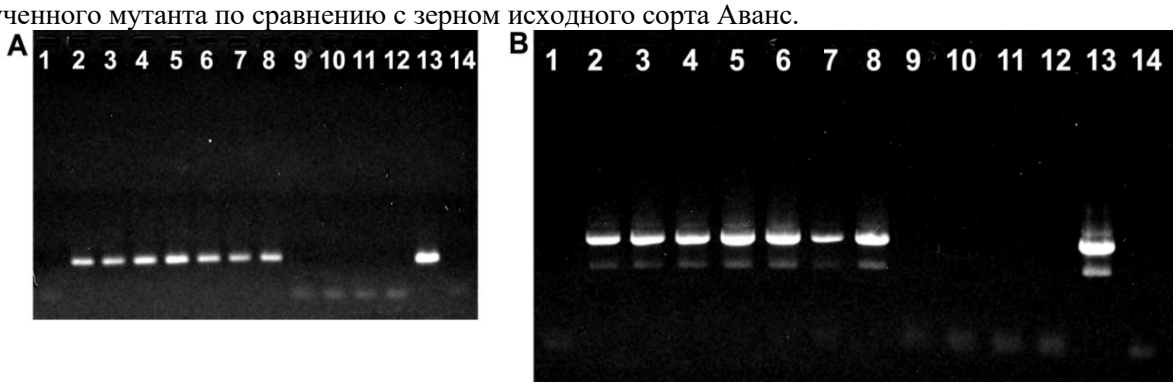


Рис. 1. Результат ПЦР-анализа поколения T1, полученного от ПЦР-положительного растения T0 № 1–1 с праймерами к nos-промотору (A) и ubi-интрону (B), входящим в состав Т-ДНК. 1, 9–12 – растения исходного нетрансгенного сорта сорго Аванс; 2–6 – растения из поколения T1; 7, 8 – родительское растение T0 № 1–1 (образцы ДНК из разных листьев); 13 – положительный контроль (GV3101/pNRKAF); 14 – отрицательный контроль (нет ДНК).

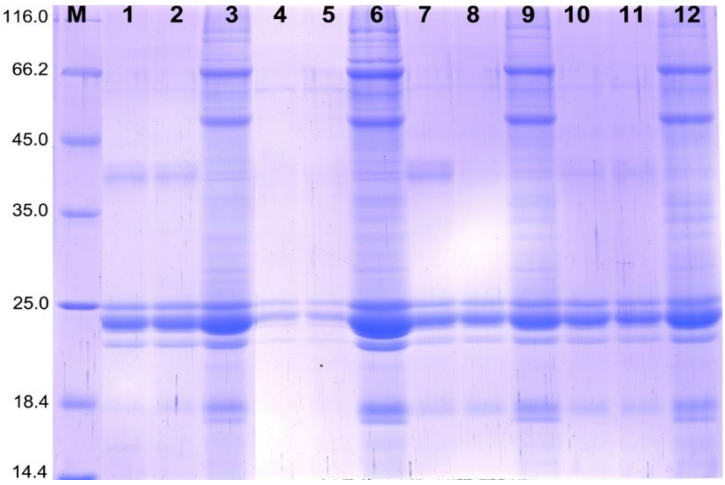


Рис. 2. Электрофоретические спектры белков муки из зерновок сорго сорта Аванс (треки 1–3), трансгенного растения № 1–1 (4–6) и нетрансгенных растений № 5–1 (7–9) и № 6–4 (10–12), полученных в одном из экспериментов по агробактериальной трансформации. М – маркеры молекулярной массы белков. В треках 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11 – спектры белков, выделенных из муки, обработанной пепсином в тесте на перевариваемость в системе in vitro; в треках 3, 6, 9, 12 – спектры белков из муки, не обработанной пепсином (контроль)

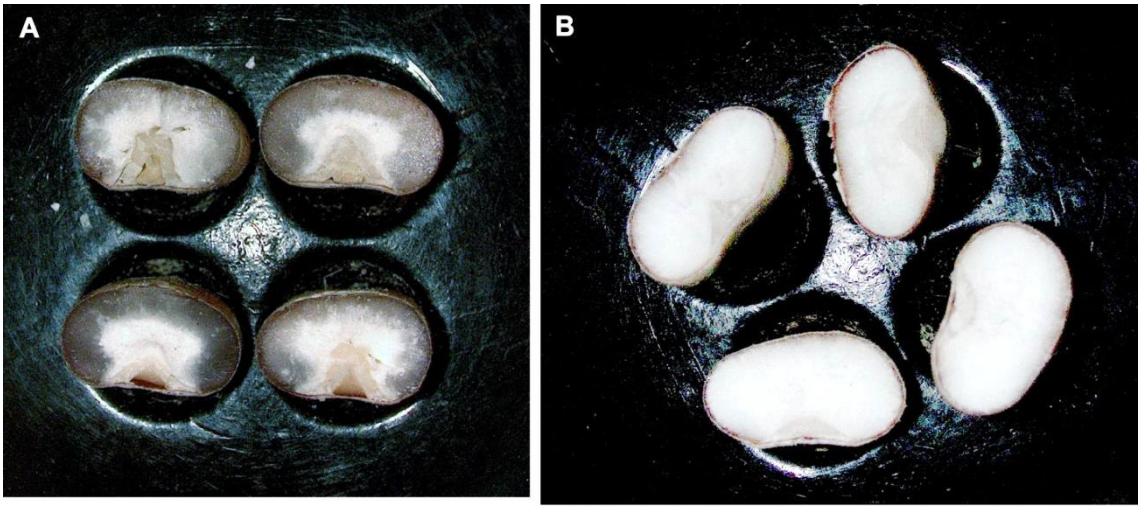


Рис. 3. Поперечные срезы зерновок исходного сорта Аванс (А) и трансгенного растения № 1–1 (В).

Таким образом, нами у коммерческого сорта зернового сорго Аванс получена трансгенная линия с улучшенной перевариваемостью кафиринов. У трансгенных линий сорта Желтозерное-10, с улучшенной перевариваемостью кафиринов, зафиксирована нестабильность введенной генетической конструкции, которая привела к элиминации промотора маркерного генного bar, вследствие чего растения этой линии стали функционально безмаркерными.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 19–016–00117.

ЛИТЕРАТУРА

Bean S.R., Ioerger B.P., Wilson J.D. et al. (2018) Structure and chemistry of sorghum grain // In: W Rooney (ed.). Achieving sustainable cultivation of sorghum. Vol. 2: Sorghum utilization around the world. Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing. p. 1–27.

Belton P.S., Delgadillo I., Halford N.G., Shewry P.R. (2006) Kafirin structure and functionality. J. Cereal Sci. 44: 272–286. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.05.004

da Silva L.S., Jung R., Zhao Z. – Y., Glassman K., Taylor J., Taylor J.R. (2011) Effect of suppressing the synthesis of different kafirin sub-classes on grain endosperm texture, protein body structure and protein nutritional quality in improved sorghum lines. J. Cereal. Sci. 54: 160–167. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.04.009

Duressa D., Bean S., Amand P. St. et al. (2020) Identification of variant α-kafirin alleles associated with protein digestibility in grain sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench]. Crop Sci. Doi: 10.1002/csc2.20198

Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Domanina I.V., Selivanov N.Y., Rakitin A.L., Ravin N.V. (2016) Transgenic sorghum with improved digestibility of storage proteins obtained by Agrobacterium-mediated transformation. Russ. J. Plant Physiol. 63: 678–689. DOI: 10.1134/S1021443716050046

Grootboom A.W., Mkhonza N.L., Mbambo Z. et al. (2014) Co-suppression of synthesis of major α-kafirin sub-class together with γ-kafirin-1 and γ-kafirin-2 required for substantially improved protein digestibility in transgenic sorghum. Plant Cell Rep. 33: 521–537. DOI: 10.1007/s00299–013–1556–5.

Kumar T., Dweikat I., Sato S. et al. (2012) Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench). Plant Biotechnol. J. 10: 533–544. DOI: 10.1111/j. 1467–7652.2012.00685.x

Laidlaw H., Mace E., Williams S., et al. (2010) Allelic variation of the beta-, gamma – and delta-kafirin genes in diverse Sorghum genotypes. Theor Appl Genet. 121: 1227–1237.

Li A., Jia S., Yobi A. et al. (2018) Editing of an alpha-kafirin gene family increases digestibility and protein quality in sorghum. Plant Physiol. 177(4): 1425–1438. DOI: 10.1104/pp.18.00200

УДК 633/635:58

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР НА ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВАХ

С.Н. Сушкова, Т.М. Минкина, А.И. Барбашев, Т.С. Дудникова, Е.М. Антоненко

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Благодаря токсикологическим исследованиям, было обнаружено такое токсичное соединение, как бенз(а)пирен (БаП). Данное соединение, за счет своей токсичности, входит в ряды самых опасных представителей класса полициклических ароматических углеводородов и относится к канцерогенам и мутагенам 1 класса опасности. Контроль содержания БаП обязателен для всех пищевых продуктов без исключения, а также для почв и растений, что регламентировано нормативно-правовой базой.

Цель работы – изучение основ повышения продуктивности злаковых культур на загрязненных почвах

Условия проведения вегетационного эксперимента. Исследования проводили в условиях вегетационного опыта, который был заложен в мае 2017 г. Почву просеивали через сито диаметром 1 мм и помещали по 2 кг в вегетационные сосуды емкостью 4 л. На поверхность почвы вносили раствор БаП в ацетонитриле из расчета создания концентрации загрязнителя в почве 20, 200, 400 и 800 нг/г, что соответствует 1, 10, 20 и 40 ПДК. В качестве контролей использовали исходную почву, а также почву, в которую вносили чистый ацетонитрил. Повторность в опыте – трехкратная. Почву в сосудах инкубировали в течение 26 мес.

Были получены морфобиометрические характеристики ячменя выращенного в условиях модельного эксперимента, а именно длина корневой и вегетативной частей.

Длина корневой части растений в контрольном и фоновом образцах в первый год эксперимента была равна 5,1 и 4,8 см, соответственно, при внесении ПДК БаП произошло незначительное уменьшение длины корня до 4,6. В образцах с внесением 10, 20 и 40 ПДК БаП значения длины корней не изменялись относительно контрольных значений и были равны 5,2, 5,2 и 5,3 см, соответственно. Во второй и третий год проведения эксперимента длина корней в контрольном, фоновом и в образце с внесением 1 ПДК БаП практически не изменялась. Однако в образцах с внесением больших доз БаП, таких как 10, 20 и 40 ПДК происходило увеличение длины корня во второй год до значений равных 5,4; 5,6 и 5,8 см, а в третий до 5,5; 6,4 и 6,8 см, соответственно, данные значения выше контрольных.

Длина вегетативной части растений в первый год проведения эксперимента снижалась по мере увеличения дозы внесения БаП. Так в контрольном и фоновом образцах длина вегетативной части растений была равна 37,6 и 37,8 см, соответственно. В образце с внесением 1 ПДК БаП значение длины снизилось до 28,2 см. При внесении поллютанта в почву в дозах равных 10, 20 и 40 ПДК происходит постепенное снижение длины вегетативной части растений, которая равна 23,2; 18,9 и 13,1 см, соответственно. Во второй и третий год проведения эксперимента показатели длины вегетативной части растений в контрольном и фоновом образце не изменялись. В образце же с внесением 1 ПДК БаП происходит увеличение длины во втором году до значения равного 31,4 см, а в третьем году до 34,6 см. Увеличение относительно первого года происходит так же и в образцах с внесенным БаП в дозах 10, 20 и 40 ПДК, так во второй год проведения эксперимента показатель длины вегетативной части растения увеличился до 27,2; 21,5 и 15,9 см, а на третий год уже составил 29,9; 26 и 16,7 см, соответственно.

Таким образом, были получены морфобиометрические характеристики ячменя выращенного в условиях модельного эксперимента, а именно длина корневой части и вегетативной части. В течении первого года исследования длина корня незначительно варьировала во всех образцах в значениях 4,6–5,3 см, но на третий год границы интервала значений выросли до 6,8 см. Вегетативная часть уменьшалась по мере увеличения дозы внесения БаП и достигала максимального значения в контрольном образце, а минимального в образце с внесением 40 ПДК БаП на всем протяжении проведения опыта.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19–29–05265.

УДК 631.563.2

ВЛИЯНИЕ КОНВЕКТИВНОЙ И СВЧ-СУШКИ СЕМЯН РАПСА НА ПОКАЗАТЕЛИ БЕЗОПАСНОСТИ РАПСОВОГО МАСЛА

Е.С. Бунин, Г.В. Калашников, С.В. Макеев

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

В пользу расширения производства и переработки рапса говорит факт возможности использования рапсового масла в качестве возобновляемого и экологически безопасного вида биотоплива, наличие практически неограниченных рынков сбыта рапсового сырья, возможности улучшения фитосанитарных и агрофизических свойств почвы, благоприятные почвенно-климатические условия в большинстве регионов страны [1, 2].Ценность рапса для пищевой промышленности определяется высоким содержанием витаминов группы Е и самым оптимальным соотношением всех физиологически важных жирных кислот, содержащихся в масле его семян, особенно ненасыщенной олеиновой кислоты, способствующей снижению уровня холестерина в крови и стимулирующей деятельность сердечно – сосудистой системы человека [3].Наиболее перспективным направлением повышения эффективности процесса сушки растительного сырья и совершенствования технологии производства рапсового масла при обеспечении высокого качества готового изделия является использование СВЧ-энергии и активных гидродинамических режимов в виде закрученных потоков теплоносителя.В процессе сушки семян рапса более влажные частицы под воздействием СВЧ-энергии нагреваются более интенсивно, чем частицы, имеющие меньшее влагосодержание, таким образом, происходит выравнивание влагосодержания материала.Вследствие большего градиента влагосодержания и температуры при действии СВЧ-энергии частицы подвергаются более интенсивному внутреннему тепловлагопереносу и внешнему тепло – и массообмену, что способствует интенсивной сушке с большей скоростью. Поэтому температура теплоносителя может быть снижена на (293…313) K, чем в случае только конвективного подвода тепловой энергии, что положительно сказывается на качестве высушиваемого материала.Отличительной особенностью сушки семян рапса при воздействии СВЧ-энергии в отличие от воздействия температуры сушильного агента на продукт при конвективной сушке является то, что подводимая СВЧ-мощность в меньшей степени оказывает влияние на критическое влагосодержание. Соотношения периодов постоянной и убывающей скоростей сушки определяются только формами связи влаги с материалом, что положительно сказывается на качестве высушиваемого материала.

Целью работы – исследование влияния различных способов сушки и СВЧ-обработки семян рапса на показатели безопасности, а также оценка качества рапсового масла.

В качестве способов сушки семян рапса выбраны конвективная сушка и комбинированная сушка с СВЧ-энергоподводом.Для исследования влияния СВЧ-энергии на качество изделия определялись основные показатели безопасности рапсового масла, которыми являются кислотное число и перекисное число [4]Отбор проб семян рапса осуществляли в соответствии с ГОСТ 13586.3–83.Для семян рапса, высушенных конвективным способом и с помощью комбинированного СВЧ-энергоподвода кислотное число определяли по ГОСТ 13496.18–85, перекисное число – согласно МУ № 13–5–02/0657 [4].Полученные значения показателей качества пересчитывались на абсолютно сухое вещество для исключения влияния на них различной массовой доли влаги в семенах, высушенных конвективным способом и с помощью СВЧ-энергоподвода.Погрешность при исследовании составляла: для кислотного числа – ± 0,4 мг КОН/г (ГОСТ 13496.18–85), перекисного числа – ± 0,04 % J_2 (МУ № 13–5–02/0657).Показателем количественного содержания свободных жирных кислот является кислотное число. Свободные жирные кислоты могут содержаться в растительном сырье (семена недозревших растений или семена, самосозревающие при хранении во влажном состоянии), а также образовываться в процессе выделения масла в результате частичного гидролиза триглицеридов (высшие жирные кислоты) и их окисления под действием света и при длительном хранении.Суммарное содержание свободных жирных кислот в растительных маслах определяет их кислотность.Кислотное число характеризует содержание в одном грамме растительного масла свободных жирных кислот (т. е. степень липолитической порчи жира (расщепления триглицеридов)) и других титруемых щелочью веществ и выражается в миллиграммах едкого калия, необходимого для их нейтрализации.

На основе данного показателя можно говорить о степени свежести масла. Он нормируется стандартами для большинства пищевых жиров [4].В соответствии с ГОСТ 8988–2002 кислотное число масла, содержащегося в семенах рапса, не должно превышать 6 мг КОН/г.В процессе сушки семян рапса различными способами кислотное число масла, содержащегося в семенах рапса, составляет: для конвективной сушки 4,5 мг КОН/г и комбинированной сушки с СВЧ-энергоподводом – 4,0 мг КОН/гПерекисное число – показатель, характеризующий изменение качества растительного масла, вследствие окислительной порчи жиров (прогоркание), особенно снижающие органолептические показатели. Перекисное число выражается количеством граммов йода, выделенного из йодистого калия перекисями, содержащимися в 100 г. масла. При повышении перекисного числа снижаются органолептические свойства масла и, как следствие, качество готового изделия [4].Согласно ГОСТ 8988–2002 показатель перекисного числа для рапсового масла не должен превышать 0,13 % J_2.Перекисное число для проб после конвективной сушки составляло 0,07 % J_2, а после комбинированной сушки с СВЧ-энергоподводом равно 0,05 % J_2По результатам исследований физико-химических показателей качества можно сделать вывод, что использование СВЧ-энергии позволяет улучшить показатели кислотного и перекисного числа рапсового масла.Таким образом, использование СВЧ-энергоподвода приводит не только к сокращению времени и энергозатрат на процесс сушки, но и к улучшению качества получаемого продукта.Для реализации технологии предложены энергоэффективные способы, конструкции сушилок, технологические схема и линия переработки семян рапса [5–11]

ЛИТЕРАТУРА

1. Климарев, С.И. Интенсификация физико-химических процессов СВЧ-энергией в СЖО [Текст] / С.И. Климарев. – М.: LAPLambert Academic Publishing, 2014. – 252 с.
2. Рензяева, Т.В. Продукты переработки рапса, рыжика, сурепицы [Текст] / Т.В. Рензяева. – М.: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 140 с.
3 Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник [Текст] / Под ред. член-корр. МАИ, проф. И.М. Скурихина и академика РАМН, проф. В.А. Тутельяна. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 236 с.
4. Харитонов, Ю.Я. Аналитическая химия (аналитика). Книга 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа [Текст] / Ю.Я. Харитонов. – М.: Высшая школа, 2001. – 560 с.
5. Kalashnikov, G.V. Energy-Efficient Combination Convective Drying Of Disperse Materials / Kalashnikov, G.V., Chernyaev, O.V. // Fibre Chemistry. Volume: 51. Issue: 4. – Pp: 289–292, Early Access: 2020, doi 10.1007/s10692–020–10098–6
6. Калашников Г.В. Сушилка термолабильного пищевого растительного сырья непрерывного действия [Текст] / Г.В. Калашников, О.В. Черняев // Материалы Международной научно-техн. конф. «Инженерия техники будущего пищевых технологий». – Воронеж: ВГУИТ, 2018. С. 95–98
7. Калашников, Г.В. Энергоэффективное технологическое оборудование для сушки растительного сырья [Текст] / Г.В. Калашников, О.В. Черняев // Энергоэффективность и энергосбережение в современном производстве и обществе: материалы международной научно-практ. конф. – Воронеж: ВГАУ им. императора Петра I», 2018. – С. 85–89
8. Калашников Г.В., Черняев О.В. Роторная сушилка / Пат. № 2647557 РФ, F26B 15/04. – Патентообладатель: ФГБОУ ВО ВГУИТ (RU). – № 2017116523; заявл. 12.05.2017; опубл. 19.03.2018. // Изобретения. Полезные модели. – 2018. – № 8
9. Калашников Г.В., Литвинов Е.В., Родионова А.Е., Рябикова С.А. Способ влаготепловой обработкой дисперсных материалов с использованием переменного комбинированного конвективно-СВЧ энергоподвода / Пат. № 2640848 РФ, F26B 25/22, G 05 D 27/00. – Патентообладатель: ФГБОУ ВО ВГУИТ (RU). – № 2016120689; заявл. 26.05.2016; опубл. 12.01.2018. // Изобретения. Полезные модели. – 2018. – № 2
10. Калашников Г.В., Черняев О.В. Ленточная сушилка / Пат. № 2702940 РФ, F26B 17/04. – Патентообладатель: ФГБОУ ВО ВГУИТ (RU). – № 2018142929; заявл. 05.12.2018; опубл. 14.10.2019 // Изобретения. Полезные модели. – 2019. – № 29
11. Калашников Г.В., Черняев О.В. Ярусная роторная сушилка / Пат. № 2703182 РФ, F26B 15/06. – Патентообладатель: ФГБОУ ВО ВГУИТ (RU). – № 2018142967; заявл. 05.12.2018; опубл. 16.10.2019 // Изобретения. Полезные модели. – 2019. – № 29

УДК 631.563.2

АНАЛИЗ ПРОТЕИНОВОГО СОСТАВА СЕМЯН РАПСА ПРИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ С СВЧ-СУШКОЙ

Е.С. Бунин, Г.В. Калашников, С.В. Макеев

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Одним из важных видов сельскохозяйственных культур, которые обладают большим потенциалом использования в пищевой промышленности и биотехнологии, а также получающим всё более широкое распространение в мире является рапс. Это весьма ценная культура с точки зрения, как физиологии питания человека, так и возможностей использования в различных сельскохозяйственных отраслях, техники и биоэнергетики [1, 2].

Ценность рапса для пищевой промышленности определяется высоким содержанием витамина Е и самым оптимальным соотношением всех физиологически важных жирных кислот, содержащихся в масле его семян, особенно ненасыщенной олеиновой кислоты, способствующей снижению уровня холестерина в крови и стимулирующей деятельность сердечно – сосудистой системы человека [3].

Благодаря значительному содержанию протеина и незаменимых аминокислот жмыхи и экстракционные шроты, получаемые в качестве побочных продуктов при производстве растительных масел, являются ценными кормовыми добавками [2, 4].

Наиболее перспективным направлением повышения эффективности процесса сушки растительного сырья и совершенствования технологии производства рапсового масла, а также рекуперации вторичного сырья при переработке семян рапса является использование СВЧ – энергии и активных гидродинамических режимов в виде закрученных потоков теплоносителя

Особенностями сушки растительного сырья при воздействии СВЧ – энергии являются мягкие «щадящие» режимы тепловой обработки с меньшей температурой в сравнении с конвективной сушкой и повышение качества высушиваемого материала [5].

Процесс сушки семян рапса может оказывать существенное влияние на их внешний вид, физико-химические, ароматические свойства, обусловленное возможностью осуществления биохимических реакций и, вследствие этого, изменением состава сырья. Поэтому сушка должна осуществляться при таких параметрах процесса, которые обеспечивают не только минимально возможные энергозатраты и наибольшую производительность, но и сохранность качества продукта.

Целью работы является определение протеинового состава семян рапса при биотехнологической переработке с различными способами сушки и СВЧ – обработки при обеспечении высокого качества высушенного изделия.

В качестве способов сушки семян рапса выбраны конвективная сушка и сушка с комбинированным СВЧ – энергоподводом.

Значения параметров процесса сушки были выбраны на основании проведенных экспериментальных исследований из диапазона оптимальных значений: влагосодержание 0,25 кг/кг, температура 355 К и мощность магнетрона 700 Вт.

Отбор проб семян рапса производили в соответствии с ГОСТ 13586.3–83, органолептические показатели – при естественном дневном освещении при комнатной температуре визуально и по ГОСТ 13340.1–77, определение массовой доли влаги – по ГОСТ 13496.3–92, определение белка – методом Кьельдаля по ГОСТ 1349.4–93 [4]. Полученные значения показателей качества пересчитывались на абсолютно сухое вещество для исключения влияния на них различной массовой доли влаги в семенах, высушенных конвективным способом и с комбинированным СВЧ – энергоподводом.

Коэффициент пересчета зависит от конечного влагосодержания или влажности продукта и для конвективной сушки при массовой доле влаги в высушенном продукте 0,1 кг/кг (9,1 %) составлял k= 1,10011, а для СВЧ – сушки (0,057 кг/кг или 5,4 % влаги в конечном продукте) k = 1,057082.

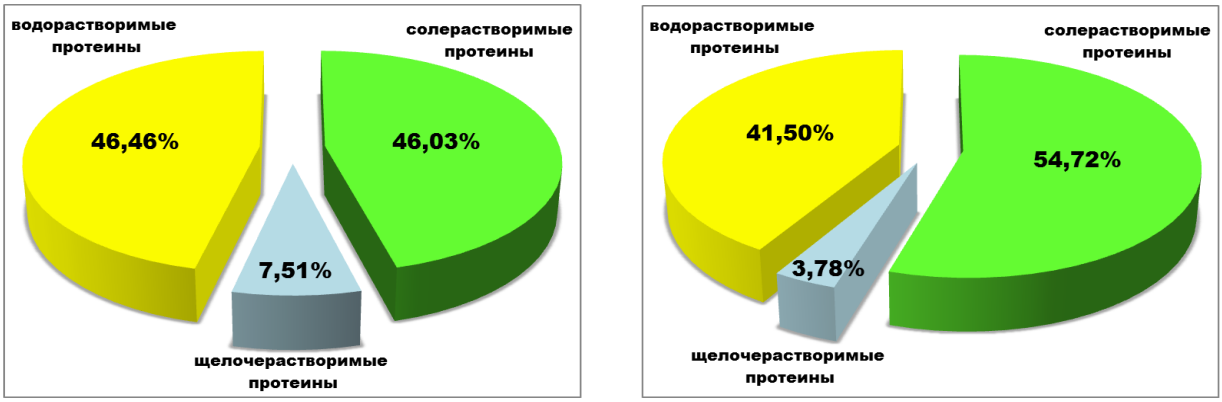
На основе экспериментальных исследований сушки конвективным способом и сушки с комбинированным СВЧ – энергоподводом определены физико-химические показатели качества семян рапса (табл. 1)

Таблица 1. Физико-химические показатели качества семян рапса, высушенных различными способами

Показатели	Конвективная сушка	Комбинированная сушка с СВЧ – энергоподводом
Массовая доля влаги, %	9,1	5,4
Сухие вещества, % масс.	90,9	94,6
Массовая доля водорастворимых протеинов, %, (% к общей сумме)	11,94 (46,46)	9,33 (41,5)
Массовая доля солерастворимых протеинов, %, (% к общей сумме)	11,83 (46,03)	12,3 (54,72)
Массовая доля щелочерастворимых протеинов, %, (% к общей сумме)	1,93 (7,51)	0,85 (3,78)
Суммарное содержание протеинов, % масс.	25,7	22,48

Погрешность при исследовании содержания протеинов не превышала 15 % (ГОСТ 1349.4–93).

На рисунке 1 представлены для наглядного сравнения диаграммы распределения по фракциям состава протеинов семян рапса, соответственно, высушенных конвективным способом и с комбинированным СВЧ – энергоподводом.



а б

Рис. 1: Диаграммы распределения по фракциям состава протеинов семян рапса, высушенных конвективным способом (а) и с комбинированным СВЧ – энергоподводом (б)

Анализ результатов (табл. 1 и рисунок 1) свидетельствуют о возможности перераспределения соотношения протеинов по фракциям в процессе сушки для различных способов осуществления процесса. Однако, существенного влияния на общее содержание протеинов в семенах рапса СВЧ – сушка не оказывает.

Таким образом, использование СВЧ – энергоподвода приводит к сокращению продолжительности сушки и обеспечивает стабильное качество высушенного изделия.

Для реализации технологии сушки растительного сырья и рекуперации вторичного сырья при биотехнологической переработке семян рапса предложены комбинированные способы сушки, конструкции сушилок, технологические схема и линия

ЛИТЕРАТУРА

1. Климарев, С.И. Интенсификация физико-химических процессов СВЧ-энергией в СЖО [Текст] / С.И. Климарев. – М.: LAPLambert Academic Publishing, 2014. – 252 с.
2. Рензяева, Т.В. Продукты переработки рапса, рыжика, сурепицы [Текст] / Т.В. Рензяева. – М.: Palmarium Academic Publishing, 2012. – 140 с.
3 Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник [Текст] / Под ред. член-корр. МАИ, проф. И.М. Скурихина и академика РАМН, проф. В.А. Тутельяна. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 236 с.
4. Харитонов, Ю.Я. Аналитическая химия (аналитика). Книга 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа [Текст] / Ю.Я. Харитонов. – М.: Высшая школа, 2001. – 560 с.
5. Калашников Г.В. Кинетика СВЧ – сушки яблок / Г.В. Калашников, Е.В. Литвинов // Вестник ВГУИТ. 2012. № 2. С. 40–42

УДК 615.322

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОРТА НИГЕЛЛЫ ДАМАССКОЙ И НИГЕЛЛЫ ПОСЕВНОЙ, АДАПТИРОВАННЫЕ К УСЛОВИЯМ КРЫМСКОГО ПОЛУОСТРОВА

В.С. Паштецкий[1], Ю.Н. Костанчук[1], В.С. Власова[1, 2], З.М. Хасанова[2], Л.А. Хасанова[2]

[1] Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия
[2] Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия

Растения рода Nigella L. семейства Лютиковых (Ranunculaceae) – ценное эфиромасличное, пряноароматическое и лекарственное сырье, используемое пищевой, косметической и медицинской промышленностью. Родина растений – Средиземноморье, они произрастают на территории Западной Европы, Северной Африки и Западной Азии, встречаются в Средней Азии и на Кавказе, а также в центральных районах Российской Федерации [2].

Род Nigella L. насчитывает свыше 20 видов, из которых в бывшем СССР описано 11. Все виды рода Nigella L. – однолетние травянистые растения, среди которых наиболее востребованы 2 вида – Нигелла дамасская (Nigella damáscena L.) и Нигелла посевная (*Nigella sativa* L.), ценность которых обусловлена высоким содержанием в их семенах жиров (31–35,5 %), белков (16–19,9 %), углеводов (33,9 %), клетчатки (4,5–6,5 %). Также в состав семян этих растений входят жирные и эфирные масла. Жирные масла состоят преимущественно из ненасыщенных жирных кислот (74,4–82,5 %), в том числе арахидоновой и эйкозадиеновой, в то время как насыщенные жирные кислоты составляют только 14,9–17,3 %. Содержание эфирных масел доходит до 1,4–1,9 %. В состав семян Нигеллы дамасской и Нигеллы посевной входят такие макроэлементы, как натрий, калий, магний и кальций, среди которых преобладает калий, и микроэлементы – медь, цинк, железо и марганец с преобладанием цинка [1 – 8].

В настоящее время производством семян данной культуры активно занимаются такие страны, как Индия, Пакистан, Иран, Египет [9]. Нигелла дамасская наряду с использованием в кулинарии, медицине и парфюмерии востребована в декоративном садоводстве. Однако в пищевой, косметической и медицинской промышленности наибольшее применение получила Нигелла посевная, народное название которой «черный тмин», «чернушка посевная», «девица в зелени», «калинджи», «сейдана» [4; 5]. Издревле семена черного тмина использовались в приготовлении хлебобулочных изделий, особенно в странах Ближнего Востока, Средней и Центральной Азии. Следует отметить, что аромат и вкус семян черного тмина более жгучий, перечный, тогда как семена Нигеллы дамасской имеют приятный мускатно-земляничный аромат и менее терпкий вкус. В отличие от перца, семена нигеллы не раздражают слизистую оболочку желудка, в связи с чем, могут применяться в рационе людей с заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

Масло из семян Нигеллы посевной или масло черного тмина – мощнейший антиоксидант, который при систематическом употреблении повышает защитные свойства организма. Оно используется как высокоэффективное иммуностимулирующее, гипотензивное, желчегонное, мочегонное, мягкое слабительное, противоопухолевое, болеутоляющее средство, а также средство, нормализующее работу желудочно-кишечного тракта, снижающее уровень холестерина в крови, подавляющее бактериальную и грибковую микрофлору, оказывающее антигельминтное, противовоспалительное и ранозаживляющее действие, дающее великолепные результаты в лечении различных дерматологических заболеваний. Такая высокая биологическая активность масла черного тмина обусловлена уникальной композицией полиненасыщенных жирных кислот, в частности, олеиновой и линолевой, наличием п-цимена и лимонена, практически отсутствующих в Нигелле дамасской [1 – 8].

Жирное масло двух видов нигеллы отличается по органолептическим характеристикам. Масло из семян Нигеллы дамасской – светло коричневого цвета, прозрачное, имеет приятный запах и вкус. Масло из семян Нигеллы посевной – часто темно коричневого или черного цвета, отличается резким запахом и очень горьким вкусом, что связано с содержанием в его составе эфирного масла тимохинона, придающего маслу черного тмина очень горький вкус, и обеспечивающее его противоопухолевое действие.

В отделе селекции и семеноводства ФГБУН «НИИСХ Крыма» наряду с традиционными овощными культурами (томат, перец, баклажан, лук) ведется селекционная работа и с малораспространенными эфиромасличными и пряно-вкусовыми культурами.

Основная задача селекции таких растений – создание сортов, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам, для широкого спектра применения – пищевого, декоративного и лекарственного. Наличие перспективных видов, значительное количество исходного материала из различных регионов произрастания, положило начало селекционной работе по созданию сортов нигеллы, адаптированных к условиям Крымского полуострова с ценными хозяйственными признаками, высокими показателями химического состава жирного масла. Результатом этой работы стало создание сорта Нигеллы дамасской «Ялита» и сорта Нигеллы посевной «Крымчанка». По данным сортам поданы заявки на получение патентов. Сорт «Ялита» уже внесен в Реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории РФ. Сорт «Ялита» – раннеспелый, от всходов до потребительской готовности зеленой массы 30–35 суток и созревания семян 105–110 суток. Куст прямостоячий, сомкнутый, высотой 30–35 см, с ветвящимися вертикальными побегами I порядка и с темно-зелеными трояко-перистыми листьями, рассеченными на доли, цветками голубой окраски, зелеными нектарниками околоцветников и плодами в виде сегментированной округлой коробочки с угловатыми выступами. Зеленая масса листьев, которая может использоваться в салатах, содержит: сухое вещество – 18,8 %, каротина – 40,9 мг %, витамина С – 42,8 мг %. Урожайность зеленой массы – 320 ц/га. Урожайность семян на богаре – 4,5 ц/га, на капельном поливе – до 7 ц/га. Семена обладают мускатным запахом, в них содержатся около 0,8 % эфирного масла и около 40 % жирного масла. Сорт «Крымчанка» – раннеспелый, от всходов до потребительской готовности зеленой массы 30–35 суток, до цветения 55–57 и созревания семян 110–115 суток. Куст прямостоячий, сомкнутый, высотой 45–55 см, с вертикальными побегами первого порядка с зелеными двояко-трояко рассеченными листьями на доли, мелкими цветками белой окраски, зелеными нектарниками околоцветников и одиночными плодами в виде сегментированной округлой коробочки с угловатыми выступами. Урожайность зеленой массы – 250 ц/га. Урожайность семян на богаре – 3,4 ц/га, на капельном поливе – до 5,5 ц/га. Семена обладают пряно-перечным запахом, в них содержатся около 0,8 % эфирного масла и около 39 % жирного масла. Потенциальная продуктивность семян от 2,1 до 5,1 г с 1 растения.

В настоящее время в отделе переработки и стандартизации эфиромасличного сырья ФГБУН «НИИСХ Крыма» помимо выращивания элитных семян данных сортов Нигеллы дамасской и Нигеллы посевной, изучаются качество семян и, соответственно, полученных из них методом холодного прессования жирного масла и методом паровой дистилляции эфирного масла.

Следует отметить, что жирное масло, полученное методом холодного прессования из семян сортов «Ялита» и «Крымчанка» сохраняет в своём составе практически все витамины, ферменты и микроэлементы. По содержанию основных жирных кислот, таких как пальмитиновая, пальмитолеиновая, стеариновая, а также «Омега-9» и «Омега-6», данные сорта практически не отличаются. Наблюдается разница в составе и количестве основных компонентов эфирного масла.

Таким образом, создание адаптированных к условиям Крымского полуострова сортов нигеллы с ценными хозяйственными признаками предполагает последующую разработку технологии их промышленного возделывания с формированием необходимой методической и нормативной документации (соответствующие инструкции по выращиванию и переработке растений, технические условия на семена и полученные из них жирные и эфирные масла).

ЛИТЕРАТУРА

1. Исакова, А.Л. Нигелла – перспективная эфиромасличная культура / А.Л. Исакова, А.В. Исаков // Наше сельское хозяйство. – 2016. – № 11. – С. 83–85.
2. Исакова, А.Л. Методика проведения искусственной гибридизации нигеллы посевной (Nigella sativa L.): рекомендации / А.Л. Исакова, А.В. Исаков, В.Н. Прохоров. – Горки: БГСХА. – 2018. – 20 с.
3. Исакова, А.Л. Особенности роста и развития нигеллы дамасской (Nigella damascena) и нигеллы посевной (Nigella sativa) в условиях Беларуси // Вестник Белорус. гос. сельхоз. акад. – 2015. – № 2. – С. 60–64.
4. Кароматов, И.Д. Чернушка посевная – новая жизнь древнего лекарственного растения / И.Д. Кароматов, Д.С. Кобилова // Биология и интегративная медицина. – 2018. – № 2(19). – С. 248–260.
5. Рогожин, Е.А. Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования / Е.А. Рогожин // Изд.: Федеральный научный центр овощеводства». – 2016. – № 12. – С. 253–255.
6. Сампиев, А.М. Фитохимическое изучение семян чернушки посевной /А.М. Сампиев, Н.К. Рудь, Н.А. Давитавян. – Краснодар: Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5. – 114 с.
7. Шлаш, М. Онтогенез и перспективы рационального использования чернушки посевной (Nigella sativa L.) в условиях Сирии // Всерос. науч.-исслед. ин-т растениеводства им. Н.И. Вавилова РАСХН. – СПб. – 2004. – 18 с.
8. Ansari, A.K. Structural studies on a saponin isolated from the seeds of Nigella sativa / A.K. Ansari, H.A.S. Sadiy // Phyto chem. – 1989. – Vol. 7. – P. 377.
9. Datta, Animesh K. Black cumin (Nigella sativa L.) – a review / Animesh K. Datta, Aditi Saha, Arnab Bhattacharya // Journal of plant development sciences. – 2012. – Vol. 4. – P. 1–43.

УДК 664.87:542.47

СОДЕРЖАНИЕ НИТРАТОВ И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В КОРНЕПЛОДАХ МОРКОВИ ПРИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ

Г.В. Калашников, О.В. Черняев

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Безотходная технология переработки моркови и производство морковных полуфабрикатов требуют интенсификации технологических процессов и разработки эффективного аппаратурного оформления. При этом важной является задача сохранности пищевой ценности овощного сырья и повышения безопасности готовой продукции при отсутствии химических загрязнений в виде нитратов.

Цель работы – определение закономерности распределения нитратов в корнеплодах моркови при разработке технологии производства продуктов функционального и лечебно-профилактического назначения на основе моркови, соков и морковных полуфабрикатов.

Экспериментально изучена динамика изменения содержания нитратов в свежих корнеплодах моркови на основе экспресс-анализа и выполнена оценка их распределения по поперечному и продольному сечениям корнеплодов моркови.В качестве образцов использовались свежие корнеплоды моркови сортов «Каротель», «Нантская» Воронежской и Липецкой областей. Анализ содержания нитратов осуществлялся на основе измерения проводимости переменного высокочастотного тока в измеряемом объекте. При этом распределение нитратов корнеплодов моркови проверялось прибором «Soeks» с диапазонами измерения содержания нитратов – 20…5000 мг/кг и рабочих температур – от 293 до 333 К. Содержание нитратов оценивалось в соответствии с нормами СанПин 2.3.2 1078–01.Требования к образцам: проверяемое сырье должно быть чистым, без грязи на поверхности; сырье подвергалось мойке без использования моющих средств, только чистой водой; сырьё не должно быть высохшим; сырьё не должно иметь следов от ударов и внешних участков, подпорченных гнилью; срез сырья должен быть сделан и использован в течение не более 900 с.Норма предельно допустимой концентрации (ПДК) содержания нитратов в моркови поздних сортов составляет 250 мг/кг. Внутри корнеплодов моркови, по поперечному и продольному сечениям, распределение содержания нитратов характеризовалось повышенной неоднородностью. Для исследуемых образцов содержание нитратов составляло от 155 до 615 мг/кг.Для продольного сечения вдоль центральной части, соответствующей сердцевине корнеплода, содержание нитратов также было неоднородным и составляло от 186 мг/кг до 445 мг/кг. Например, в стопочной части, ближе к ботве, содержание нитратов составляло (186..325) мг/кг. В хвостовой части исследуемых объектов это содержание находилось в пределах (372..445) мг/кг. На периферийных участках поперечных сечений исследуемые образцы имели содержание нитратов от 156 до 197 мг/кг.Отмечено, что в отдельных исследуемых образцах сечения внутренней структуры корнеплодов моркови отличались белыми участками и желтыми прожилками. Для этих участков содержание нитратов составляло от 380 до 615 мг/кг. На периферийных участках оно равно (380..400) мг/кг, для центральной части содержание нитратов составляло (568..615) мг/кг. Белые участки хвостовой части исследуемых объектов также характеризовались повышенным фоном содержания нитратов (550..600) мг/кг. При этом зоны внутренних участков, подпорченных гнилью, характеризовались содержанием вредных веществ около 550 мг/кг и выше. Это позволяет сделать предположение о взаимосвязи светлых зон и прожилок внутри корнеплодов моркови с повышенным содержанием нитратов, а также быстрым снижением качества сырья вследствие наличия участков, подпорченных гнилью.Анализ экспериментальных данных показал повышенное наличие нитратов практически во всех исследуемых образцах. В центральной части моркови содержание нитратов составляло от 186 до 609 мг/кг.Таким образом, результаты измерения содержания нитратов в отдельных образцах сортов «Каротель», «Нантская» превышали установленную норму ПДК более, чем на 50 %, что соответствовало опасной концентрации нитратов. Отмечена неравномерность распределения нитратов в образцах моркови, что должно быть учтено при реализации машинных технологий переработки сырья, особенно при производстве соков прямого отжима и получения изделий из моркови без влаготепловой обработки корнеплодов.

УДК 664

ОДНОКЛЕТОЧНАЯ ЗЕЛЕНАЯ МИКРОВОДОРОСЛЬ CHLORELLA КАК ОСНОВА ПРОДУКТОВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Р.И. Абдрахманова, Л.Ф. Ахмадеева, Б.Ж. Баймурзина, Д.А. Булкова, Б.Ш. Ишмуратова, Г.Ш. Казыханова, Н.В. Калинина, З.Ю. Ибрагимова, З.Н. Кашапова, А.С. Муканова, О.Н. Мухина, А.М. Нафикова, Р.Х. Нигматуллин, С.А. Николаева, М.Н. Рахмангулов, Э.Ю. Страхова, З.Н. Сулейманова, Л.А. Сулейманова, А.А. Харрасов, В.Г. Хасанов, А.К. Шарипова, О.В. Черноусова, Л.А. Гайсина, З.М. Хасанова, Л.А. Хасанова

Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия

Современные динамичные изменения в производстве и потреблении продуктов питания диктуют новые подходы к их разработке с учетом основных мировых тенденций, демонстрирующих, в частности, переход от массового стандартизированного производства и потребления пищевых продуктов к индивидуальному и персонифицированному с использованием оригинальных и физиологически значимых для организма человека ингредиентов в качестве основы специализированных и функциональных продуктов питания [1; 9; 11]. К таковым, несомненно, можно отнести микроскопическую одноклеточную зелёную протококковую водоросль хлореллу (Chlorella), для нормального роста и развития которой необходимы вода, минеральные вещества, углекислый газ и кислород, при этом в оптимальных условиях водоросль демонстрирует интенсивный рост и за короткий промежуток времени может дать существенный выход биомассы в разы превышающий данный показатель у высших растений [15]. Применение хлореллы в пищевой индустрии и аграрном производстве в качестве основы или пищевой добавки для продуктов питания человека и кормов сельскохозяйственных животных связано с высоким содержанием в ней биологически ценных веществ. Более половины биомассы хлореллы составляет белок, содержащий все незаменимые аминокислоты (валин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан), причем по калорийности хлорелла приравнивается к шоколаду, а по выходу белка с 1 га она превосходит злаковые культуры в пятьдесят раз, при этом белок хлореллы по своей питательной ценности в два раза превосходит соевый белок и равноценен белку сухого молока или мяса [2; 17; 25]. Будучи фототрофным микроорганизмом хлорелла содержит 1–4 % хлорофилла. Она богата липидами, пищевыми волокнами, витаминами и микроэлементами, особенно витаминами групп В, С, РР, Е, К, каротином (провитамином А) и такими макро- и микроэлементами, как калий, магний, фосфор, железо, бром, йод, радий, кобальт [12; 17; 25]. Хлорелла проявляет выраженную антиоксидантную, противовоспалительную, детоксицирующую, антимикробную и противоопухолевую активность, обладает иммуностимулирующим и протекторным действием [19; 20; 22; 23; 25–27]. Так, антиоксидантные свойства хлореллы выше, чем у многих овощей, например, таких как капуста, сельдерей, шпинат. Лютеин и β-каротин хлореллы могут стать богатым источником этих веществ для человека и эффективным средством профилактики и лечения глазных болезней, в частности, макулярной дегенерации глаза и катаракты [24]. Важно отметить, что биохимический состав хлореллы в значительной степени определяется условиями выращивания, поскольку изменения компонентов её питательной среды может привести к получению биомассы желаемого состава с различным соотношением белков и жиров. Так, на среде, богатой азотом, хлорелла накапливает преимущественно протеины и незначительное количество липидов, при недостатке же азота и избытке углерода в питательной среде, наоборот, превалируют липиды при низком содержании протеинов [12; 15; 17]. Высокая урожайность хлореллы и относительно несложная технология выращивания предполагают её активное использование в разработке специализированных и функциональных продуктов питания [7; 8]. В настоящее время на кафедре биоэкологи и биологического образования БГПУ им. М. Акмуллы» ведутся исследования по оценке влияния условий культивирования на прирост биомассы одноклеточной зеленой протококковой водоросли Chlorella vulgaris Bejerinck [18]. Нами же был проведен поиск патентной и нормативной документации по продуктам питания на основе хлореллы с целью последующего использования данной информации при разработке продуктов специализированного и функционального назначения. Анализ имеющихся данных показал, что хлорелла может добавляться в продукты питания и, в частности, напитки для повышения их пищевой ценности, делая полезными для организма человека. Патентный поиск продемонстрировал, что значительная доля мировых исследований этой микроскопической водоросли с целью её пищевого использования проводится в таких странах, как США, Япония, Китай и Россия [3; 6; 10; 21; 28–30]. Так, в Японии хлореллу повсеместно добавляют в пищевые продукты, такие, как хлеб и молоко, что, безусловно, является одним из факторов, обеспечивающих японцам устойчивое лидерство по средней продолжительности жизни на планете. В пределах Таможенного союза, охватывающего страны СНГ, продукты из хлореллы в качестве биологически активных добавок включены в технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011), утвержденный решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 № 880. Существуют специальные санитарные требования, включающие в себя продукты из этой водоросли (СанПиН 2.3.2.1078–01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов». Приложение 5а «Биологически активные вещества, компоненты пищи и продукты, являющиеся их источниками, не оказывающие вредного воздействия на здоровье человека при использовании для изготовления биологически активных добавок к пище») [5; 14]. В России продукты из хлореллы чаще всего применяются для животных.

Существует относительно большое количество технических условий для их изготовления: ТУ 10.91.10–298–37676459–2017, ТУ – 298 – 2017 (суспензии и гранулы из хлореллы), ТУ – 318 – 2015 (лакомства для животных, включающие в себя добавки из хлореллы). В 2017 г. НПЦ «Агропищепром» разработал для ООО НПО «Альгобиотехнология» технические условия «Сырье. Суспензия, паста, порошок, гранулы, таблетки из хлореллы» (ТУ – 03.11.63–001 – 99803661–2017), согласно которым ООО НПО «Альгобиотехнология» выпускает линейку продукции на основе биомассы зеленых водорослей Chlorella kessleri. В 2018 г. сотрудничество между двумя научными центрами привело к разработке линейки бионапитков Chlorephyta (хлорефита) [13].

Таким образом, анализ изученных данных показал целесообразность и перспективность использования одноклеточной зелёной протококковой микроводоросли Chlorella в качестве добавки или основы при разработке продуктов питания специализированного и функционального назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бибик, И.В. Напитки функционального назначения на основе растительного сырья // Пиво и напитки.2013.№ 1.С. 12–14.
2. Богданов, Н.И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных.Пенза, 2007.48 с.
3. Богданов, Н.И. Патент RU 2 613 424 C1. Планктонный штамм Chlorella kessleri, предназначенный для получения биомассы.
4. Бруннек, Н.И. Технология приготовления напитков в общественном питании [Текст]: монография / Н.И. Бруннек, А.Т. Морозов, Г.Н. Ловачева.М.: Экономика, 1980.96 с.
5. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов СанПин 2.3.2.1078–10.
6. Грабарник, В.Е., и др. Патент RU 2 644 653 C1. Планктонный штамм Chlorella vulgaris, предназначенный для получения пищевой биомассы.
7. Жумадилова, Ж.Ш. и др. Совершенствование способов получения биомассы из микроводорослей в условиях Кызылординской области Республики Казахстан // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Биологические науки.2016.№ 10.С. 246–248.
8. Жумадилова, Ж.Ш. и др. Культивирование микроводоросли с целью получения биомассы в лабораторных условиях // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. Биологические науки.2015.№ 10.С. 838–839.
9. Ермолаева, Г.А. Пищевые добавки в производстве напитков / Г.А. Ермолаева // Пиво и напитки.2000.№ 6.С. 20–23.
10. Коротенин, М.А., Богданов, Н.И. Патент RU 2 726 111 C1. Планктонный штамм Parachlorella kessleri, предназначенный для получения пищевой продукции.
11. Кунакова, Р.В. и др. Здоровое питание XXI века: функциональные продукты питания и нутригеномика // Вестник Академии наук РБ.2016.Т.21.№ 3 (83).С. 5–14.
12. Маслов Ю.И. Условия синтеза липидов в культурах хлореллы // [Текст]: Автореферат дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Ленингр. гос. ун-т им. А.А. Жданова.Ленинград, 1967.21 с.
13. Научно-производственный центр «Агропищепром». Режим доступа: https://agropit.ru/
14. Перечень стандартов, в результате применения которых на добровольной основе обеспечивается соблюдение требований технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011).
15. Стрешинская, Г.М. Состав различных штаммов зеленой водоросли Chlorella / Г.М. Стрешинская, М.В. Пахомова, К.В. Косиков // Прикладная биохимия и микробиология.1967.Т. 3.№ 4.С. 477–481.
16. Текебаева, Ж.Б. и др.Аккумулирующие свойства микроводорослей Chlorella vulgaris И2 и Parachlorella kessleri У1 по отношению к поллютантам различного происхождения // Вестник. Серия Биологическая. Experimental biology.2018.№ 4(77).С. 107–115.
17. Чаплыгина, О.С. Функциональный напиток на основе суспензии клеток Chlorella vulgaris / О.С. Чаплыгина, С.А. Сухих // Актуальные вопросы индустрии напитков.2017.№ 1.С. 134–136.
18. Allaguvatova, R. A simple method for the cultivation of algae Chlorella vulgaris Bejerinck // R. Allaguvatova, Y. Myasina, V. Zakharenko, L. Gaysina / ECOBALTICA. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.2019.№ 390.P. 1–5.
19. Hasegawa, T. Augmentation of the resistance against Listeria monocytogenes by oral administration of a hot water extract of Chlorella vulgaris in mice // Immunopharmacol Immunotoxicol.1994.№ 16.P.191–202.
20. Hasegawa, T. Hot water extracts of Chlorella vulgaris reduce opportunistic infection with Listeria monocytogenes in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses / T. Hasegawa, M. Okuda, M. Makino, K. Hiromatsu, K. Nomoto, Y. Yoshikai // Int J Immunopharmacol.1995.№ 17.P.505–512.
21. Keijiro Uchino, Kizugawa. Patent No.: US 7,914,832 B2. Method for producing Chlorella fermented food.
22. Konishi, F. Antitumor effect induced by a hot water extract of Chlorella vulgaris (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes // Cancer Immunol Immunother.1985.№ 19.P.73–78.
23. Miranda, M.S. Antixoidant activity of the microalage Chlorella vulgaris cultured on special conditions / M.S. Miranda, S. Sato, J. Mancini-Filho // Boll Chim Farm.2001.№ 140.P.165–168.
24. Shibata, S. Antioxidant and anticataract effects of Chlorella on rats with streptozotocin induced diabetes // J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).2003.№ 49(5).P. 334–339.
25. Shim, J.Y. Protective effects of Chlorella vulgaris on liver toxicity in cadmium administered rats / J.Y. Shim, H.S. Shin, J.G. Han, H.S. Park, B.L. Lim // J Med. Food.2008.№ 11(3).P. 479–485.
26. Tanaka, K. Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae Chlorella vulgaris / K. Tanaka, F. Konishi, K. Himeno, K. Taniguchi, K: Nomoto // Cancer Immunol Immunother.1984.№ 11.P. 90–94.
27. Tanaka, K. Oral administration of Chlorella vulgaris augments concomitant antitumor immunity / K. Tanaka, Y. Tomita, M. Tsuruta, F. Konishi, M. Okuda, K. Himeno, K. Nomoto // Immunopharmacol Immunotoxicol.1990.№ 12.P. 277–291.
28. Timothy Nicholas Ray. Patent App. Pub. No.: US 2004/0185063 A1. Broken cell wall Chlorella and process for preparation thereof.
29. Ting-Jung Lin, Mei-Hua Huang. Patent App. Pub. No.: US 2018 / 0333445 A1. Method for preparing fresh Chlorella drink and use of the fresh Chlorella drink.
30. Yoshio Nakajima, Yoko Kondo. Patent No.: US 9,060,542 B2. Chlorella extract-containing product and method for improving the storage stability of the same

УДК 638.14(470.57)

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА МЕДА И ПЕРГИ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОНАПИТКОВ И НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

В.Н. Саттаров[1], Р.Г. Фархутдинов[2], З.М. Хасанова[1], З.З. Харрасова[1], Л.Ю. Кулбахтина[2], А.В. Харрасов[1], Л.А. Хасанова[1]

[1] Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, Россия
[2] Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

В настоящее время наблюдается особый потребительский интерес к так называемым напиткам здоровья, бионапиткам и напиткам функционального назначения, в составе которых лежат физиологически значимые для организма человека ингредиенты. Одним из наиболее доступных и популярных у массового российского потребителя продуктов здорового питания является мёд, содержащий широкий спектр биологически активных веществ, который наряду с другими пчелопродуктами, такими, например, как перга, может быть великолепной основой для функциональных напитков, напитков здоровья и бионапитков: тонизирующих, антистрессовых, диетических, активизирующих обменные процессы, улучшающих работу отдельных систем (сердечнососудистой, опорно-двигательной, пищеварительной, выделительной) и органов, поэтому создание оригинальных рецептур, бионапитков, напитков здоровья и напитков функционального назанчения на основе качественных продуктов пчеловодства, а также их адаптация к современным условиям потребительского рынка представляет особый интерес [3–9].

В связи с этим в ГБУ «Башкирский научно-исследовательский центр по пчеловодству и апитерапии» проводили исследование органолептических и физико-химических показателей качества мёда (массовая доля воды, диастазное число и ботаническое происхождение) и перги (содержание окисляемых веществ, массовая доля воды и воска) из разных районов Республики Башкортостан на их пригодность для производства бионапитков, напитков здоровья и напитков функционального назанчения [1; 2].

Были отобраны образцы мёда из разных районов Республики Башкортостан. Результаты исследований качества мёда сбора 2018 г. по отдельным районам его происхождения: северо-западные (Бакалинский, Дюртюлинский, Илишевский, Краснокамский, Мишкинский, Татышлинский, Чекмагушевский, Шаранский), северо-восточные (Караидельский, Кигинский, Мечетлинский), центральные (Иглинский, Кушнаренковский), западные (Бижбулякский, Благоварский, Буздякский, Давлекановский, Кармаскалинский). юго-восточные (Абзелиловский, Баймакский, Белорецкий, Бурзянский, Зианчуринский, Учалинский), южные (Аургазинский, Куюргазинский, Мелеузовский, Фёдоровский) показали соответствие исследованного мёда ГОСТ 19792–2017 «Мед натуральный. Технические условия» по органолептическим и физико-химическим показателям. Также были изучены органолептические и физико-химические характеристики перги сбора 2017 г. из пяти районов Республики Башкортостан (Белорецкого, Зианчуринского, Кугарчинского, Мечетлинского, Татышлинского), показавшие соответствие исследованного сырья ГОСТ 31776–2012 «Перга. Технические условия».

Таким образом, проведённый анализ мёда и перги Республики Башкортостан по органолептическим и физико-химическим показателям продемонстрировал высокое качество как мёда, так и перги, и пригодность данных пчелопродуктов для производства бионапитков, напитков здоровья и напитков функционального назанчения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ишемгулов, А.М. Пыльценосные растения Башкортостана: справочник / – Уфа: Информреклама, 2012. – 336 с.
2. Ишемгулов, А.М. Рациональное размещение пчелиных семей с учетом медоносных ресурсов по административным районам Республики Башкортостан / А.М. Ишемгулов. – Уфа: Мастер–Копи, 2004. – 61 с.
3. Помозова В.А. Новые виды медовых напитков / В.А. Помозова // Пиво и напитки. – 2001. – № 2. – С. 74–75.
4. Помозова, В.А. и др. Производство слабоалкогольных сброженных напитков на основе мёда / // Совершенствование технологии и оборудования производства алкогольной, слабоалкогольной и безалкогольной продукции и методов анализа их качества: материалы международной научно-практической конференции. – Минск, 2004. – С. 53–55.
5. Севостьянова, Н.Н. Лечение мёдом и продуктами пчеловодства / Москва: РИПОЛ классик, 2012. – 64 с.
6. Хасанова, З.М. и др. Эконапиток на основе башкирского мёда и яблочного уксуса // Пчеловодство. 2017. № 8. – С. 51–53.
7. Хасанова, Л.А. и др. Функциональные напитки на основе натурального мёда и пищевого растительного сырья/ // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3. – С. 318–319.
8. Яковлева, И.Н. Мёд: применение для производства напитков, свойства и характеристики // Индустрия напитков, 2005. – Ч. 1. – № 6(42). – С. 66–69.
9. Яковлева, И.Н. Разработка технологии сброженного напитка на основе мёда и пряно-ароматического сырья с высоким сроком годности: дис… канд. техн. наук: 05.18.07. – Санкт Петербург, 2009. – 181 с.

УДК 579.65

БИОИНОКУЛЯНТЫ НА ОСНОВЕ РИЗОСФЕРНЫХ STREPTOMYCES ДЛЯ УСТОЙЧИВОГО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Тинатин Доолоткелдиева, Сандра Тынчтыкбек Кызы

Кыргызско-Турецкий Университет Манас, Кафедра Защиты Растений, город Бишкек, Кыргызстан

Кыргызская Республика обладает значительным потенциалом для выращивания зерновых, овощных и плодовых культур. С 2004 года в Кыргызстане производство экологически чистой продукции начинает интенсивно расти. Для успешного внедрения экологически чистого производства фермеры должны использовать методы и приемы, характерные для органического сельского хозяйства.

Микробные инокулянты и технологии могут быть использованы в свободным от химикатов сельском хозяйстве, заменяя вредные пестициды, химические удобрения биологическими средствами защиты сельскохозяйственных культур и повышения урожайности. Зарегистрировано более 22 000 биологически активных соединений микробного происхождения, из которых 7600 продуцируются актиномицетами рода Streptomyces [Demain and Sanchez, 2009; Bérdy, 2005; Lam, 2007]. Кроме того, 70 % всех известных антибиотиков были обнаружены у штаммов Streptomyces [Demain, 2010, Labeda et al., 2012].

Почвенные и ризосферные бактерии рода Streptomyces проявляют все больший интерес к исследователям из-за их огромного количества вторичных метаболитов: антибиотиков, витаминов, алкалоидов, факторов роста растений, ферментов и ингибиторов ферментов, применяемых в сельском хозяйстве, из-за их потенциала в биоконтроле и вклада в получении здоровой органической продукции [Copping and Menn, 2000; Adegboye and Babalola 2012; Goudjal et al. 2014; Vijayabharathi et al. 2015; Couillerot et al. 2013; Jog et al. 2016; Shrivastava and Kumar 2018; Hopwood 2007; Barka et al. 2016]. Еще одно полезное свойство актиномицетов, они играют важную роль в самоочищении почв от болезнетворных микроорганизмов, они способны дольше оставаться в почве, оказывать подавляющее действие на другие группы микроорганизмов, создавать плодородие почвы, способны солюбилизировать фосфат в почвах с дефицитом фосфата.

Настоящее исследование было направлено на оценку in vitro и in vivo потенциала штаммов Streptomyces в отношении различных бактериальных и грибковых фитопатогенов зерновых, овощных и плодовых культур, для улучшения плодородия почвы и роста растений во время вегетации, для борьбы с проблемами, связанными с загрязнением окружающей среды и глобального потепления.

Штаммы Streptomyces из лабораторной коллекции отделения защиты растений, обладающие широким спектром антимикробной активности против грибковых и бактериальных фитопатогенов были использованы. Для этого исследования мы выбрали штаммы, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Происхождение и характеристики штаммов Streptomyces, использованных в этом исследовании

Название штамма	Место выделения	Культуральные характеристики на КАА
Streptomyces diastatochromogenes sk-6	Из ризосферы дикорастущего растения в долине Сон-Куль, на высоте 3200 м над уровнем моря	Образует воздушный мицелий с бело-желтоватым цветом; со специфическим запахом
Streptomyces alfalfae, CI-4	Из ризосферы дикорастущего растения в долине Сон-Куль, на высоте 3200 м над уровнем моря	Образует воздушный мицелий светло-зеленого цвета; со специфическим запахом
Streptomyces sp. Pch-3	Из почвы опытного поля сельскохозяйственного факультета КТУ "Манас"	Образует воздушный мицелий темно-серого цвета, субстратный мицелий темно-красного цвета
Streptomyces mediolani Pat -3	Из ризосферы дикорастущего растения в долине Сон-Куль, на высоте 3200 м над уровнем моря	Образует воздушный мицелий белого цвета, субстратный мицелий розового цвета
Streptomyces lividans TR-59	Из почвы опытного поля сельскохозяйственного факультета КТУ "Манас"	Образует воздушно-сине-фиолетовый мицелий и темно-синий цвета субстратный мицелий.

Патогенные бактерии (Erwinia carotovora, Erwinia amylovora, Pseudomonas syringae, Ralstonia solanacearum), выделенные из пораженных органов растений, хранились в стерилизованном питательном бульоне при – 20^0 С. Патогенные грибы (Alternaria tenuissima, Fusarium graminearum, Venturia inaequalis и Monilia fructicola, Aspergillus sp.), Выделенные из пораженных органов растений, хранились на картофельно – декстрозном агаре (PDA) при 4° С.

Жидкие образцы биопрепарата на основе Streptomyces sp.получали при глубинном культивировании в биореакторе (LAMBDA Laboratory Instruments, CZ, 7 л). Через 72 ч.инкубации, фильтрованный стерильный бесклеточный супернант или клетки использовали для дальнейших экспериментов.

Фосфаторастворимую активность штаммов Streptomyces определяли в питательной среде, содержащей в своем составе Ca3 (PO4) 2 (NBRIP) в качестве единственного источника фосфора. В эту среду проделали лунки размером 1 $см^2$ и в каждую лунку выливали 1 мл супернанта штаммов Streptomyces и инкубировали при 30° C в течение 2 недель. Образование зоны гидролиза вокруг колоний указывало на растворимость фосфата. Среди всех протестированных штаммов два – Streptomyces alfalfae C1–4 и Strep. lividans TR-59 продемонстрировали наивысшую активность солюбилизации фосфатов, образуя прозрачный ореол вокруг лунок со суспензией, у других испытанных штаммов, прозрачного ореола не наблюдалось (рис. 1). Эти результаты показывают, что штаммы Streptomyces способны продуцировать органическую глюконовую кислоту в окружающую среду, которая отрицательно заряженный нерастворимый фосфат через его карбоксильную группу превращает в растворимые и доступные для растения формы.



A B C

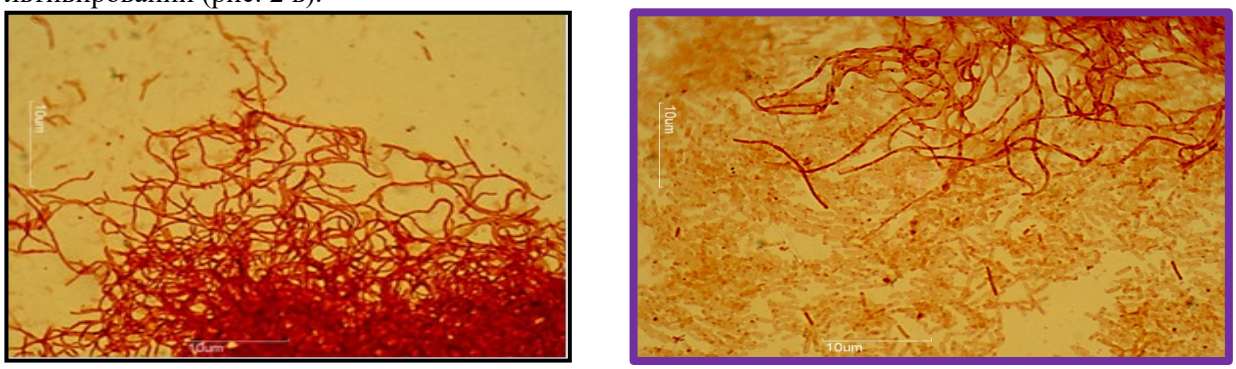
Рис. 1. Прозрачный ореол вокруг лунок штамма Strep.alfalfae CI-4 (a); прозрачный ореол вокруг лунок штамма Strep.lividans TR-59 (b) и штамм Streptomyces wedmorensis KK-4 не показал ореола (c)

Для определения присутствия летучих метаболитов Streptomyces и влияния на развитие мицелия фитопатогенных грибов без контакта использовали герметичную систему в чашках Петри с тонкой мембраной Parafilm. С одной стороны мембраны выращивали колонии штамма Streptomyces, с другой – фитопатогенные грибы – Alternaria.tenuissima, Fusarium graminearum и Aspergillus spp. Их инкубировали в такой герметичной системе в течение 3–10 дней. В контрольной системе колонии фитопатогенных грибов выращивали на среде без посева биологических агентов. После 92-часовой инкубации все протестированные штаммы Streptomyces подавляли рост Fusarium graminearum, причем возбудитель проявлял высокую чувствительность к летучим метаболитам Streptomyces после бесконтактного воздействия. Кроме того, штаммы Streptomyces lividans Tr-59 и Streptomyces medioloni Pat-3 показали высокую степень (90–95 %) противогрибковой активности против фитопатогенных грибов, таких как Alternaria.tenuissima, Rhisoctonia solani и Aspergillus spp.путем ингибирования роста грибковых колоний во время бесконтактного совместного культивирования, несмотря на то, что эти грибы способны образовывать множественные микотоксины.

Антагонистическую активность агентов биоконтроля против бактериальных патогенов изучали также путем совместного культивирования антагониста и тест-культуры в жидкой среде. Культуры Erwinia amylovora, Erwinia amylovora, Pseudomonas syringae и Ralstonia solanacearum инкубировали в пробирках объемом 5 мл в мясопептонном бульоне в течение 48 часов. Затем в каждую пробирку добавляли 1 мл культуры-антагониста: после инкубации при 28° C в течение 24 часов содержимое пробирки анализировали и активность биоконтролирующих агентов оценивали с помощью микроскопии, а титр клеток определяли с использованием спектрофотометра UV / VIS. (Jenway, Stone, UK) при 550 нм.

В жидкой среде Streptomyces alfalfae штамм CI-4 проявлял высокую активность в отношении Erwinia amylovora. Клетки фитопатогена были полностью лизированы ферментами антагониста; на микрокартинах были видны только мицелий и гифы Streptomyces (фиолетовые стрелки), и не было клеток фитопатогенов (рис. 2a). Штамм Streptomyces diastochromogenes SK-6, также показал активное влияние на клетки фитопатогена при совместном культивировании.

Наблюдался полный лизис клеток Erwinia amylovora с антагонистическим эффектом Streptomyces lividans TR-59. Streptomyces wedmorensis KK-4 не продемонстрировал антагонистическое действие на возбудителя; и клетки Erwinia amylovora быстро размножались при совместном культивировании (рис. 2 в).



A B

Рис. 2. (а): где в жидкой среде Streptomyces alfalfae CI-4 (1 мл) + Erwinia amylovora (5 мл) совместно культивировали, фиолетовые стрелки показывают мицелий и гифы Streptomyces alfalfae, CI-4; (б) где в жидкой среде совместно культивировали штамм Streptomyces wedmorensis KK-4 (1 мл) + Erwinia amylovora (5 мл)

При проверке активности штаммов Streptomyces в отношении возбудителя бактериального рака косточковых плодов было обнаружено, что те же самые штаммы Streptomycetes были активными, проявляя либо антагонизм, либо гиперпаразитизм в течение 72 часов, на Pseudomonas syringae. Так, штаммы Streptomyces diastatochromogenes Sk-6, Streptomyces mediolani Pat -3 и Streptomyces lividans TR-59 показали значительный антагонистический эффект по отношению к возбудителю бактериального рака, обеспечивая подавление роста и развития колоний этой бактерии, зоны лизиса которой составляют 5,77–6,1 ± 1,31 мм, 5,25–5,70 ± 1,27 мм и 4,52–5,1 ± 1,31 ($P \leq 0,05$) соответственно. Другие агенты биоконтроля, такие как Streptomyces alfalfae, CI-4 и Streptomyces lactitubi, Pch-3, продемонстрировали гиперпаразитарный эффект, используя колонии Pseudomonas syringae в качестве источника питательных веществ, растущих на клетках патогенных микроорганизмов.

Почву и рассады картофеля обрабатывали антагонистами, и их действие изучали в условиях in vivo. Микробные суспензии антагонистов и R. solanacearum доводили до концентрации 10^8 КОЕ / мл путем измерения на длине волны 585 нм (UV / VIS Spectrophotometer, JENWAY, UK, 2011). Внесение в почву, в корневую зону картофеля Streptomyces diastatochromogenes Sk-6 и Streptomyces alfalfae C1–4 в дозе 10^8 кл / мл значительно снизили заболеваемость бурой гнилью и увеличили рост картофеля. Прогрессирование заболевания было снижено на 60 % и 56 % ($P \leq 0,05$) у растений, инокулированных штаммом Streptomyces diastatochromogenes Sk-6 и Streptomyces alfalfae C1–4, соответственно.

Streptomyces diastatochromogenes Sk-6 был выбран для биоконтроля мягкой бактериальной гнили, вызываемой Erwinia carotovora в условиях хранения картофеля. На четвертой неделе после инокуляции бактерией мягкой гнили Erwinia carotovora в дозе 10^6кл\мл и обработки антагонистической бактерией Streptomyces diastatochromogenes Sk-6 в дозе 10^8 спор / мл у сорта Санти инфекции не наблюдалось. У сорта Пикассо признаки инфекции начали проявляться через четыре недели даже при дозе 10^8 спор / мл антагониста, а симптомы инфекции были более выраженными и наблюдались у 4,5–4,7 % клубней этого сорта в дозе антагониста 10^4 спор / мл. Контрольная группа или необработанный картофель всех сортов получил 100 % повреждение в течение четырех недель после начала эксперимента.

Streptomyces alfalfae C1–4 в качестве биоинокулянта применяли против бактериального рака косточковых деревьев, а также против бактериального ожога, парши и монилиоза семечковых деревьев, опрыскивая поверхности листьев и кроны пораженных растений, то есть биоконтрольный агент вводили в эпифитные ассоциации растений. Когда на листьях появляются признаки заболевания, двойное обильное опрыскивание пораженных растений суспензией штамма Streptomyces C1–4 (10^6 спор / мл) с интервалом в 7 дней предотвратило развитие заболевания. Через пятнадцать дней после того, как биологическое средство было применено дважды, растения полностью восстановились, появились новые листья и новые веточки.

Таким образом, использование биоинокулянтов Streptomyces, способных стимулировать рост растений, улучшать доступность питательных веществ, контролировать фитопатогены и снижать абиотический стресс у растений, является важной практикой для устойчивого сельского хозяйства, хорошей альтернативой экологически опасным химическим удобрениям и пестицидам.

ЛИТЕРАТУРА

Adegboye, M.F., Babalola, O.O., 2012. Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. Afr J Agric Res. 7: 2255–2261.

Barka EA, Vatsa P, Sanchez L et al. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of the Actinobacteria. Microbiol Mol Biol R., 80:1–43.

Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites, J. Antibiot. 58: 1–26.

Copping, L.G. & Menn, J.J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. Pest Manag. Sci. 56: 651–676.

Couillerot, O., Vatsa, P., Loqman, S., Ouhdouch, Y., Jane, H., Renault, J.H, et.al. 2013. Biocontrol and biofertilizer activities of the Streptomyces anulatus S37: an endophytic actinomycete with biocontrol and plant-growth promoting activities. Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin. 86: 271–276.

Demain A.L., Sanchez S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress, J. Antibiot. 62: 5–16.

Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A.2014. Biocontrol of Rhizoctonia solani damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. Microbiol Res. 169: 59–65.

Jog, R., Nareshkumar, G., Rajkumar, S.2016. Enhancing soil health and plant growth promotion by actinomycetes. In: Subramaniam G., Arumugam S., Rajendran V. (eds) Plant Growth Promoting Actinobacteria. Springer, Singapore.33–45.

Labeda, DP, Goodfellow, M., Brow, n R. et al. 2012. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. Antonie van Leeuwenhoek. 101:73–104

Lam, K.S. 2007. New aspects of natural products in drug discovery, Trends in Microbiol. 15: 279–289.

УДК 664.959: (664.951:577.112)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВТОРИЧНОГО РЫБНОГО СЫРЬЯ В ТЕХНОЛОГИИ ГЕРОДИЕТИЧЕСКОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Е.Н. Харенко, Е.С. Беломытцева

Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, Россия

Рациональное питание людей пожилого возраста занимает одно из главных мест в «Концепции Государственной политики в области здорового питания населения России», подготовленной с учетом рекомендаций ООН. Ее успешное выполнение дает возможность разрабатывать рекомендации по увеличению трудоспособности людей старших возрастов и оптимизации их образа жизни благодаря дальнейшей рационализации питания.

При создании продуктов питания для людей пожилого и преклонного возраста достижение сбалансированности химического состава, только лишь, за счет их природных резервов – достаточно трудная задача. Наиболее перспективным решением этой проблемы является реализация преимуществ, сразу нескольких направлений.

Для людей пожилого возраста характерно уменьшение массы тела, связанное, прежде всего, с уменьшением потребления белка, в силу самых разных причин, включая и социальные факторы. В этой связи потребление жидких пищевых рационов, обогащенных водорастворимыми белковыми гидролизатами, является наиболее простым решением проблемы адекватного обеспечения людей полноценным белковым питанием. Снижение концентрации ферментов в организме пожилых людей не дает возможности полноценно усваивать поступающие с пищей белковые продукты. Часть их усваивается, а часть проходит транзитом, подвергая дополнительной нагрузке пищеварительные и выводящие органы, поэтому белок, поступающий в организм, необходимо подвергать дополнительной обработке.

Одним из способов деструкции белка является гидролиз, в результате которого происходит разрыв пептидных связей белковой молекулы до легко усвояемых пептидных фрагментов и аминокислот. Период всасывания и усвоения такого структурно измененного белка с высокой степенью специфичности значительно меньше по сравнению с инактивным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Концепцией разработки продукта служили два основных направления. Первое, это использование вторичного рыбного сырья, которое в настоящее время не используется. В нашем случае – овариальная жидкость осетровых рыб и отходы от разделки сельди. И второе – создание продуктов геродиетического назначения, которых явно не хватает на прилавках магазинах. Рациональным является создание продуктов, которые привычны в потреблении, но выработаны из более дешевого и доступного сырья. В задачу входило получение продукта сбалансированного по всем пищевым нутриентам, преимущественно геродиетического назначения на рыбо-крупяной основе. В качестве аналога использовали икру минтая, которая относится к высокой степени потребления, но с ограничениями по цене и сроком реализации в связи с достаточно небольшим (3 месяца в году) периодом промысла минтая с гонадами IV стадии зрелости, которые используются для приготовления пробивной икры.

В работе использовали стандартные и общепринятые методы исследований. Отбор проб, подготовку их к анализу проводили по ГОСТ 31339 и ГОСТ 7636. Содержание белка определяли по методу Кьельдаля на автоматическом анализаторе «Kjeltec-1003» и «Kjeltec-2300». Аминокислотный состав белков анализировали методом количественной ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе Aracus (membraPure, Германия). Экстракцию липидов проводили по методу Блайя и Дайера. Жирные кислоты в виде метиловых эфиров анализировали на газовом хроматографе GC-16A фирмы «Shimadzu» (по ГОСТ 31663).

Важным компонентом служило вторичное сырье от разделки соленой сельди. По нашим данным при разделке на филе без кожи отходов образуется в среднем более 50 % [Харенко, 2016]. При проведении исследовательских работ использовали атлантическую и тихоокеанскую сельдь мороженую, которую дефростировали и солили смешанным посолом до содержания соли до 5,0 %, а затем разделывали на филе без кожи. Для получения гидролизата использовали кожу, кости, головы без жабр, обрезки мышечной ткани и гонады.

Для придания икорного привкуса продукту использовали сухой концентрат овариальной жидкости осетровых рыб. Овариальная жидкость в доступном виде для дальнейшей переработки образуется в случае прижизненного получения икры у осетровых рыб. Этот способ получил широкое распространение в последние годы, поскольку позволяет сохранить и использовать самок в течение длительного периода времени. Получаемая таким образом икра осетровых рыб используется как для рыбоводных целей, так и на производство икорной продукции. Особенностью данного сырья является наличие околоплодных вод – овариальной жидкости (ОЖ). По нашим данным выход икры в овариальной жидкости от массы самок составляет от 10 до 30 % в зависимости от вида рыбы, ее размерно-массовых характеристик и возраста, при этом овариальной жидкости образуется от 10 до 25 % от массы икры [Харенко, Сытова, 2011, 2012].

Изучение функционально-технологических свойств показало, что ОЖ представляет собой полупрозрачную мелкодисперсную коллоидную систему. Цвет от светло-бежевого до слегка сероватого и розоватого в случае попадания кровеносных сосудов. Содержание сухих веществ составляет около 2 %, белка в пределах от 35,1 до 56,2 % (в пересчете на сухое вещество), выявлено незначительное содержание жира – 0,07–0,10 % и золы – 0,4–0,7 %. Белковая матрица ОЖ состоит из 19 аминокислот, из которых 8 незаменимых и их отношение к сумме заменимых аминокислот составляет более 0,96. Отмечено высокое содержание лизина, треонина, метионина и гистидина. Из заменимых аминокислот доминирующими являются аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, аланин и серин. Выявлено относительно высокое содержание витамина В1 – до 3,5 мг/100г и, а также макроэлементов, в особенности, таких как K (21,5 – 48,3 мг/100 г.) и Mg (2,1 – 3,2 мг/100 г.).

В продукции из осетровых рыб аквакультурного происхождения необходимо контролировать остаточные количества ГМИ, которые в свою очередь могут попадать в рыбу при кормлении. Нами установлено, что в овариальной жидкости осетровых рыб, таких как гибрид СБС и ленский осетр, генетически модифицированные источники отсутствуют [Сытова, 2009].

Использование такого нетрадиционного вторичного сырья как овариальная жидкость является перспективным в различных областях, однако в нативном состоянии это сырье нетехнологично в связи с активной микробиологической контаминацией при хранении. Поэтому ОЖ подвергали сушке, что позволяет с одной стороны повысить хранимоспособность, а с другой – концентрировать биологически активные вещества. Установлено, что наиболее экономичной является распылительная сушка, по сравнению с вакуумной инфракрасной пеносушкой и сублимационной [Дмитриева, 2012]. Сухой концентрат представлял собой среднегигроскопичный тонкодисперсный порошок серовато-бежевого цвета, по консистенции напоминающий муку, имеет слабый «рыбный» запах, хорошо растворяется в воде и физрастворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка способов изготовления рыбокрупяных изделий является перспективным направлением за счет возможности моделировать композиции заданного нутриентного состава для функционального потребления различными группами населения. Например, существует способ получения рыбокрупяного изделия, как аналога икры минтая, включающий подготовку, дозирование крупяного наполнителя, рыбных отходов, поваренной соли, красителя, воды, растительного масла, приготовление отвара рыбных отходов с добавлением поваренной соли, красителя, фильтрацию отвара, добавление крупяного наполнителя, варку, охлаждение, введение растительного масла. Однако этот способ имеет свои недостатки. Так, срок хранения продукта при температуре от 0 до 5 ºС составляет всего 3 суток. [Патент РФ № 2320223]. Этот аналог не имеет диетического назначения, так как соотношение белки: жиры: углеводы в данной рецептуре составляет примерно 2,0:2,5:8,5, тогда как оптимальное соотношение для диетического питания должно быть 1:0,8:3,5 соответственно. Поэтому нашей задачей являлось обоснование параметров и компонентов для создания продукта геродиетического использования.

Разработка технологии включала в себя следующие этапы: подготовку ингредиентов, в качестве которых использовали крупяной наполнитель, субпродукты от разделки сельди, натуральный краситель, растительное масло, поваренную соль и воду, их смешивание, термообработку, охлаждение и расфасовку, при этом дополнительно в качестве ингредиентов использовали специи и концентрат ОЖ осетровых рыб.

Субпродукты от разделки соленой рыбы гомогенизировали, в полученный гомогенизат вносили воду и направляли на ультразвуковую обработку с частотой 22 – 44 кГц в течение 5 – 15 мин. После обработки в гомогенизат вносили томатную пасту, соль и специи, смешивали и направляли на гидролиз при t = 18 – 20 ºС в течение 4 часов. Полученный гидролизат фильтровали и вносили крупяной наполнитель в количестве 10 % [Харенко, 2012]. Термообработку проводили путем пастеризации смеси при температуре 85–90 ºС в течение 1 – 2 мин, а после охлаждения перед расфасовкой, вносили растительное масло и сухой порошок ОЖ в количестве 0,1–0,5 % от массы смеси [Патент РФ № 2467653].

Готовый продукт имеет светло-оранжевый цвет, свойственный натуральной икре минтая, приятный рыбный запах, «икринки» отделяются друг от друга. Для сохранения целевых свойств продукта соблюдается щадящая технологическая обработка, которая позволяет максимально сохранить биологически активные вещества исходного сырья. Продукт содержит оптимальное соотношение полиненасыщенных жирных кислот ω-6 : ω-3 ПНЖК – 5:1, что соответствует рекомендуемым нормам для людей пожилого и преклонного возраста. При этом сохраняется антиоксидант – ликопин, содержащийся в томатной пасте, которая одновременно выполняет роль регулятора кислотности. Пищевая ценность продуктов при пастеризации практически не изменяется.

Добавление в готовый продукт концентрата ОЖ осетровых рыб в количестве 0,1–0,5 % от массы смеси усиливает икорный вкус, а так же обогащает макроэлементами, в особенности, такими как K и Mg а также витамином B1. Воздействие ультразвуковых колебаний на физико-химические процессы, происходящие в сырье, обеззараживание воды и сырья, которые подвергаются этому воздействию, также дает возможность улучшить качество готовой продукции и продлить ее сроки хранения, который составляет 7 суток в герметически закрытой таре при температуре от 0 до +5 °С.

Разработанная технология позволяет получить из вторичного неиспользуемого рыбного сырья аналоговый икорный продукт, преимущественно геродиетического назначения, сбалансированный по пищевым нутриентам.

Новые виды геродиетических продуктов открывают возможности для повышения пищевой и биологической ценности питания пожилых людей и торможения развития возрастзависимой патологии.

ЛИТЕРАТУРА

Сытова М.В., Харенко Е.Н., Микодина Е.В., Ганжа Е.В., Дмитриева Е.А. Показатели безопасности и содержание генетически модифицированных источников в овариальной жидкости осетровых рыб // Рыбпром, 2009. – № 1. – С. 54–57.

Харенко Е.Н., Дмитриева Е.А., Сытова М.В. Сравнительный анализ функционально-технологических свойств овариальной жидкости различных видов (пород) осетровых рыб // Рыбное хозяйство, 2011. – № 3. – С. 79–85.

Харенко Е.Н., Дмитриева Е.А., Сытова М.В. Разработка режимов сушки икорного золя осетровых рыб // Хранение и переработка сельхозсырья, 2012. – № 3. – С. 12–15

Харенко Е.Н., Сытова М.В., Гриценко Е.А. Новое сырье прижизненного получения у осетровых рыб. Биохимические особенности, технологии сушки, перспективы использования. Изд. Lambert Academic Publishing Saarbrűcken, 2012. – 84 с.

Харенко Е.Н., Фомичева Л.Ф., Сытова М.В. Справочник по разделке рыбы. – М.: Изд-во ВНИРО. 2016. – 56 с.

Патент РФ № 2320223. Способ получения искусственной рыбной икры // Щепочкина Ю.А., 2008.

Харенко Е.Н., Острикова Е.И. Использование ультразвуковой обработки для повышения качества аналоговых продуктов из вторичного рыбного сырья // Рыбное хозяйство, 2012. – № 5. – С. 109 -113

Патент РФ № 2467653. Способ получения аналога рыбной икры // Харенко Е.Н., Острикова Е.И., Бедина Л.Ф., 2012. – Бюлл. № 33

УДК 615.322

К ВОПРОСУ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЧАБРЕЦА В НАПИТКАХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Л.А. Хасанова[1], Л.А. Сулейманова[1], В.В. Назаров[3], З.Н. Сулейманова[1], Г.Ш. Казыханова[1], Б.Ш. Ишмуратова[1], В.С. Власова[1], О.В. Топорков[1], Р.З. Тагиров[1], А.В. Миронова[1], З.Ю. Ибрагимова[1], Э.Ю. Страхова[1], Р.С. Кираев[2], З.М. Хасанова[1]

[1] Башкирский государственный педагогический университет имени М. Акмуллы, Уфа, Россия
[2] ФГБУН «Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Уфа, Россия
[3] Крымский федеральный государственный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

На сегодня очевидна актуальность сохранения здоровья, а также профилактики и коррекции нарушений обменных и ряда других физиологических процессов в организме человека посредством потребления продуктов функционального назначения на основе пищевого растительного сырья, содержащего в своём составе биологически активные вещества используемых растений. Особенно интересен биотехнологический потенциал местного дикорастущего травянистого сырья, экологичность, доступность и низкая себестоимость которого выгодно отличает его от культурно возделываемых растений с применением агрохимии и часто уступающих по содержанию необходимых биологически активных веществ. К такому растительному сырью, несомненно, можно отнести траву чабреца (синонимы: тимьян, чабер, чебрик, богородская трава, лимонный душок), который традиционно широко используется в медицинских, косметических и пищевых целях [1; 3; 5].

Чабрец – полукустарничек с ярко выраженным приятным запахом, образующий дерновинки, произрастает на территории России в европейской части Западной Сибири и на Южном Урале, в Крыму и на Кавказе. Обычно используется трава чабреца (цветущие облиственные веточки растения) [2; 4].

Трава чабреца богата макро- и микроэлементами, витаминами и витаминоподобными веществами. В её состав входят макроэлементы кальций, магний, натрий, калий, фосфор, микроэлементы железо, цинк, медь, марганец, селен, провитамин А (β-каротин), витамины А (ретинол), B_1 (тиамин), B_2 (рибофлавин), B_6 (пиридоксин), B_9 (фолиевая кислота), С (аскорбиновая кислота), Е (токоферол), К (филлохинон), РР (ниациновый эквивалент), витаминоподобные вещества, в частности, холин.

Трава чабреца содержит эфирное масло (0,1–0,6 %), в составе которого тимол (до 30 %), карвакрол (до 20 %), n-цимол, α-терпинеол, γ-терпинен, борнеол и цингиберен, дубильные вещества, горечи, камедь, флавоноиды, урсоловая и олеаноловая кислоты, фенолные соединения, обладающие высокой антиоксидантной активностью [4 – 6].

Чабрец в официальной медицине применяется при простудных заболеваниях, ларингитах, трахеитах, бронхитах, пневмониях и коклюше благодаря своим антисептическим, отхаркивающим, противокашлевым, обволакивающим и потогонным свойствам, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся снижением желудочной секреции, атонией или спазмами кишечника, метеоризме, он успешно нормализует микрофлору кишечника. Карвакрол чабреца – растительный антибиотик, обладающий бактерицидными и инсектицидными свойствами, способен подавлять рост и развитие патогенной микрофлоры, эффективен, в частности, против золотистого стафилококка. Монотерпен чабреца аскаридол – популярный компонент глистогонных препаратов, применяющийся в медицине от кишечных паразитов, а также метеоризма, для лечения астмы, нервных расстройств и артрита. Тимол, натуральный консервант, обладающий также мощным бактерицидным, антисептическим и противопаразитарным действием, входит в состав медицинских мазей, косметических и гигиенических средств, употребляется для отдушки одеколонов, кремов, зубных паст. Терпеновые спирты чабреца терпинеол с ароматом сирени, обладающий противомикробным действием, и борнеол с запахом хвои, превращающийся в камфару при окислении, используются в парфюмерии и ароматерапии, улучшают микроциркуляцию крови и легочную альвеолярную вентиляцию, снижают артериальное давление. Урсоловая кислота наряду с олеаноловой кислотой, входящие в состав травы чабреца, нашли применение в косметических препаратах в качестве противовоспалительного и антимикробного средства и средства от перхоти.

Трава чабреца используется в кулинарии как душистая и полезная пряность, улучшающая пищеварение, она очень часто входит в состав смешанных приправ и широко применяется как консервирующее средство для мяса и овощей, а также для придания пикантного вкуса супам, соусам, хлебобулочным изделиям. В качестве приправы и пряности чабрец используется в сыроварении, им ароматизируют мед и желе. Трава чабреца входит в состав рецептур многих алкогольных и безалкогольных напитков, в частности, ликероводочных изделий, для ароматизации особых сортов водки, бальзамов, вермутов, квасов. Чабрец часто добавляют в различные ароматные напитки, чаи, чайные и травяные лекарственные сборы [3–6].

Интересно использование чабреца и в составе напитков функционального назначения, разработкой которых занимается лаборатория производства и оценки качества биотехнологиической продукции Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы. В связи с этим, было проведено исследование видового состава и ареалов произрастания чабреца на территории Республики Башкортостан.

Изучение видового состава чабреца в Республике Башкортостан показало, что чабрец представлен следующими видами: Тимьян обыкновенный (Thymus vulgaris L.), Тимьян Маршалла (Th. marschallanus), Тимьян ползущий (Thymus serpyllum), Тимьян башкирский (Thymus bashkiriensis), Тимьян губерлинский (Thymus mugodzharicus), Тимьян ложно-монетный (Thymus Pseudonummularius), Тимьян кавказский (Thymus caucasicus), Тимьян Кочи (Thymus kotschyanus Boiss. et Hohen) и редкий вид – Тимьян или Чабер Бзыбский (Thymus или Satureja bzybica Woronow), наиболее используемые из которых Тимьян ползущий, Тимьян обыкновенный и Тимьян Маршалла.

Указанные виды чабреца встречаются практически по всей территории Республики Башкортостан, однако Тимьян Маршалла наиболее распространен в Благоварском, Чишминском и Белорецком районах республики.

ЛИТЕРАТУРА

Анищенко, И.Е. Пряно-ароматические растения в культуре в Республике Башкортостана / И.Е. Анищенко, О.Ю. Жигунов // Аграрная Россия. – 2015. – № 7. – С. 13–16.

Банаева, Ю.А. Биологические особенности Thymus serpyllum (Lamiaceae) при интродукции в Новосибирскую область / Ю.А. Банаева, Н.И. Гордеева, И.Н. Гуськова // Растительные ресурсы. – 2006. – Т. 42. – № 4. – С. 22–28.

Осипова, Л.А. Функциональные напитки на основе пряно-ароматического сырья /Л.А. Осипова, Л.В. Капрельянц // Пищевая промышленность: Украина, 2007. – № 9. – С. 74.

Поляков, В.А. Пряно-ароматические и лекарственные растения в производстве алкогольных напитков / В.А. Поляков, Р.И. Кунакова, Р.А. Зайнуллин. – М.: ВНИИПБТ, 2008. – 384 с.

Поляков, В.А. Плодово-ягодное и растительное сырьё в производстве напитков / В.А. Поляков, И.И. Бурачевский, А.В. Тихомиров, Р.А. Зайнуллин, Р.И. Кунакова, Л.М. Абрамова, И.М. Абрамова, И.Е. Анищенко. – М.: ДеЛи плюс, 2011. – 523 с.

Сур, С.В. ГЖХ-определение тимола и и карвакрола в растительном сырье и настоях травы чабреца / С.В. Сур, Ф.М. Тулюна, А.Я. Толоч, Т.Н. Пересыпнина // Хим.-фарм. журнал. – 1990. – т. 24. – № 10. – С. 69–71.

УДК 613.294

БЕЗОПАСНОЕ ПОТРЕБЛЕНИЕ МОРЕПРОДУКТОВ

С.А. Лопатин[1], А.Н. Шаронов[2]

[1] Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины, Санкт-Петербург, Россия

[2] НИИ Военной академии материально-технического обеспечения имени генерала армии А.В. Хрулёва, Санкт-Петербург, Россия

К морепродуктам относятся ракообразные (крабы, креветки, лангусты, раки), головоногие моллюски (кальмары, осьминоги), двустворчатые моллюски (устрицы, мидии, гребешки), а также водоросли (ламинария, или морская капуста). Основными объектами промысла служат моллюски, которые по величине вылова составляют около 65 % от объема нерыбных морепродуктов и ракообразные – 33 %. В 2017 году экспорт и импорт моллюсков в РФ достигал соответственно 21,6 и 22,0 тыс. тонн. В структуре товарооборота сетевых магазинов России доля рыбопродукции занимает в среднем 15 %, а доля морепродуктов – 16 %. В сети московских супермаркетов объем реализации креветок, крабов, крабовых палочек, раков, омаров и других свежемороженых морепродуктов превышает 20 %.

К настоящему времени появляется все больше данных, что потребителей морепродуктов следует относить к группе риска, среди которых возможны и даже имели место вспышки вирусных пищевых инфекций [1]. Причин отнесения морепродуктов к категории небезопасных в эпидемическом отношении несколько: высокая микробная загрязненность прибрежных морей сточными водами; многие нерыбные гидробионты являются природными биофильтраторами, которые заражаются вирусами в процессе жизнедеятельности, пропуская через свой организм воду и пищевые частицы; достаточная устойчивость вирусов во внешней среде, позволяющая им сохраняться вне организма хозяина в течение длительного времени. Общая частота обнаружения вирусного материала в пробах морепродуктов может составлять около 10 %. В бассейне Черного моря, вследствие сброса неочищенных сточных вод, почти третья часть черноморских мидий содержит патогенные вирусы и бактерии [2]. Мидии размером 50 мм, обитающие на поверхности южного мола (его площадь составляет 339600 м^2) Севастопольской бухты, за сутки профильтровывают 7390 тыс. м^3 воды [3].

Экспертным путем определен вирулицидный эффект термической обработки морепродуктов, применяемый в домашних условиях и на предприятиях общественного питания для приготовления наиболее распространенных блюд. Противовирусный эффект не достигается, если в технологии приготовления блюда из морепродуктов не предусмотрена термическая обработка или она не достаточно жесткая и продолжительная. К числу блюд из морепродуктов, изготавливаемых без термической обработки, относятся: салат с мидиями, гребешки с лимонной заправкой и зеленью, салат с осьминогами и картофелем, трепанг с соево-уксусным соусом. В домашних условиях мидий подвергают тепловой обработке до тех пор, пока они не откроют створки – обычно это достигается при 70 °С за 50 сек. При этом в течение первых нескольких минут приготовления пищи внутренняя температура продукта в среднем на 8 °С ниже наружной. Таких слабо обработанных моллюсков вместе с внутренними органами предпочитают употреблять в пищу во многих странах мира. Полный обеззараживающий эффект достигается при варке, обжарке, тушении морепродуктов в течение 25–30 мин, что используется при приготовлении, например: плова с мидиями, лангусты на сковороде с чесноком, салата с огурцом и крабом.

В этих обстоятельствах следует сделать вывод, что использование морепродуктов для приготовления блюд, технология которых не предусматривает эффективной по отношению к вирусам термической обработки, должно включать предварительное вирусологическое обследование сырья для исключения патогенных микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Энтеровирусные и неэнтеровирусные инфекции у туристов и мигрантов (медицина путешествий). Ч. 3: Общая характеристика. Полиомиелит. Ротавирусная и норовирусная инфекции. Вирусные гепатиты А и Е / Под ред. Ю.В. Лобзина. – СПб., 2015. – 92 с.

2. Руднева И.И. Биомониторинг прибрежных вод Черного моря / И.И. Руднева, Н.Ф. Шевченко, И.Н. Залевская, Н.В. Жерко // Водные ресурсы. – 2005. – Вып. 32, No 2. – С. 238–246.

3. Козлова О.В. Расчёт фильтрационной активности популяции черноморской мидии, обитающей на молу Севастопольской бухты // Экология моря. – 2004. – Вып. 66. – С. 64–66.

УДК 637.3

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА СОЛЕНЫХ СЫРОВ

Г.Р. Утаргалиева, А.Г. Жумина, М.Ю. Ишмуратова

Карагандинский университет имени академика Е.А. Букетова, Караганда, Казахстан

Рынок молока и сыра – один из крупнейших продовольственных рынков в Казахстане. В среднем в Казахстане ежегодное потребление сыра на душу населения составляет 2,5 килограмма. Доля отечественного производства во внутреннем потреблении 65 %, а остальные 35 % импортируются [1]. Большая часть импортируемых сыров делаются из соевого молока или содержат пальмовое масло [2]. Таким образом, переработка молока имеет большие перспективы для увеличения производства и снижения импорта. Целью нашей работы является отработка технологии получения соленых сортов сыров отечественного производства.

Исследования были проведены на ТОО «Молочная фабрика «Натиже» в течение 2019–2020 гг. Нами была отработана технология производства следующих соленых сортов сыров: Качкавалло, Халлуми, Азиаго, «Натиже с укропом» и «Натиже с тмином».

Для приготовления сыра Качкавалло 120 л молока нагревали до 62 °С, затем остудив до 34,5 °С добавляли ТТ-закваску и через 2–3 минуты – сычужный фермент. Далее массу разогревали до 47 °С, отделяли сыворотку, а сырную массу помещали в специальную форму на 1 день. На следующий день сыр извлекали из формы, разрезали на тонкие слои, кипятили воду до 100 °С, выкладывали массу в воду, месили как тесто. Когда сыр становился гладким и мягким, вытаскивали из воды, помещали в середину сырного теста отварное мясо, затем опускали в бочки с соленой водой на 1–2 часа, через 1 час высушили и ставили в холодильник (рис. 1). Текстура приготовленного сыра была гладкой и плотной, запах острый [3].

Для приготовления сыра Халлуми нагревали 100 л молока до 70 °С, затем остужали до 45 °С, через 2–3 минуты добавляли ТТ-закваску и сычужный фермент, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 минут. Сыворотку отбирали, а сырную массу вырезав лирой, перекладывали в специальные формы на 2–3 часа. Затем готовую массу опускали в сыворотку, нагретую до 85 °С на 5 минут, после извлечения с обеих сторон посыпали солью, в центр помещали мяту. Готовый сыр хранили в холодильнике (рис. 1). Текстура сыра Халлуми была гладкой и слоистой, запах приятный.

Для изготовления сыра Азиаго 100 л молока нагревали до 62 °С и, остудив до 37 °С, добавляли закваску LHTB1, перемешивали в течение 2 минут, добавляли 50 мл сычужного фермента, перемешивали еще 2 минуты. За 10 минут происходит коагуляция, процесс свертывания через 20 минут. После этого нагревали массу до 42 °С, включили смесительное устройство. Через 10 минут убирали сыворотку. В образовавшуюся массу добавляли 150 г. соли, оставляли на сутки, переворачивая через каждые 15 минут. На следующий день массу помещали в бочки с соленой водой на 1 час, а затем в холодильник (рис. 2). Текстура сыра получилась плотной и гладкой, цвет светло-желтый, запах приятный.





А Б

Рисунок 1. Сыры Качкавалло (А) и Халлуми (Б)



Рисунок 2. Сыр Азиаго



А Б

Рисунок 3. Сыры «Натиже с укропом» (А) и «Натиже с тмином» (Б)

Для приготовления сыров «Натиже с укропом», «Натиже с тмином» 100 л молока нагревали до 70 °С, остудив до 45 °С, добавляли ТТ-закваску и через 2–3 минуты сычужный фермент, перемешав, оставляли при комнатной температуре на 30 минут. Когда сгусток был готов, вырезали его лирой, отбирали сыворотку. В готовую массу добавляли укроп и соль либо черный тмин с солью. Массу помещали в специальные формы на 2–3 часа (рис. 3). Текстура сыров получилась мягкой и гладкой, жирной и нежной, запах привлекательный.

Все полученные нами образцы сыров обладали хорошими вкусовыми качествами и были высоко оценены потребителями.

ЛИТЕРАТУРА

1. http://www.kazpravda.kz/news/ekonomika/kazahstanskie-kompanii-uvelichili-obemi-proizvodstva-sira-i-tvoroga/
2 https: // tengrinews. Kz / markets /
3. Робинсон Р., Скотт Р., Уилби Р. Производство сыра: научные основы и технологии. – Санкт – Петербург: Профессия, 2005. – 27 с.

УДК 639.313:664.959.2

КОЛЛАГЕНОВЫЕ СУБСТАНЦИИ РЫБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Л.В. Антипова, И.И. Котов, С.С. Антипов, З.Н. Хатко, М.М. Дударь, М.З. Болоков, М.Г. Хатхоху

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Проблема здоровья человека – неотъемлемая часть государственной политики, получившей огромную поддержку населения страны. Однако большинство препаратов и средств производятся за рубежом, они дорогие, а порой недоступны. Вместе с тем, имеются собственные сырьевые ресурсы и технологии, представляющие собой огромный потенциал развития отечественных биомедицинских препаратов и средств для активного влияния на лечебный процесс и эффективность конечного результата.

К одним из распространенных относятся коллагеновые, основанные на физиолого-биохимическом действии на ткани и процессы организма. Коллагеновые субстанции издавна используются в качестве ранозаживляющих, кровеостанавливающих, обеззараживающих средств, повязочных материалов и т. д. Однако опыт применения связан с коллагенами наземных животных. В последнее время коллагеновые препараты из животных тканей подвергаются критике из-за известных случаев аллергических реакций и возможности заражения человека бешенством коров.

Установлена рядом российских и зарубежных ученых возможность получения коллагеновых препаратов рыбного происхождения. Однако современный опыт касается лишь косметологии. Возможность применения коллагеновых белков рыбного происхождения в медицине для лечения различных заболеваний не обобщен, а практические рекомендации носят фрагментарный характер.

Опытные партии коллагеновых субстанций (дисперсии, пленки, губки) получены в условиях научно-исследовательской лаборатории Воронежского государственного университета инженерных технологий, апробацию invivoпроводили в условиях Воронежского государственного медицинского университета, Майкопского государственного технологического университета и на базе Адыгейской республиканской клинической больницы.

В ходе экспериментальных исследований установлено, что коллагеновые субстанции рыбного происхождения не обладают токсичностью, безаллергенны, положительно влияют на поведенческую функцию животных, обладают мощным ранозаживляющим свойством. Пленочные материалы из коллагеновой субстанции рыбного происхождения сокращают срок выздоровления в послеоперационный период на 30 %. Весьма успешными были эксперименты при лечении проктита, характерные отсутствием каких-либо осложнений и рецидивов. Весьма обнадеживающими оказались результаты лечения азотемии при хронической болезни почек (ХБП). Показано достоверное снижение мочевины и креатинина при ХБП. Можно положительно оценивать действие коллагеновых субстанций в решении проблем стоматологии. Ведутся исследования в области лечения патологий ЖКТ.

Секция 2. Медицинская биотехнология и биофармацевтика

УДК 577.1

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ПОИСКА ИНГИБИТОРОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1 И КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА KU70 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИНГИБИРУЮЩЕГО ПОТЕНЦИАЛА КОНЪЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ЭОЗИНОМ

А.Н. Анисенко. С.О. Галкин, А.А. Розина, М.Б. Готтих

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

Одной из наиболее перспективных стратегий для создания принципиально новых антивирусных препаратов является поиск соединений, нарушающих взаимодействие вирусных белков с их клеточными партнерами. Подобная стратегия наиболее востребована в случае РНК-вирусов, которые быстро развивают лекарственную устойчивость к ингибиторам вирусных ферментов. Ранее мы показали, что связывание интегразы ВИЧ-1 с человеческим белком Ku70 необходимо для эффективного восстановления повреждений ДНК, вызванных интеграцией вирусной кДНК. В текущей работе мы разработали флуоресцентный метод анализа взаимодействия между этими белками для поиска ингибиторов взаимодействия между интегразой ВИЧ-1 и клеточным белком Ku70. В основе этого метода лежит использование генетически закодированных флуорсецентных меток, введенных в состав как интегразы, так и белка Ku70. Используя этот метод, мы изучили взаимосвязь между структурой конъюгатов олигонуклеотидов с эозином и активностью этих соединений против образования комплексов интегразы ВИЧ-1 и Ku70. Мы показали, что их ингибирующее действие в основном объясняется азотистыми основаниями, а не сахаро-фосфатным остовом олигонуклеотидной части ингибитора. Также мы показали, что по мере увеличения длинны олигонуклеотидной части ингибитора от 5 до 15 звеньев повышается их ингибирующее действие. Однако уже 11-звенного конъюгата достаточно, чтобы эффективно нарушать взаимодействие между белками (IC50=135±20 нМ).

Работа поддержана грантом РФФИ 18–29–08012.

УДК 577.115

КЕРАСОМЫ НА ОСНОВЕ СИЛОКСАНОВОГО ПРОИЗВОДНОГО L-ОРНИТИНА С НЕНАСЫЩЕННЫМИ УГЛЕВОДОРОДНЫМИ ЦЕПЯМИ

У.А. Буданова, Дениева З.Г., Ю.Л. Себякин

Российский технологический университет, Москва, Россия

Керасомы в настоящее время интересны в качестве нового типа транспортной системы для трансфекции, а также в терапии опухолей. Это искусственные биоорганические гибридные липосомы, содержащие силоксановую сеть на поверхности двухслойной мембраны [1]. Известно, что при введении ненасыщенной связи в гидрофобный блок амфифилов эффективность трансфекции возрастает [2]. Наличие такой связи в углеводородной цепи липида обеспечивает большую площадь поперечного сечения алифатического фрагмента, повышенную текучесть двухслойной мембраны и, следовательно, стимулирует слияние катионных липосом с клеточными мембранами и облегчают проникновение через них [3]. Нами разработана схема синтеза силоксанового производного L-орнитина с ненасыщенными углеводородными цепями. Аминогруппы аминокислоты блокировали Boc-защитой. Далее проводили реакцию присоединения олеиламина, который выступает в качестве гидрофобного блока. Для этого к активированной с помощью DCC в присутствии HOBt карбоксильной группе добавляли олеиламин в среде безводного хлористого метилена. Удаление защитных групп проводили действием трифторуксусной кислоты с последующей обработкой соли раствором $NaHCO_3$. Полярную кремний-органическую головную группу амфифила формировали реакцией с (3-триэтоксисилил) пропилизоцианатом. Преимуществом выбранного реагента является простота протекания реакции аминогруппы с изоцианатной группой при комнатной температуре. Кроме того, в структуре появляется производное мочевины, которая играет значительную роль в метаболизме многих веществ в организме [4]. Структуру целевого соединения подтверждали данными[1] H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Получены дисперсии на основе катионного липида [5] и керасомообразующего липида в соотношении 1:1. Проведено комплексное изучение физико-химических, мембранообразующих свойств керасомальных агрегатов (размер частиц, дзета-потенциал, ТФП, стабильность).

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований, грант РФФИ № 19–04–00775.

ЛИТЕРАТУРА

Liang X., Gao J., Jiang L. et al. // ACS Nano. 2015. 9. 1280.; Obika S., Yu W., Shimoyama A. et al. // Bioorg. & med. chem. 2001. 9. 245.; Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N. et al. // The J. of boil. chem. 1994. 269. 2550.; Niyomtham N., Apiratikul N., Suksen K., et. al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015. 25. 496.; Дениева З.Г., Буданова У.А., Себякин Ю.Л. // Тонкие химические технологии. 2019. 14. 42.

УДК 612.015.1; 543.559; 543.94

ЭЛЕКТРОАНАЛИТИЧЕСКИЕ ЦИТОХРОМ Р450 СИСТЕМЫ КАК МОДЕЛИ В ПОИСКЕ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИССЛЕДОВАНИИ МЕТАБОЛИЗМА И АНАЛИЗЕ МЕЖЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

В.В. Шумянцева[1,2], Т.В. Булко[1], А.В. Кузиков[1,2], Р.А. Масамрех[1,2], П.И. Королева[1]

[1] Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

[2] РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Цитохромы Р450 – гем-содержащие монооксигеназы, катализирующие широкий спектр химических реакций в организмах всех живых существ [1, 2]. Эти ферменты участвуют в метаболизме ксенобиотиков, в том числе различных лекарственных соединений, катализируют метаболические превращения важнейших эндогенных соединений, являются фармакологическими молекулярными мишенями для лекарственных препаратов – регуляторов метаболизма. Для исследования каталитической активности цитохромов Р450 разработаны различные системы и методы анализа: реконструированные системы на основе комплексов соответствующих изоформ цитохромов Р450 с флавопротеином НАДРН-зависимой цитохром Р450 редуктазой, бакулосомы, содержащие рекомбинантные цитохромы Р450 и их белки – редокс партнеры, микросомы человека или животных. Исследование каталитической активности изоферментов цитохрома Р450 в системах in vitro сопряжено с реконструированием электрон-транспортной цепи, включающей использование редокс-партнёрных белков, необходимых для восстановления иона железа гема цитохрома Р450 и осуществления каталитического процесса, стадиями выделения продуктов ферментативной реакции и их анализом. Электроанализ цитохромов Р450 позволяет использовать только гемопротеин, при этом электрод выполняет функции как донора электронов, так и заменяет сервисные белки-партнеры [3]. Для эффективного электрохимического процесса, связанного с транспортом электронов и реализации электрокатализа важную роль играет модификация электрода для иммобилизации гемопротеина.

В данной работе проведен сравнительный анализ электрохимических и электрокаталитических свойств цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на поверхности электродов (ПГЭ), модифицированных многостеночными углеродными нанотрубками (УНТ), диспергированными в хлороформе, и модифицированных синтетическим липидоподобным соединением дидодецилдиметиламмония бромидом (ДДАБ). Показано, что модификация УНТ применима для анализа цитохромов Р450 в биоматериале. Для исследования каталитических свойств цитохромв Р450 наиболее применима модификация с помощью ДДАБ [4] (Рис. 1).

В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, http://www.colorel.ru/). Диаметр рабочего электрода 0,2 см (площадь 0,0314 см^2).

Цитохром Р450 3А4 (CYP3A4) участвует в метаболизме более 50 % существующих лекарственных препаратов. Цитохром Р450 3А4 имеет объемный активный центр, что приводит к связыванию субстратов, широко варьирующихся по размерам, или связыванию нескольких низкомолекулярных субстратов одновременно. Поэтому создание систем высокопроизводительного скрининга, с помощью которых можно было бы определять субстратные или ингибиторные свойства лекарств по отношению к цитохромам Р450 является актуальной задачей биохимии и фармакологии. Для исследования каталитической активности цитохромов Р450, высокопроизводительного скрининга потенциальных субстратов, ингибиторов, эффекторов, поиска средств-корректоров метаболической активности этого надсемейства гемопротеинов как биокатализаторов разработаны электрохимические методы анализа, основанные на использовании рекомбинантных и генетически модифицированных ферментов.

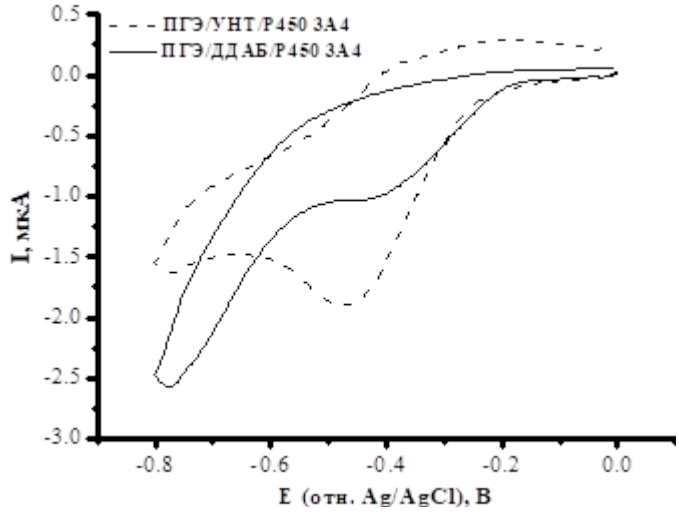


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы иммобилизованного Р450 3А4 на ПГЭ/УНТ в хлороформе (– – –) или 1 мкл 0,1 М раствора ДДАБ (–). Параметры измерения: скорость развертки потенциала 50 мВ/с, диапазон потенциалов от 0 до -0,8 В (отн. Ag/AgCl). Измерения проводили в 1 мл электролитного буфера, pH 7,4, аэробные условия.

Разработаны новые подходы для высокочувствительной регистрации каталитической активности цитохромов Р450 на основе флуоресцентных и электрохимических свойств субстратов и продуктов метаболических реакций цитохромов Р450 [5]. Проведен анализ электрохимических параметров для модели совместного применения лекарств с различной терапевтической направленностью (антибиотики + метаболические антиоксидантные препараты, антибиотики + ингибиторы азольной природы, антибиотики + нейролептики, антибиотики + нестероидные противовоспалительные препараты). Проведена кластеризация межлекарственных взаимодействий экзогенных субстратов (диклофенак, эритромицин, омепразол, кларитромицин) и эндогенных субстратов (тестостерон, кортизол) цитохрома Р450 3А4 с целью корректировки «терапевтических окон» лекарственных препаратов. В группу препаратов, ингибирующих активность цитохрома Р450 3А4, внесены витамины группы В, азольные ингибиторы (кетоконазол, итраконазол), абиратерон. Антиоксидантные метаболические препараты не оказывали влияния на каталитические константы метаболических превращений тестостерона, диклофенака, эритромицина.

Таблица 1. Классификация межлекарственных взаимодействий для корректировки «терапевтических окон»

Ингибирующая активность. Необходима корректировка «терапевтического окна» в сторону увеличения концентрации препарата	Отсутствие влияния. «Терапевтическое окно» не изменяется	Повышение активности Р450. Возможна корректировка «терапевтического окна» в сторону уменьшения концентрации препарата
Витамины группы В (тиамин – витамин В1, рибофлавин – витамин В2, пиридоксин – витамин В6), Кетоконазол, Итраконазол, Абиратерон	Азафен, Липоевая кислота, Мельдоний L-карнитин	Антиоксидантные метаболические препараты (Мексидол, Этоксидол, Цитохром с, Таурин

Разработана система электроанализа на основе рекомбинантного цитохрома Р450 3А4 для исследования межлекарственных взаимодействий препаратов, применяемых в комплексной терапии при лечении заболеваний ЖКТ, обусловленных инфицированием Helicobacter pylori. Показано межлекарственное взаимодействие ингибитора протонного насоса (ИПП, proton pump inhibitor, PPI) – омепразола – и макролидного бактериостатического антибиотика – эритромицина – на уровне цитохрома Р450 3А4. Взаимное влияние этих лекарственных средств на цитохром Р450 3А4 выражается в снижении скорости реакции N-деметилирования эритромицина (регистрируемой по образованию низкомолекулярного продукта формальдегида) в присутствии омепразола, но в отсутствии влияния эритромицина на метаболические превращения омепразола, регистрируемые методом масс-спектрометрии по образованию продукта – омепразол сульфона. Такие межлекарственные взаимодействия могут быть связаны с более высоким сродством омепразола к цитохрому Р450 3А4 (спектральная константа диссоциации K_d = 18 мкМ) по сравнению с эритромицином (K_d = 52 мкМ). В отличие от экспериментов на добровольцах, разработанная модельная система позволяет анализировать межлекарственные взаимодействия на уровне цитохрома Р450 3А4.

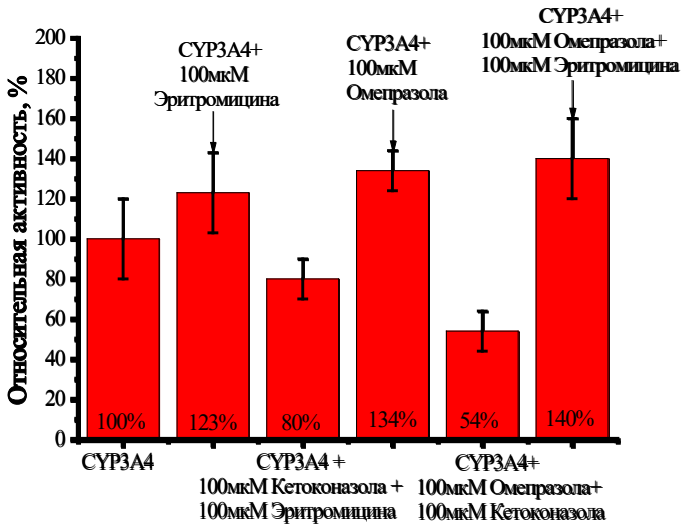


Рис. 2. Относительная интенсивность восстановительных пиков циклических вольтамперограмм цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на печатном графитовом электроде, модифицированном ДДАБ, в аэробных условиях.

В присутствии 100 мкМ кетоконазола – ингибитора смешанного типа для цитохрома P450 3A4 – регистрируется снижение как амплитуды восстановительного тока эритромицина (рис. 2), так и уменьшение каталитической константы k_{cat}, рассчитанных по накоплению формальдегида как продукта цитохром P450 3A4-зависимой реакции N-деметилирования эритромицина. Кетоконазол снижает каталитический ток, регистрируемый в присутствии эритромицина (рис. 2), а каталитическая константа k_{cat} реакции N-деметилирования уменьшается с 13,8 мин$^{-1}$ до 2,22 мин$^{-1}$. В присутствии кетоконазола также регистрировали снижение амплитуды восстановительного тока омепразола, что характерно для разработанного алгоритма электрохимического анализа межлекарственных взаимодействий типа субстрат + ингибитор.

Полипрагмазия при проведении комплексной терапии связана с большим риском проявления межлекарственных взаимодействий и, как следствие, их нежелательных последствий. Разработка экспериментальных моделей для оценки МЛВ при приеме разных групп медицинских препаратов является важной задачей. В настоящем исследовании предложен подход и разработана неинвазивная модель на основе цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на электроде как источнике электронов, для исследования межлекарственных взаимодействий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–04–00374.

ЛИТЕРАТУРА

Ortiz de Montellano P.R. (2015) Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry, Springer, New York, 912 p. DOI: 10.1007/978–3–319–12108–6

Guengerich F.P. (2015) in: P.R. Ortiz de Montellano (Ed.), Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Springer, New York, pp. 523–785.

Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. (2018). Биомедицинская химия, **64**, 149–168. DOI: 10.18097/PBMC20186402149.

Кузиков, А.В., Булко, Т.В., Королева, П.И., Масамрех, Р.А., Бабкина, С.С., Гилеп, А.А., Шумянцева, В.В. (2020). Биомедицинская химия, 66(1), 64–70. DOI: 10.18097/PBMC2020660164

V. Shumyantseva[1,2,3], Tatiana V. Bulko[1,3], Alexey V. Kuzikov[1,2,3], Rami A. Masamrekh[1,2,3], Apollinariya Yu. Konyakhina[3], Iuliia Romanenko[5], Johannes B. Max[5], Moritz Köhler[5], Andrei A. Gilep[4], Sergey A. Usanov[4], Dmitry V. Pergushov[3], Felix H. Schacher[5,6,7], Larisa V. Sigolaeva[1,3] All-electrochemical nanocomposite two-electrode setup for quantification of drugs and study of their electrocatalytical conversion by cytochromes P450. Electrochimica Acta 336 (2020) 135579. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.135579

УДК 57.088.1

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА НА ОСНОВЕ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УЧАСТКОВ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС В БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ (НА ПРИМЕРЕ ФИБРИНОГЕНА).

Л.В. Юрина[1], А.Д. Васильева[1], А.Е. Бугрова[1], М.И. Индейкина[2], А.С. Кононихин[3], Е.Н. Николаев[4], М.А. Розенфельд[1]

[1] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва, Россия
[2] Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет г. Долгопрудный, Московская область, Россия
[3] Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе, Москва, Россия,
4 Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия.

В настоящее время изучение окисления белков, в том числе белков плазмы, является одним из наиболее перспективных научных направлений в области радикальной биологии и медицины. Белки как уязвимая мишень для активных форм кислорода участвуют в окислительных модификациях, которые приводят к структурным и химическим повреждениям. Окислительная модификация белка может привести к значительной потере биохимических функций белка [1].

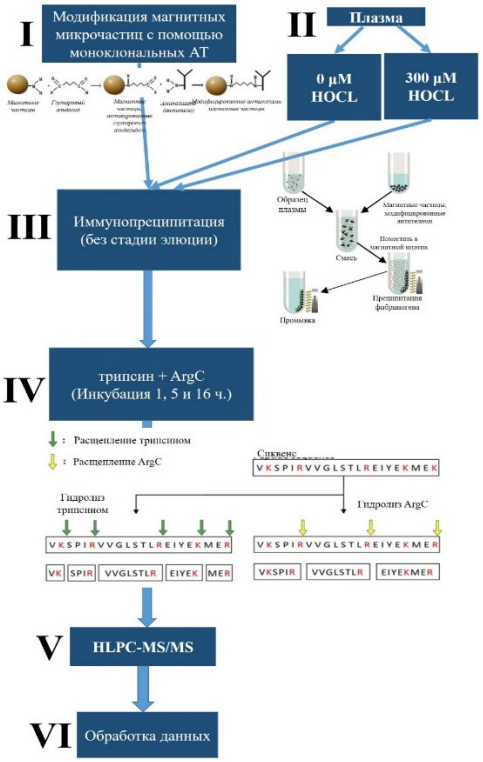


Рисунок 1. Схема эксперимента.

Объектом исследования был выбран белок фибриноген (4 % от общего количества белков плазмы), проявляющий большую чувствительность к воздействию окислителей, чем другие белки плазмы крови (альбумин, иммуноглобулины, трансферрин, церулоплазмин), являющийся ключевым белком в системе свертывания крови [2]. Также фибриноген является чувствительным маркером воспаления и некроза тканей (один из белков острой фазы воспаления), основным белком плазмы, влияющим на величину СОЭ. Концентрации фибриногена в плазме соотносится с увеличением риска осложнений сердечно-сосудистых заболеваний [3].

В рамках данного исследования были разработаны и адаптированы следующие методы, основанные на иммунопреципитации на магнитных частицах (для фибриногена): 1) иммуноферментный анализ на магнитных частицах для определения количества преципитированного белка; 2) трипсинолиз на магнитных частицах с исключением стадии элюирования для дальнейшего анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Разработка методик трипсинолиза на магнитных шариках за исключением стадии элюции для дальнейшего анализа (ВЭЖХ-МС/МС) позволила: 1) упростить процедуры при работе с большим количеством образцов, 2) сократить общее время анализа, 3) избежать появления окислительных модификаций, не связанных с патологическими условиями или вызванных окислением, но возникающих в результате длительной подготовки образца или использования агрессивных условий элюирования, которые препятствуют анализу результатов. Схема эксперимента приведена на рисунке 1.

Результаты, полученные в рамках данного исследования с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС, помогут создать принципиально новые диагностические подходы для клинической и лабораторной практики, основанные на обнаружении и количественном определении окислительных сайтов, возникающих в результате развития окислительного стресса при различных патологиях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–04–01313_а. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского Научного фонда, № 16–14–00181.

ЛИТЕРАТУРА.

[1] I. Dalle-Donne, et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. Mass Spectrom Rev (2005) 24(1):55–99.
[2] E. Shacter, J.A. et al. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. Free Radical Biology and Medicine (1994) 17(5):429–437.
[3] L. Wilhelmsen, K. et al.. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. N Engl J Med (1984) 311:501–505

УДК616.36–002

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕПАТИТА Е МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Л.Н. Нестеренко [1], Г.И. Алаторцева [1], И.И. Амиантова [1], Л.Н. Лухверчик [1], Л.С. Зимарин [1], О.И. Лебедев [2]

[1] НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия
[2] Университет «ENSICAEN-CNRS», Каен, Франция

Разработка методов экспресс-диагностики гепатита Е (ГЕ) является актуальной задачей. Основным методом экспресс-диагностики вирусных инфекций является иммунохроматографический анализ (ИХА), в котором традиционно используются конъюгаты антигенов и / или антител с наночастицами коллоидного золота (НКЗ), от уникальных свойств поверхности которых зависит эффективность тестов. Цель исследований – получение НКЗ для экспресс-диагностики ГЕ методом ИХА.

Синтез НКЗ проводили по методу Френса [1], основанному на восстановлении золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия. Используя разное количество восстановителя, получили два препарата НКЗ (НКЗ1, НКЗ2) с частицами сферической формы с высокой гомогенностью по размеру и отсутствием агрегации. С помощью просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения показано, что средний размер НКЗ1 – 16,4 нм (ожидаемая величина по Френсу – 16,0 нм), НКЗ2 – 25,7 нм (ожидаемая величина – 24,5нм). На электронных микрофотографиях видна кристаллическая решетка из атомов золота, что подтверждают данные электронной дифракции и энергодисперсионного анализа. Конъюгаты НКЗ с антителами козы против IgM человека (ИМТЕК, Россия) (АТ) или рекомбинантным мозаичным антигеном, содержащим фрагменты белков ORF2 и ORF3 вируса ГЕ 1 и 3 генотипов, (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова) (АГ) получали путем их пассивной иммобилизации. Специфичность конъюгатов исследовали методом иммунодота в непрямом формате с образцами сывороток крови больных ГЕ, содержащими IgM-антитела к вирусу ГЕ, и клинических здоровых людей из лечебно-профилактических учреждений г. Ош, Киргизия. Для тестирования конъюгатов НКЗ1 и НКЗ2 с АГ на поверхности мембран сорбировали АТ в количествах 0,1, 0,05, 0,025 и 0,012 мкг, для анализа конъюгатов НКЗ1 и НКЗ2 с АТ сорбировали АГ в таких же количествах. В качестве отрицательного контроля на мембранах сорбировали 0,1 мкг бычьего сывороточного альбумина. В реакциях специфических антител IgM с иммуносорбентом и конъюгатом происходило окрашивание мембран в области с сорбированными АТ (для конъюгатов НКЗ1 и НКЗ2 с АГ) или АГ (для конъюгатов НКЗ1 и НКЗ2АТ с АТ) в малиновый цвет. С отрицательными сыворотками конъюгаты не взаимодействовали. Все четыре конъюгата НКЗ были активны в разведениях с оптической плотностью 0,5 о.е. при λ=520 нм в реакции с АТ и АГ, сорбированными на поверхности нитроцеллюлозных мембран в количестве 0,012 мкг, контрольные пятна на мембранах не окрашивались.

Таким образом, на основе синтезированных НКЗ получены иммунореагенты для применения при разработке тестов для диагностики ГЕ методом ИХА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI61319X0091).

ЛИТЕРАТУРА

Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. Nat. Phys. Sci. // 1973. V 241(105). P. 20–22.

УДК 579.61

АНТИМИКРОБНАЯ И РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАН-ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФИЦИНА

Д.Р. Байдамшина[1], Е.Ю. Тризна[1], М.Г. Холявка[2], А.Р. Каюмов[1]

[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия,
[2] Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Облегчение и ускорение заживления хронических и острых ран и ожогов является важной задачей медицины. Протеолитические ферменты являются эффективным средством для восстановления тканей, поскольку они разрушают поврежденные клетки, некротический массы и уменьшают время заживления, снижают отечность и боль [1, 2]. Трипсин и химотрипсин были предложены в 1962 году для ускорения заживления ран после удаления зубов [2] и до настоящего времени широко используются в клинической практике.

Помимо различных факторов, влияющих на заживление ран, во многих исследованиях говорится о том, что бактериальные биопленки, образующиеся на поверхности ран, оказывают вредное воздействие на ранозаживление и приводят к образованию хронических инфекций [3, 4]. Как только образуется биопленка, бактерии в ней становятся чрезвычайно устойчивыми к антибактериальным препаратам и иммунной системе [5,6]. В биопленках бактериальные клетки встроены в самопродуцирующуюся матрицу, состоящую из полисахаридов, ДНК и белков [5, 7], что требует разработки подходов для разрушения клеток встроенных в биопленки [8]. Группой ученых было доказано преимущество протеолитических ферментов в качестве ранозаживляющих средств, поскольку они разрушают белковые компоненты матрикса биопленок и тем самым повышают эффективность антибактериальной терапии. Но так как ферменты – вещества белковой природы, они неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловому воздействию. Данные проблемы помогает решить иммобилизация ферментов на нерастворимых носителях. Иммобилизованные ферменты обладают благоприятными свойствами, такими как большая устойчивость к ингибиторам, литическая активность, автолиз, многоразовость биокатализатора, предотвращение агрегации фермента и взаимодействия с внешними факторами [9]. Тем не менее современные знания о преимуществах иммобилизованных протеаз как для лечения ран, так и для подавления образования биопленок весьма ограничены.

В работе использовали фицин иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане сотрудниками Воронежского государственного университета.

Ранее мы показали, что фицин разрушает стафилококковые биопленки и повышает эффективность различных противомикробных препаратов против клеток, внедренных в биопленку [10]. Чтобы исследовать влияние иммобилизованного на хитозане фицина на биопленки, S. aureus и S. epidermidis бактерии выращивали в 24-луночных планшетах при 37 °C на среде BM для образования прочной биопленки. После 48 часов культивирования, удаляли культуральную жидкость, вносили свежую среду, содержащую фицин в растворимом и иммобилизованных формах (конечные концентрации иммобилизованного фермента и хитозана составляли 0,75, 7,5 и 75 мг/мл, что соответствует (по общей активности) 10, 100 и 1000 мкг/мл растворимого фицина). Затем проводили окрашивание остаточной биопленки кристаллическим фиолетовым.

Растворимый фицин в концентрациях 100 и 1000 мкг/мл приводил к значительному уменьшению биомассы биопленок, образованных как S. aureus, так и S. epidermidis (остаточные биопленки составляли 50 % и 20 % от первоначальной, см. рис. 1). Интересно, что обработка как хитозаном, так и иммобилизованным ферментом в концентрациях 0,75 и 7,5 мг/мл приводила к умеренному разрушению биопленки, хотя различий между чистым хитозаном и хитозаном с иммобилизованным фицином не наблюдалось. По-видимому, вышеуказанный эффект является следствием механического удаления биопленки частицами хитозана. В присутствии хитозана в концентрации 75 мг/мл на пластине удерживалось в 2,5 раза больше красителя, по-видимому, из-за прилипания хитозана к поверхности. Чтобы устранить побочные эффекты, вызванные адгезией хитозана, и охарактеризовать разрушение стафилококковой биопленки иммобилизованным фицином, обработанные биопленки были проанализированы подсчетом КОЕ. Анализ показал, что обработка растворимым или иммобилизованным фицином приводила к аналогичному уменьшению жизнеспособных клеток в биопленке (рис 1В), подтверждая, что иммобилизованный фицин сохраняет активность против биопленок S. aureus и S. epidermidis. Сам хитозан вызывал частичное разрушение биопленки, по-видимому, из-за механического повреждения его структуры (рис. 1).

Клетки находящиеся в составе биопленки, становятся едва доступными для биоцидов и антибиотиков. Мы проверили, повысит ли эффективность антимикробных препаратов, иммобилизованный на хитозане фицин против поверхностно-адгезивных бактерий за счет повреждения биопленки, как это было показано ранее для растворимого фицина [10].

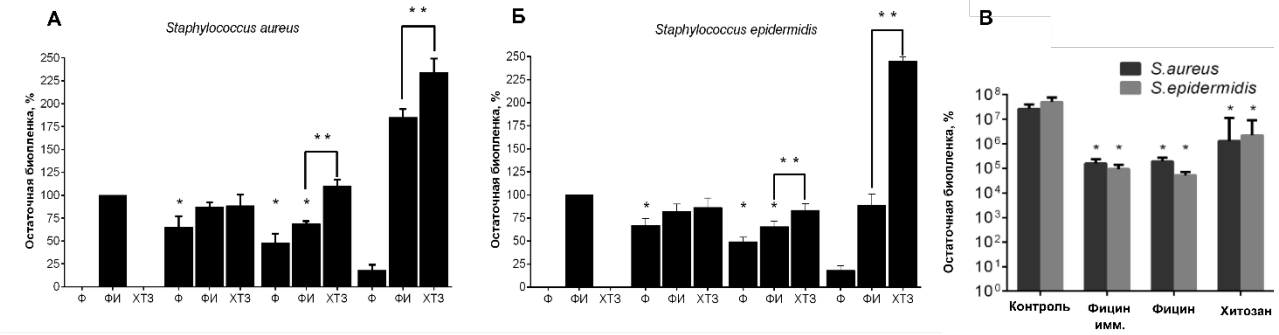


Рисунок 1 – Разрушение бактериальных биопленок фицином в растворимой и иммобилизованной на среднемолекулярном хитозане формах (где Ф – фицин, ФИ – фицин иммобилизованный, ХТЗ – хитозан)

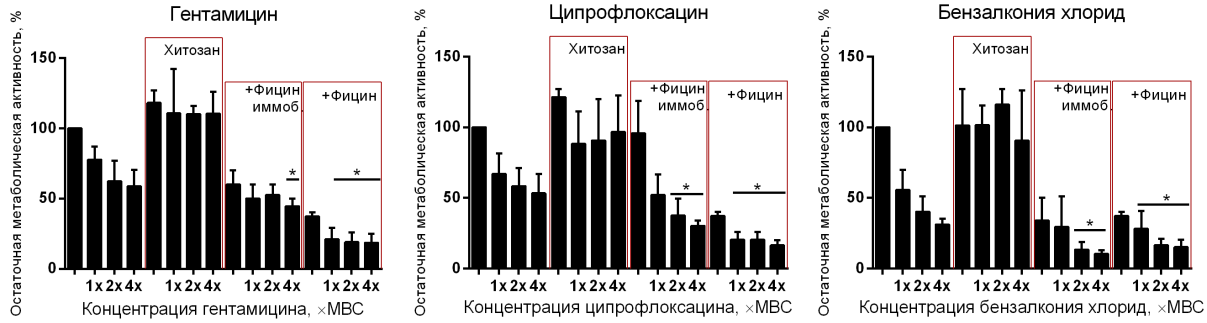


Рисунок 2 – Ферменты разрушают биопленку и повышают эффективность антибиотиков против клеток S.aureus в составе сформированной биопленки

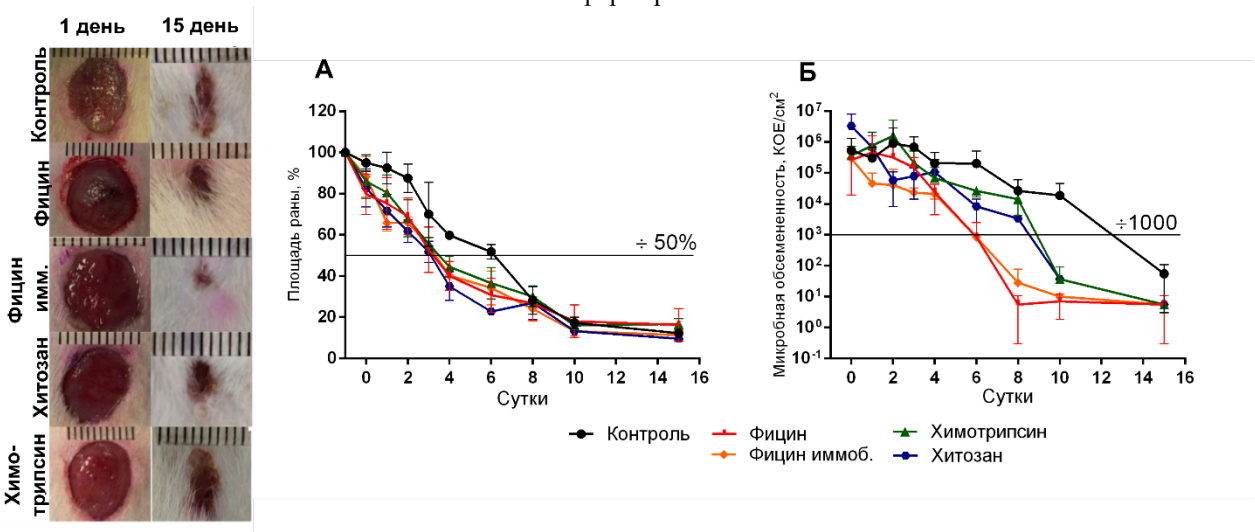


Рисунок 3 – Скорость заживления (А) и микробная обсеменённость (Б) ран на спинной части крыс при обработке раствором фицина в растворимой и иммобилизованной форме, хитозаном и химотрипсином. Контрольная группа обрабатывалась 0.9 % раствором NaCl

В соответствии с более ранними данными [10], обработка растворимым фицином значительно повышала эффективность всех антимикробных препаратов против биопленок, образованных клетками S. aureus (см. рис. 2). Эффект иммобилизованного фицина был менее выражен. Таким образом, достоверная разница в снижении остаточной метаболической активности клеток в составе биопленок, обработанных либо исключительно гентамицином, либо в присутствии иммобилизованного фицина, наблюдалась только при 4×МБК гентамицина.

Напротив, ципрофлоксацин и бензалкония хлорид при концентрациях, соответствующих 2–4×МБК приводили к достоверно большему снижению остаточной метаболической активности адгезированных клеток, обработанных иммобилизованным фицином. При использовании только хитозана активность всех антибиотиков также подавлялась, по-видимому, из-за дополнительного диффузного барьера или связывания антибиотиков с хитозаном. Эти данные свидетельствуют о том, что фицин, иммобилизованный на матрице хитозана, потенцирует действие антибиотиков против встроенных в биопленку бактерий, хотя и менее эффективен по сравнению с растворимым ферментом (рис. 2).

Полученные данные подтвердили эффективность как растворимого, так и иммобилизованного фицина для разрушения стафилококковых биопленок. Поскольку стафилококковые биопленки, образующиеся на поверхности ран, ранее были предложены в качестве ключевого фактора, замедляющего их заживление, влияние обеих форм фермента на заживление ран и антимикробное лечение бактериальной инфекции оценивалось с использованием модели раны кожи крыс, инфицированной S. aureus. Через двадцать четыре часа после повреждения кожи и заражения крыс, полученные инфицированные раны либо не лечили (контроль), либо подвергали различным сценариям обработки, включая растворимый фицин, иммобилизованный фицин, хитозан и химотрипсин в качестве второго контроля. Скорость заживления раны наблюдали в течение всего периода исследования путем измерения площади раны, скорость распространения бактериальной инфекции оценивали путем взятия мазков с раневой поверхности и с последующим подсчетом КОЕ.

Полученные результаты указывают на значительное улучшение скорости заживления ран в группах, обработанных либо растворимым, либо иммобилизованным фицином, химотрипсином и хитозаном, по сравнению с контролем (рис. 3А). Так, в группах, получавших любой вид лечения, на 4-е сутки после начала лечения наблюдалось 50 % – ное закрытие ран, в то время как в контрольной группе аналогичный эффект был достигнут только на 6-е сутки. Интересно, что на 6-й день в группах, обрабатываемых растворимым или иммобилизованным фицином, наблюдалось 3-логарифмическое падение жизнеспособности S. aureus в мазках из ран по сравнению с 10-м днем в группах, получавших обработку либо хитозаном, либо химотрипсином. В контрольной группе этот эффект наблюдался только на 15-й день (рис. 3Б). Таким образом, обработка ран фицином в растворимой или иммобилизованной форме значительно ускоряет заживление и усиливает микробную дезактивацию (рис. 3).

Полученные данные позволили предположить, что фицин в растворимой и иммобилизованной формах оказывает ранозаживляющее действие, что вместе с эффектом микробной деконтаминации представляет интерес для разработки ранозаживляющей терапии с применением этого фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 19–34–90061

ЛИТЕРАТУРА

1. Shah D., Mital K. The role of trypsin: chymotrypsin in tissue repair //Advances in therapy. 2018. Т. 35. – №. 1. – С. 31–42.
2. Chandanwale A. et al. A randomized, clinical trial to evaluate efficacy and tolerability of trypsin: chymotrypsin as compared to serratiopeptidase and trypsin: bromelain: rutoside in wound management //Advances in therapy. – 2017. – Т. 34. – №. 1. – С. 180–198.
3. Kirker K.R., James G.A. In vitro studies evaluating the effects of biofilms on wound-healing cells: a review //Apmis. – 2017. – Т. 125. – №. 4. – С. 344–352.
4. Malone M. et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data //Journal of Wound Care. – 2017. – Т. 26. – №. 1. – С. 20–25.
5. Percival S.L. et al. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds //Wound repair and regeneration. – 2012. – Т. 20. – №. 5. – С. 647–657.
6. Roy S. et al. Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function //The Journal of pathology. – 2014. – Т. 233. – №. 4. – С. 331–343.
7. Minaev B.F. Electronic mechanisms of molecular oxygen activation //Russ. Chem. Rev. – 2007. Т. 76. №. 11. С. 989–1011.
8. Wang J. et al. Functional and bioinformatics analysis of an exopolysaccharide-related gene (epsN) from Lactobacillus kefiranofaciens ZW3 //Archives of microbiology. – 2016. – Т. 198. – №. 7. – С. 611–618.
9. Klasen H.J. A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds //Burns. – 2000. – Т. 26. – №. 3. – С. 207–222.
10. Baidamshina D.R. et al. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – С. 46068.

УДК 571.27

ВЛИЯНИЕ ЛИПИДОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ АЛЛЕРГЕНА ЧЕЧЕВИЦЫ LEN C 3

Д.Н. Мельникова, Е.И. Финкина, И.В. Богданов, Т.В. Овчинникова

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Последние данные в области структурной биологии и аллергологии, показывают что взаимодействие растительных и животных аллергенов с их лигандами приводит к структурным изменениям белков, которые влияют на их стабильность и аллергенные свойства. Ранее нами был выделен и охарактеризован новый аллерген чечевицы Len c 3, относящийся к классу липид-транспортирующих белков (LTP). Мы также показали, что Len c 3 способен связывать различные липидны с разной эффективностью.

Цель работы – изучение pH- и термостабильности аллергена чечевицы Len c 3 и влияние на них липидных лигандов.

Как мы показали ранее, пространственная структура Len c 3 подобна таковой у других растительных LTP и состоит из четырех α-спиралей и длинного С-концевого хвоста без регулярной вторичной структуры. Спектры КД Len c 3 при pH 7,4 и 2,5 были идентичны и имели форму, характерную для α-спиральной структуры, что указывает на стабильность белка в кислых условиях и желудке человека. С другой стороны, денатурация белка происходила при нагревании от 80 до 98,5° С, и его структура не восстанавливалась после охлаждения. В качестве эндогенных и экзогенных лигандов Len c 3 были использованы жирные кислоты (ЖК) (C12:0, C16:0, C18:0, C18:1) и лизолипиды (LPPC, LPPG). Наибольший защитный эффект на структуру белка оказал отрицательно заряженный LPPG, при этом эффект от нейтрально заряженного LPPC был намного слабее. В присутствии LPPG Len c 3 был очень стабилен и полностью сохранял свою структуру при нагревании до 98,5 °C. Нагретый до 90 °C Len c 3 также эффективно связывал LPPG, но не LPPC. Вероятно, в присутствии LPPG происходило частичное восстановление структуры нагретого белка. Среди ЖК C18:1 проявила наибольшее защитное действие на структуру белка, однако наблюдалась частичная денатурация белка при нагревании до 98,5 °C. Влияние других ЖК на термостабильность белка снижалось в следующем порядке C18:0 <C12:0 <C22:0. Эти данные согласуются с тем фактом, что Len c 3 практически не связывает C22:0 из-за конформационных ограничений, налагаемых размером гидрофобной полости белка, и образует более стабильный комплекс с ненасыщенными ЖК. Таким образом, Len c 3 чувствителен к нагреванию, но в присутствии липидных лигандов во время приготовления пищи может сохранять свою природную структуру и аллергенный потенциал. Выраженность этого защитного эффекта может зависеть от качественного и количественного состава липидной смеси.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20–45–05002).

УДК 577.112.345

СИНТЕЗ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОМИМЕТИКОВ НА ОСНОВЕ ДИЭТАНОЛАМИНА

М.К. Гусева, Т.Г. Бодрова, У.А. Буданова, Ю.Л. Себякин

Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Одной из основных проблем современной медицины является развитие резистентности бактерий к существующим антибиотикам [1, 2]. Поэтому возникла необходимость в создании противомикробных препаратов с новым механизмом действия и высокой антибактериальной активностью. Известно, что антимикробные пептиды (АМП) являются ключевыми компонентами врожденной иммунной системы большинства организмов [3]. Однако, клиническое применение АМП ограничено из-за большого количества недостатков. Более перспективными противомикробными агентами являются пептидомиметики, которые рассматривают как аналоги нативных АМП. Целью данного исследования является разработка схемы синтеза новых катионных пептидомиметиков на основе диэтаноламина в качестве спейсерного участка.

В ходе работы нами разработана схема синтеза серии новых катионных амфифилов (рис. 1), структура, которых по предварительным расчетам гидрофильно-липофильного баланса потенциально обеспечивает им антибактериальные свойства. В качестве спейсера в данных соединениях присутствует диэтаноламин, который часто используется в фармацевтических препаратах и позволяет синтезировать различные липопептиды на его основе [4]. Гидрофобный блок состоит из насыщенной алифатической цепи длиной C_8 и C_{12}. Гидрофильный участок представлен β-L-аланином и γ-L-аминомасляной кислотой, что позволит проследить влияние длины углеводородной цепи не только липофильного блока, но и аминокислотного остатка на показатель минимальной ингибирующей концентрации (MIC) в отношение бактерий различной природы.

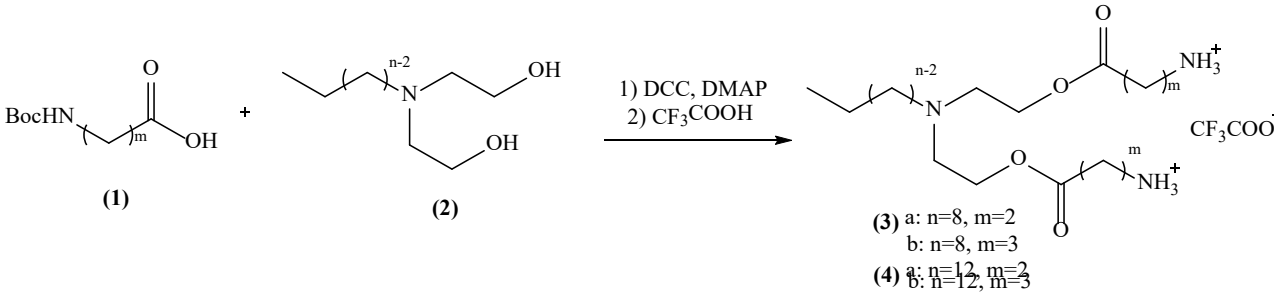


Рис. 1 – Схема синтеза целевых соединений

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований, грант РФФИ № 20–04–00672.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bush, K.; Courvalin, P.; Dantas, G. et al. // Nat. Rev. Microbiol. 2011. 9. 894–896.
2. Boucher, H.W.; Talbot, G.H.; Bradley, J.S. et al. // Clin. Infect. Dis. 2009. 48. 1.
3. Narayana, J.L.; Chen, J.Y. // Peptides 2015. 72. 88.
4. Kang, W., Wang, W., Zhi, // Bioorg. Med. Chem. Lett., 2012. 22. 1187.

УДК 678.5

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Т.С. Демина[1,2], Т.А. Акопова[2], П.С. Тимашев[1]

[1] Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия
[2] Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

Одной из широко используемых в медицине форм материалов являются нано / микроразмерные частицы, которые применяют в качестве систем адресной доставки, матриксов для прикрепления / роста клеток или мультифункциональных материалов, выполняющих обе вышеуказанные функции. Изначально полимерные микрочастицы использовали в качестве подложек с большой площадью поверхности для культивирования субстрат-зависимых клеток in vitro, но в рамках современной концепции регенеративной медицины полимерные микрочастицы рассматриваются в качестве биорезорбируемых матриксов для тканевой инженерии, которые могут быть наполнены биологически активными компонентами / лекарствами [1–4]. Возможность регулировать архитектонику частиц на микро-/наноразмерном уровне, а также контролировать их физико-химические свойства позволяет использовать их в качестве микротканей, которые можно вводить неинвазивно и заполнять дефекты сложной формы. Применение микрочастиц в качестве мультифункциональных клеточных микроносителей основано на малоинвазивном имплантировании in vivo в поврежденные участки тканей клеток, прикрепленных к поверхности микрочастиц, что позволяет осуществить направленную мультипликацию клеток in vitro в биореакторе и обеспечить их доставку в поврежденные участки тканей. Микроносители обладают целым рядом преимуществ перед остальными средствами доставки клеток. Во-первых, их размер (~ 100–250 мкм) и способность к суспендированию в водных средах позволяет вводить их в поврежденные участки тканей инъекционно. Во-вторых, можно комбинировать различные линии клеток. В-третьих, они могут одновременно служить средствами доставки биоактивных компонентов, высвобождающихся в процессе деградации полимера. Еще одним очень перспективным направлением использования полимерных микрочастиц является получение на их основе биодеградируемых трехмерных матриксов с заданной архитектоникой с помощью различных методов, в т. ч. аддитивных технологий [4–7].

Состав и структура микрочастиц для применения в тканевой инженерии должны соответствовать традиционному ряду требований, предъявляемых к матриксам для тканевой инженерии [8]. В качестве основного компонента микрочастиц в подавляющем большинстве случаев используют биодеградируемые сложные полиэфиры (полилактид, поликапролактон и их сополимеры), которые имеют долгую историю успешного применения в медицине [9–12]. Одним из наиболее популярных методик получения микрочастиц из полиэфиров является метод испарения растворителей из эмульсий масло / вода [13–16]. Суть метода заключается в эмульгировании дисперсной «масляной» фазы, состоящей из раствора полимера в несмешивающемся с водой растворителе (как правило, хлороформ, дихлорметан и т. д.), в дисперсионной водной среде, которая содержит эмульгатор для стабилизации границы раздела фаз масло / вода. В процессе длительного перемешивания растворитель из дисперсной фазы испаряется и эмульсия превращается в суспензию твердых микрочастиц в воде. Популярность этого метода основана на его относительной простоте и возможности варьировать условия формирования микрочастиц (соотношение фаз, концентрацию полимера, скорость / режим перемешивания и т. д.). Более того, возможность варьировать состав фаз позволяет получать микрочастицы сложной морфологии с заданными структурой и свойствами.

Цель работы – обобщение экспериментальных данных по различным подходам к регулированию структуры и свойств биодеградируемых микрочастиц в процессе их формования методом испарения растворителя из эмульсий масло / вода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали полилактид (ПЛА) с молекулярной массой (ММ) 100 кДа (Natureworks 4043D) и 160 кДа (Sigma-Aldrich); поликапролактон (ПКЛ) с ММ 67 кДа; сополимеры хитозана, синтезированными методом твердофазного реакционного смешения [17–21]; нанокристаллические хитин и целлюлозу [22,23], а также ряд коммерчески доступных полисарахидов и их производных.

Микрочастицы получали методом испарения растворителя из эмульсии масло / вода по методике, описанной в [18, 19]. Раствор полиэфира, их смесей или сополимеров с олиго / полиэфирами в смеси растворителей дихлорметан / ацетон (9/1 об./об.) использовали в качестве дисперсной фазы. В качестве дисперсионной среды выступала или дистиллированная вода или растворы полисахаридов (в т. ч. их производных и сополимеров) или водные дисперсии нанокристаллических полисарахидов. Диспергирование фаз в соотношении 10/90 (масло / вода) осуществляли на верхнеприводной мешалке при контролируемой температуре до полного испарения растворителей из дисперсной фазы. Получившиеся микрочастицы промывали, фракционировали по размерам на наборе сит, сушили лиофильно. Микрочастицы характеризовали с точки зрения их выхода, распределения микрочастиц по размерам; морфологию оценивали с помощью сканирующего электронного микроскопа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной путь регулирования структуры и свойств микрочастиц в процессе их получения из эмульсий лежит в рамках оптимизации состава фаз. Варьирование состава дисперсионной «водной» среды в основном связано с модифицированием состава / морфологии поверхности. Даже при использовании классических поверхностно-активных веществ (например, поливиниловый спирт) на поверхности микрочастиц остается эмульгатор [24], что может быть неблагоприятным для дальнейшего их использования в качестве клеточных микроносителей. С другой стороны, оптимизация эмульгатора позволяет обогатить поверхность получаемых микрочастиц целевыми компонентами. В этом случае важна способность такого компонента стабилизировать границу раздела фаз. Природные макромолекулы (полисахариды, белки и т. д.), присутствие которых на поверхности микрочастиц из синтетических полиэфиров могло бы увеличить их биосовместимость, как правило, не могут обеспечить эффективную стабилизацию эмульсий в процессе формования микрочастиц, поэтому целесообразно использовать их производные / сополимеры. Ранее было показано, что прививка на хитозан коротких цепей олиголактида позволяет получить амфифильные макромолекулы, которые обеспечивают высокий выход микрочастиц и наличие на их поверхности фрагментов хитозана, что положительно влияет на адгезию и рост клеток [20, 21, 25]. В качестве эмульгатора в дисперсионной среде также можно использовать наночастицы, которые также способны стабилизировать границу раздела фаз и позволяют получать микрочастицы со структурой ядро / оболочка [26, 27]. В случае полисахаридов наиболее простым вариантом их наноразмерных форм являются нанокристаллы, полученные селективным кислотным гидролизом аморфных областей нативных полисахаридов, что приводит к получению нанокристаллов игольчатой формы [26]. Нанокристаллические полисахариды эффективно стабилизуют границу раздела фаз в процессе получения микрочастиц из полилактида, но в отличие от микрочастиц, стабилизируемых макромолекулярными эмульгаторами, их поверхность имеет довольно неоднородную морфологию [22, 23]. Модифицирование структуры / свойств только поверхностного слоя важно для обеспечения адгезии клеток на поверхность микрочастиц, а также с точки зрения дальшейшего формирования на их основе трехмерных материалов, в т. ч. с помощью метода поверхностно-селективного лазерного спекания.

Более сложный вариант модифицирования заключается в варьировании состава дисперсной «масляной» фазы, что приводит к регулированию структуры/свойств объема микрочастиц. В простейшем варианте возможно получение микрочастиц из смеси различных полиэфиров (например, полилактида с поликапролактоном), что, однако, приводит к их фазовому разделению в процессе испарения растворителя и в любом случае требует использования эмульгатора в дисперсионной среде. Модифицирование химической структуры полимера, растворенного в дисперсной фазе, должно быть направлено на придание ему амфифильных свойств и способности к «самостабилизации» при получении микрочастиц без применения дополнительных эмульгаторов в дисперсионной среде. Наиболее перспективным вариантом комбинирования полимеров для использования в дисперсной фазе является сополимеризация сложных полиэфиров с различными полисахаридами [18–20,28]. Варьирование химической структуры (молекулярная масса основной цепи; количество, степень полимеризации и природа привитых боковых фрагментов) позволяет получать микрочастицы различной морфологии (микрокапсулы, макропористые), которые могут эффективно служить в качестве клеточных микроносителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для успешного применения полимерных микрочастиц в качестве клеточных микроносителей необходимо регулировать их структуру и свойства, что возможно в рамках модифицирования состава фаз при их получении методом испарения растворителей из эмульсий масло / вода. При модифицировании состава дисперсионной «водной» среды можно регулировать структуру / свойства поверхности, а варьирование химической структуры полимера в дисперсной фазе открывает возможности для получения микрочастиц с заданными структурой / свойствами объема.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента (МК-1974.2019.3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hernández R.M., Orive G., Murua A., Pedraz J.L. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. Elsevier B.V., 2010. Vol. 62, № 7–8. P. 711–730.
2. Li B., Wang X., Wang Y., Gou W., et al. Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering // J. Orthop. Transl. Elsevier Taiwan LLC and the, 2015. Vol. 3, № 2. P. 51–57.
3. Chen X.Y., Chen J.Y., Tong X.M., Mei J.G., et al. Recent advances in the use of microcarriers for cell cultures and their ex vivo and in vivo applications // Biotechnol. Lett. Springer Netherlands, 2019. Vol. 42, № 1. P. 1–10.
4. Neto M.D., Oliveira M.B., Mano J.F. Microparticles in Contact with Cells: From Carriers to Multifunctional Tissue Modulators // Trends Biotechnol. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 37, № 9. P. 1011–1028.
5. Zhou W.Y., et al. Selective laser sintering of tissue engineering scaffolds using poly(L-Lactide) microspheres // Key Eng. Mater. 2007. Vol. 334–335 II. P. 1225–1228.
6. Zhou W.Y.,, et al. Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(l-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2008. Vol. 19, № 7. P. 2535–2540.
7. Antonov E.N., Krotova L.I., Minaev N. V, Minaeva S.A., et al. Surface-selective laser sintering of thermolabile polymer particles using water as heating sensitizer // Quantum Electron. 2015. Vol. 45, № 11. P. 1023–1028.
8. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // Mater. Today. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 14, № 3. P. 88–95.
9. Sawalha H., Schroën K., Boom R. Biodegradable polymeric microcapsules: Preparation and properties // Chem. Eng. J. Elsevier B.V., 2011. Vol. 169, № 1–3. P. 1–10.
10. Gritsch L., et al. Polylactide-based materials science strategies to improve tissue-material interface without the use of growth factors or other biological molecules // Mater. Sci. Eng. C. Elsevier, 2019. Vol. 94, № August 2018. P. 1083–1101.
11. Madhavan Nampoothiri K., Nair N.R., John R.P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research // Bioresour. Technol. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 101, № 22. P. 8493–8501.
12. Molavi F., Barzegar-Jalali M., Hamishehkar H. Polyester based polymeric nano and microparticles for pharmaceutical purposes: A review on formulation approaches // J. Control. Release. Elsevier, 2020. Vol. 320, № October 2019. P. 265–282.
13. Rosca I.D., Watari F., Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation // J. Control. Release. 2004. Vol. 99, № 2. P. 271–280.
14. Campos E., Branquinho J., Carreira A.S., Carvalho A., et al. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications // Eur. Polym. J. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 49, № 8. P. 2005–2021.
15. O'Donnell P.B., McGinity J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique // Adv. Drug Deliv. Rev. 1997. Vol. 28, № 1. P. 25–42.
16. Bee S.T.L., Hamid Z.A.A., Mariatti M., Yahaya B.H., et al. Approaches to Improve Therapeutic Efficacy of Biodegradable PLA/PLGA Microspheres: A Review // Polym. Rev. Taylor & Francis, 2018. Vol. 58, № 3. P. 495–536.
17. Demina T.S., Kuryanova A.S., Bikmulina P.Y., Aksenova N.A., et al. Multicomponent Non-Woven Fibrous Mats with Balanced Processing and Functional Properties // Polymers (Basel). 2020. Vol. 12, № 9. P. 1911.
18. Demina T.S., Drozdova M.G., Sevrin C., Compère P., et al. Biodegradable cell microcarriers based on chitosan/polyester graft-copolymers // Molecules. 2020. Vol. 25, № 8.
19. Demina T.S., Sevrin C., Kapchiekue C., Akopova T.A., et al. Chitosan-g-Polyester Microspheres: Effect of Length and Composition of Grafted Chains // Macromol. Mater. Eng. 2019. Vol. 304, № 10. P. 1900203.
20. Demina T.S., et al. Polylactide-based microspheres prepared using solid-state copolymerized chitosan and d, l – lactide // Mater. Sci. Eng. C. 2016. Vol. 59. P. 333–338.
21. Demina T.S., Birdibekova A.V., Svidchenko E.A., Ivanov P.L., et al. Solid-State Synthesis of Water-Soluble Chitosan-g-Hydroxyethyl Cellulose Copolymers // Polymers (Basel). 2020. Vol. 12, № 3. P. 611.
22. Sotnikova Y.S., Demina T.S.S., Istomin A.V.V., Goncharuk G.P.P., et al. Application of micro – and nanocrystalline cellulose // IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. 2018. Vol. 347, № 1. P. 012006.
23. Demina T.S., Sotnikova Y.S., Istomin A.V., Grandfils C., et al. Preparation of Poly(L, L-Lactide) Microparticles via Pickering Emulsions Using Chitin Nanocrystals // Adv. Mater. Sci. Eng. 2018. Vol. 2018. P. 1–8.
24. Sahoo S.K., et al.Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake // J. Control. Release. 2002. Vol. 82, № 1. P. 105–114.
25. Privalova A., Markvicheva E., Sevrin C., Drozdova M., et al. Biodegradable polyester-based microcarriers with modified surface tailored for tissue engineering // J. Biomed. Mater. Res. – Part A. 2015. Vol. 103, № 3. P. 939–948.
26. Calabrese V., Courtenay J.C., Edler K.J., Scott J.L. Pickering emulsions stabilized by naturally derived or biodegradable particles // Curr. Opin. Green Sustain. Chem. Elsevier B.V., 2018. Vol. 12, № Figure 1. P. 83–90.
27. Wei Z., Wang C., Zou S., Liu H., et al. Chitosan nanoparticles as particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules // Polymer (Guildf). Elsevier Ltd, 2012. Vol. 53, № 6. P. 1229–1235.
28. Yang L., Zhang J., He J., Zhang J., et al. Fabrication, hydrolysis and cell cultivation of microspheres from cellulose-graft-poly(l-lactide) copolymers // RSC Adv. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 6, № 21. P. 17617–17623.

УДК 616.371

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СЛИТОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА OPRF-ATOX-OPRI

***Е.М. Зимина*[1], *А.А Калошин*[1], *А.В. Солдатенкова*[1], *Н.А. Михайлова*[1], *Е.Д. Меркушова*[2]**

[1] *НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия*
[2] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Синегнойная палочка (Pseudomonas aeruginosa) – возбудитель острых и хронических инфекционных заболеваний у пациентов с иммунодефицитными состояниями разного происхождения. Традиционное лечение этой патологии малоэффективно ввиду устойчивости патогена к широкому спектру антибиотиков. Поэтому перспективным подходом для борьбы с синегнойной инфекцией может быть иммунопрофилактика. В России и за рубежом на протяжении многих лет разрабатываются вакцинные препараты на основе протективных антигенов P. aeruginosa, полученных в том числе генно-инженерными методами.

На основе результатов исследований иммунобиологических свойств ряда отдельных рекомбинантных белков P. aeruginosa, проведенных в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, получены варианты слитых рекомбинантных белков, среди которых наибольший интерес для последующего исследования представляет белок OprF-aTox-OprI.

Цель исследования – изучение протективной активности слитого рекомбинантного антигена.

При выполнении работы использовали полученный в лаборатории протективных антигенов слитый рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI, сорбированный на геле гидроокиси алюминия. Остаточное содержание белка в сорбированном препарате определяли в ИФА по методике, разработанной ранее в лаборатории протективных антигенов. Оценку защитного эффекта проводили на белых беспородных мышах при двукратной иммунизации с двухнедельным интервалом и последующем заражении живой вирулентной культурой P. aeruginosa. Уровень экспрессии генов определяли путем измерения количества комплементарной ДНК (кДНК) целевого гена с помощью ПЦР в «реальном времени». Для получения иммунных сывороток проводили подкожное введение антигена с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) с последующим внутривенным введением антигена через две недели. Полученные иммунные сыворотки использовали для исследования защитных свойств в отношении экзотоксина А P. aeruginosa на культуре клеток (линия Vero) и живой вирулентной культуры на животных (пассивная защита).

Определение протективных свойств рекомбинантных белков является основополагающим моментом при создании вакцин. На проявление которых влияют антигенные составляющие и используемый адъювант. Доступность распознаваемых структур клеткам иммунной системы обеспечивается подбором оптимального соотношения антигена и адъюванта, а также условий сорбции.

Условия сорбции изучали, изменяя следующие параметры: соотношение белок-адъювант и температуру сорбции. Были исследованы три соотношения белок-адъювант 1:1, 1:2 и 1:3 и два температурных режима (18±2 и 5±3 °С). Каждые три часа проводили отбор проб для определения содержания не связавшегося с сорбентом белка. По результатам исследования выявлена обратная зависимость содержания белка по отношению к адсорбенту. При соотношениях 1:2 и 1:3 регистрировали следовые количества антигена через три часа сорбции при обоих температурных режимах. При соотношении 1:1 белок сорбировался не полностью (20–25 % белка, в зависимости от температурного режима, находилось в несвязанном состоянии). На время сорбции также влияли температурные условия: при повышении температуры в соотношении 1:1 через шесть часов определяли следовые количества рекомбинантного белка, а при температуре 4 °С – около 20 %.

При исследовании влияния содержания адъюванта на протективную активность, основываясь на данных полученных в ходе разработки рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС), была проведена сорбция слитого рекомбинантного антигена в соотношении белок-адъювант 1:3. Для вакцины РВС данное соотношение обеспечивало максимальный защитный эффект. Однако, с гибридным белком OprF-aTox-OprI применение соотношения 1:3 при сорбции привело к снижению протективной активности вне зависимости от иммунизирующей дозы белка. В связи с этим проведена дальнейшая работа по подбору содержания адъюванта по отношению к белку.

Апробированы соотношения белок-адъювант 1:1 и 1:2 и иммунизирующие дозы белка 50, 75 и 100 мкг. Максимальный защитный эффект выявлен при соотношении белок-адъювант 1:1 и иммунизирующей дозе 50 мкг белка (индекс эффективности – ИЭ – 4,3). При соотношении белок-адъювант 1:2 наблюдали дозозависимый эффект (ИЭ 2,3 при иммунизирующей дозе 50 мкг белка увеличился до 3,5 при иммунизации 100 мкг белка).

Эффективность соотношения белок-адъювант 1:1 подтверждена исследованиями по оценке уровня экспрессии генов одного из ключевых факторов развития врожденного иммунного ответа – TLR4. У мышей, иммунизированных препаратом в данном соотношении, активация врожденного звена иммунного ответа и распознавание антигена происходило раньше, чем в контрольной группе и у мышей, иммунизированных препаратом с соотношением 1:2. При этом Общий уровень экспрессии целевого гена TLR4 свидетельствовал о более выраженном ответе на введение патогена (в 24 раза выше чем в контрольной группе на 2-е сутки после заражения).

Защитными свойствами обладали и сыворотки, полученные при иммунизации кроликов слитым рекомбинантным белком. Схема иммунизации была рассчитана на получение максимальных титров антител в краткие сроки. Оценку протективных свойств полученных сывороток проводили в двух тестах: нейтрализация токсина на культуре клеток и пассивной защиты. К суточному монослою культуры клеток линии Vero добавляли смесь разведенного в среде для культивирования токсина и иммунной сыворотки. Результаты оценивали визуально под микроскопом через 48 ч. Иммунные сыворотки обеспечивали защиту клеток от действия токсина. Через 48 ч наблюдали монослой живых прикрепленных клеток. Результат действия нативной сыворотки визуально не отличался от отрицательного контроля, при котором в поле зрения попадали единичные прикрепленные живые клетки.

Пассивную защиту оценивали путем введения цельной иммунной сыворотки и живой вирулентной культуры P. aeruginosa с интервалом в 2 ч. Учитывали павших животных в течение 7 дней. Результаты опыта отображали в виде $ЛД_{50}$ и ИЭ. Высокие индексы эффективности специфической (13,9) и нативной (9,8) сывороток показывают не только уровень защиты организма специфическими антителами, но и вклад неспецифических компонентов.

По результатам проведенной работы выявлено влияние условий сорбции на проявление специфической активности слитого рекомбинантного антигена. Определено соотношение белок-адъювант обеспечивающее максимальный защитный эффект, подтвержденный иммунологическими исследованиями. Выявленные проективные свойства специфических сывороток открывают перспективу их применения как средства пассивной защиты.

УДК 573.6.086.835

КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЛЕНОК БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Н.А. Кленова, З.П. Белоусова, А.С. Тряпочкина, А.С. Дуюнова

Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева

Особо перспективны композитные раневые покрытия, изготовленные из бактериальной целлюлозы, которые обладали бы антимикробными, противовоспалительными и заживляющими свойствами. Обеспечение регенеративных свойств может быть осуществлено за счет включения в состав пленки таурина, защищенного по аминогруппе, а также использование гиалуроновой кислоты, модулирующей процесс заживления раны, стимулирующей пролиферацию и миграцию клеток.

Целью исследования стало формирование композитов на основе 2-фталимидоэтансульфоната бактериальной целлюлозы (БЦ), геля гиалуроновой кислоты, химически модифицированной 1,4 – бутандиолдиглицидиловым эфиром с физической модификацией хлоргексидином для придания антибактериальных свойств.

Гели и гель-пленки бактериальной целлюлозы получены при культивировании Gluconacetobacter sucrofermentans H-110 (ВКПМ 11267) [1]. Химическая модификация хлорангидридом таурина бактериальной целлюлозы проводилась с растворенной в пиридине пленкой [2]. Выделение гиалуроновой кислоты (ГК) из петушиных гребней осуществляли по методике Самойленко И.И. и Епифанова А.Е. (1998 г.) [3]. Модификацию полученного геля гиалуроновой кислоты проводили по методике Balazs et al. (1984 г.) [4]. В качестве молекул сшивок был использован 1,4 – бутандиолдиглицидиловый эфир (1,4 – БДДЭ). Гели и гель-пленки нативной и модифицированной БЦ, гели ГК (с модификацией и без) физически модифицировали, выдерживали в 0,05 %-ном растворе хлоргексидина для придания антибиотических свойств в течение 2-х суток. Для сравнения в качестве основы композитов использовали также 1,5 %-ный гель агарозы.

В качестве тестовой культуры для изучение антибактериального действия хлоргексидина, адсорбированного на композитах на основе гиалуроновой кислоты, БЦ и агарозы, использовали суточные инокуляты Escherichia coli штамм М-17/pColap и Staphylococcus aureus штамм 6538-р с посевом на чашки Петри с МПА и стандартными условиями выращивания.

Для изучения образцов гелей гиалуроновой кислоты, полученных из петушиных гребней, были сняты ИК-спектры. В качестве сравнения использовали ИК-спектры низкомолекулярной и высокомолекулярной гиалуроновых кислот фирмы Wuhan Demeikai Biotechnology Co., Ltd. Общие пики в диапазоне 3550–3200 $см^{-1}$, 2975–2860 $см^{-1}$, 1650–1550 $см^{-1}$, 1470–1430 $см^{-1}$, 1250–1200 $см^{-1}$, 1150–1075 $см^{-1}$ являются составляющими элементами остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, представляющих дисахаридное звено гиалуроновой кислоты. Однако ИК-спектр гиалуроновой кислоты, выделенной нами из куриных гребней имел пики, не совпадающие с таковыми у высокомолекулярной и низкомолекулярной гиалуроновой кислоты фирмы Wuhan Demeikai Biotechnology Co., Ltd., что указывало на наличие примесей в полученном геле. Проведение карбозольной реакции на содержание гиалуроновой кислоты в выделенном из петушиных гребней геле составило 0,35 мкг/мл, что меньше на 77 % и 82 %, чем у фирменных препаратов низкомолекулярной и высокомолекулярной гиалуроновых кислот соответственно. Большую часть примесей составляли белки (0,8 %), а также обнаруживались гексозы (0,16 %).

Композиты сформированные на основе геля бактериальной целлюлозы, гиалуроновой кислоты, модифицированной 1,4 – бутандиолдиглицидиловым эфиром и 2-фталимидоэтансульфоната бактериальной целлюлозы после выдерживания в растворе хлоргексидина в течение 2-х суток обладали антибактериальными свойствами, наиболее выраженными для Staphylococcus aureus (зоны отсутствия роста 21,22±1,06 мм), для Escherichia coli – 15,44±0,34 мм. Замена геля бактериальной целлюлозы на гель агарозы снижал антибактериальный эффект и делал его одинаковым как для Staphylococcus aureus (11,67 ±0,88 мм), та и для Escherichia coli (12,33±0,29 мм). Таким образом, использование геля БЦ оказывается более эффективным, чем геля агарозы.

УДК 57.083.18

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННОЙ ПНЕВМОНИИ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

Е.С. Клочихина, С.А. Лапа, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Инфекционная пневмония – острый воспалительный процесс легочной ткани, вызываемый широким рядом возбудителей бактериальной, вирусной и грибковой природы. Вспышки инфекционных пневмоний, вызванных коронавирусами SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, вирусами гриппа А и В, а также бактериальных пневмоний становятся реальной социальной угрозой. Важной проблемой является установление этиологии заболевания и быстрая идентификации возбудителя, поскольку часто вирусные и бактериальные пневмонии характеризуются сходной клинической картиной [1].

Нами разработана мультиплексная ПЦР для видового определения пяти основных возбудителей бактериальной пневмонии человека [2], а именно Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenza, Legionella pneumophila, Klebsiella pneumonia. Для перечисленных видов были выбраны генетические мишени и сконструированы праймеры, для каждого из которых была проведена процедура BLAST-анализа, определены физико-химические характеристики, включая тестирование на наличие как внутри – так и межмолекулярных вторичных структур. Праймеры, использованные в ПЦР, были подобраны таким образом, чтобы они амплифицировали фрагменты ДНК различной длины из разных матриц, но работали в одинаковых условиях амплификации. Использованы следующие генетические мишени: ген ebpS (S. aureus), длина ПЦР-продукта – 283 п.о.; ген sidA (L.pneumophila), длина ПЦР-продукта – 369 п.о.; ген fucK (H. influenza), длина ПЦР-продукта – 193 п.о.; ген oprL (P. aeruginosa), длина ПЦР-продукта – 321 п.о., и ген rmpA (K. pneumonia), длина ПЦР-продукта – 177 п.о.

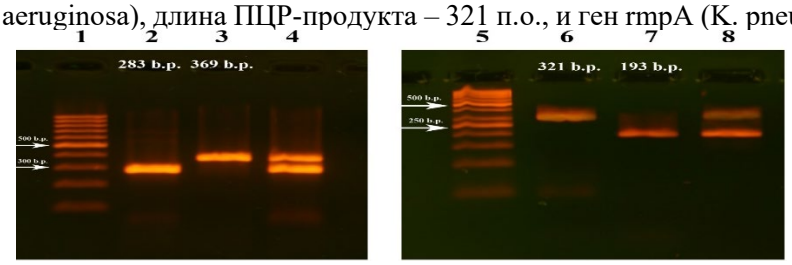


Рис. 1. Определение ДНК возбудителя электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов. 1 – маркер длин ДНК GeneRuler 100bp (Thermo Scientific, США), 2 – S. aureus, 3 – L. pneunophila, 4 – S. aureus + L. pneunophila, 5 – маркер длин ДНК GeneRuler 50bp (Thermo Scientific, США), 6 – P. aeruginosa, 7 – H. influenza, 8 – P. aeruginosa + H. influenza. 4 % агарозный гель, окрашивание бромистым этидием.

Проводили оптимизацию температурно-временного профиля ПЦР с применением градиентной ПЦР, а также состава компонентов буфера и концентрации каждого из праймеров в смеси; как в режиме применения индивидуальных ДНК-матриц, так и в режиме смесей ДНК нескольких возбудителей в одной пробирке. Установили, что праймеры обладают высокой специфичностью в смеси, содержащей ДНК различных микроорганизмов, и способны выявлять исключительно свои специфичные мишени, не давая ложноположительный результат при наличии в смеси неспецифичной ДНК. Результат дифференциального обнаружения ДНК возбудителя в образце методом мультиплексной ПЦР показан на рисунке 1. Разработанная система может быть расширена для выявления возбудителей пневмонии вирусной и грибковой природы. В настоящее время планируется проведение испытаний на клинических образцах, применение меченых производных dNTP для последующего анализа на биочипах, а также разработка математического алгоритма расчетов сигналов амплификации.

Система подходит для диагностических лабораторий, специализирующихся на клинических анализах с использованием ПЦР, и ориентирована на применение в клинической диагностике для определения этиологии заболевания благодаря возможности дифференцировать бактериальную пневмонию от вирусной и грибковой пневмоний.

Исследование поддержано грантом РНФ № 20–14–00287.

ЛИТЕРАТУРА

1. Steele RW, Thomas MP, Kolls JK. Current management of community-acquired pneumonia in children: an algorithmic guideline recommendation. Infect Med 1999; 16:46–54.
2. Han Y.C., Woo J.H. Diagnosis and treatment of bacterial pneumonia in Korea. Respirology. 1996. V. 1, P. 115–122.

УДК 57.083.3

НАНОЗИМЫ НА ОСНОВЕ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ И ИММУНОАНАЛИЗ

М.Д. Кропанева[1], П.В. Храмцов[1,2], М.Б. Раев[1,2]

[1] Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия
[2] Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день ключевым методом лабораторной диагностики является иммуноферментный анализ (ИФА). В качестве детектирующих реагентов в ИФА применяются конъюгаты ферментов с распознающими молекулами. Чаще всего роль цветной метки в таких конъюгатах играет фермент пероксидаза хрена, что сопряжено с рядом проблем: высокая стоимость, трудоемкость технологии выделения и низкий выход, чувствительность фермента к физико-химическим факторам среды, снижение ферментативной активности в присутствии некоторых консервантов [1, 2]. Решением описанных трудностей может стать использование нанозимов, а именно нанозимов берлинской лазури, в качестве альтернативы пероксидазе хрена. Данные нанозимы способны превращать в окрашенный продукт те же хромогенные субстраты, но обладают большей устойчивостью, а метод их получения является менее трудоемким и более дешевым [3, 4, 5, 6, 7, 8]. Таким образом на основе нанозимов берлинской лазури могут быть разработаны диагностические реагенты для различных форматов иммуноанализа (ИФА-подобного, дот-иммуноанализа, имуунохроматографии).

Традиционным методом синтеза нанозимов берлинской лазури считается смешивание солей железа с разной валентностью. Недостатком данного подхода является низкая каталитическая активность получаемых нанозимов по сравнению с пероксидазой хрена [9]. Российскими учеными был предложен метод синтеза на основе восстановления перекисью водорода смеси солей трехвалентного железа: $FeCl_3$ и K_3 FeC_6 N_6 [10]. Нанозимы берлинской лазури, синтезированные согласно описанному методу, обладают более высокой каталитической активностью в сравнении с пероксидазой хрена и нанозимами, получаемыми по традиционной методике [10]. Описанная технология является многообещающей и может быть успешно использована при создании диагностических реагентов для иммуноанализа в различных форматах, однако технологические аспекты синтеза нанозимов берлинской лазури новым методом малоизучены.

Цель работы – изучение параметров, влияющих на ход синтеза высокоактивных нанозимов берлинской лазури, а также разработка методик, позволяющих получать стабильные нанозимы различного размера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нанозимы берлинской лазури получали с помощью копреципитационного синтеза. В воду последовательно добавляли 0.1 М раствор $FeCl_3$ и 0.1М раствор K_3 FeC_6 N_6 до их конечной концентрации 3.125 мМ при интенсивном перемешивании. Образование берлинской лазури инициировали путем добавления H_2 0_2 до конечной концентрации 22 мМ. Контроль температуры производился при помощи термодатчика. Длительность реакции составляла от 60 до 150 минут в зависимости от целей эксперимента. По окончании синтеза нанозимы осаждали и отмывали водой при помощи центрифугирования, 15000–20000g. Затем нанозимы ресуспендировали в воде при помощи ультразвуковой обработки. Оставшиеся в образцах агрегаты удаляли центрифугированием на малой скорости, до 1600g.

В процессе синтеза оценивали следующие параметры: изменение pH среды, оптическую плотность растворов, размеры и дзета-потенциал формирующихся нанозимов.

Функциональную активность конъюгатов нанозимов берлинской лазури со стрептавидином оценивали с помощью твердофазного дот-иммуноанализа. В качестве твердой фазы была использована нитроцеллюлозная мембрана с диаметром пор 0,45 мкм. На смоченную мембрану наносили точками по 2 мкл растворы, содержащие биотинилированный БСА (Bi-БСА) и БСА (отрицательный контроль), с концентрацией 100 мкг/мл и менее.

После высушивания и промывки проводили процедуру блокирования неспецифических сайтов связывания фосфатным буфером с твином-20, БСА и казеином. Затем тест-полоски промывали и помещали в растворы детектирующих реагентов на основе конъюгатов нанозимов берлинской лазури со стрептавидином в блокирующем буфере. После этапа промывки вносили субстрат – раствор диаминобензидина в Трис-HCl буфере. Результат оценивали визуально.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучено влияние температуры на ход синтеза. Показано, что проведение синтеза при +30 °С приводит к формированию нанозимов со средним диаметром 100 нм, в то время как проведение реакции при +60 °С – нанозимов в районе 150 нм (рис. 1).

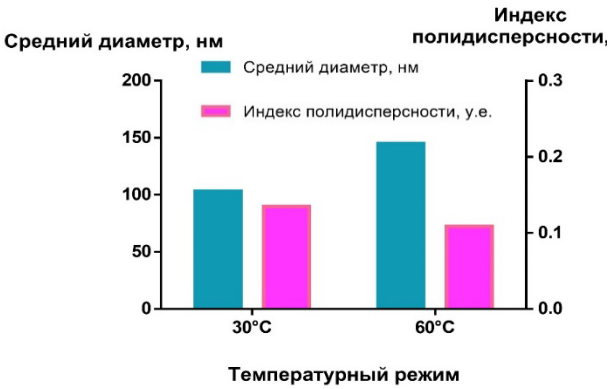


Рисунок 1. Результат оценки влияния температурного режима на размеры получаемых нанозимов берлинской лазури

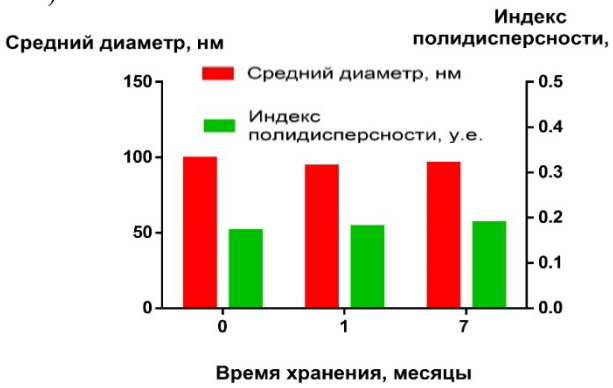
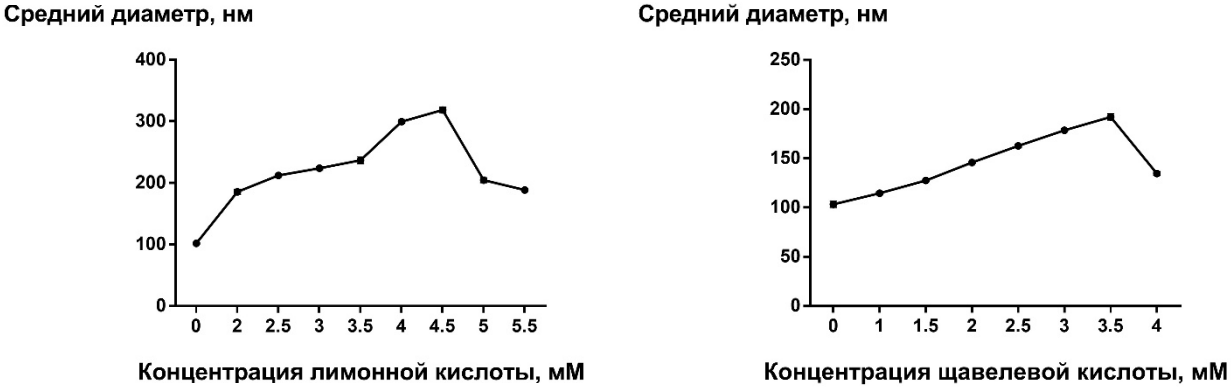


Рисунок 3. Коллоидная стабильность нанозимов берлинской лазури при хранении



А Б

Рисунок 2. Результат оценки влияния концентрации А) лимонной и Б) щавелевой кислот на размер получаемых нанозимов берлинской лазури

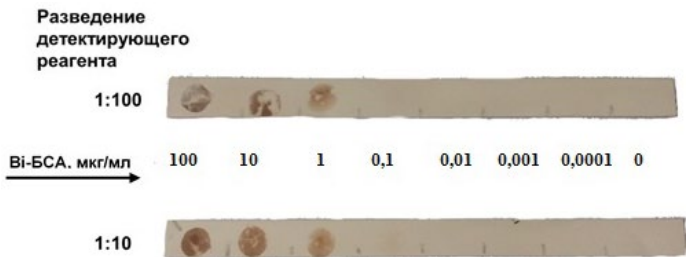


Рисунок 4. Результат иммуноанализа с применением детектирующих реагентов на основе нанозимов берлинской лазури

Изучено влияние концентрации лимонной и щавелевой кислот на ход синтеза. Изменение концентрации данных кислот позволяет управлять размерами формирующихся нанозимов (рис. 2). Разработка методик, позволяющих получать нанозимы с регулируемыми размерами, играет большую при создании диагностических тест-систем.

Размер нанозимов влияет на уровень сорбции распознающих элементов (за счет изменения площади удельной поверхности), а также на их пероксидазоподобную активность [2, 11]. Следовательно, управление размерами получаемых нанозимов позволяет регулировать работу конъюгатов на их основе в качестве диагностических реагентов в иммуноанализе.

Проведена оценка коллоидной стабильность полученных нанозимов при хранении в условиях комнатной температуры в течении 7 месяцев (рис. 3). Сведения о стабильности суспензий нанозимов, сроках и условиях хранения являются важными, так как эти параметры в конечном итоге определяют успех их применения.

Проведена оценка работы конъюгатов нанозимов берлинской лазури со стрептавидином в качестве детектирующих реагентов для твердофазного иммуноанализа (рис. 4).

Таким образом, разработаны методы синтеза высокоактивных нанозимов берлинской лазури, позволяющие получать стабильные суспензии с регулируемыми размерами. Также показана применимость конъюгатов нанозимов берлинской лазури в иммуноанализе.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20–75–00029)

ЛИТЕРАТУРА

1. Attar F. et al. Nanozymes with intrinsic peroxidase-like activities // Journal of Molecular Liquids. 2018. V. 278. P.130–144.
2. Huang Y., Ren J., Qu X. Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications // Chemical Reviews. 2019. V. 119. № 6, P. 4357–4412.
3. Wang W., Gunasekaran S. Nanozymes-based biosensors for food quality and safety // TrAC. 2020, V. 126. № 115841.
4. Vokhmyanina D.V. et al. ‘Artificial peroxidase’ nanozyme – enzyme based lactate biosensor // Talanta. 2020. V. 208. № 120393.
5. Yang Z. et al. Smart CuS Nanoparticles as Peroxidase Mimetics for the Design of Novel Label-Free Chemiluminescent Immunoassay. // ACS Applied Materials and Interfaces. 2016. V.8. № 19. P. 12031–12038.
6. Wan Y. et al. Manganese oxide nanowire-mediated enzyme-linked immunosorbent assay. // Biosensors and Bioelectronics. 2012. V. 33. № 1., P. 69–74.
7. Fan K. et al. In vivo guiding nitrogen-doped carbon nanozyme for tumor catalytic therapy. // Nature Communications. 2018. V. 9 (1). № 1440.
8. Zhang. T. et al. Enhanced peroxidase activity and tumour tissue visualization by cobalt-doped magnetoferritin nanoparticles // Nanotechnology. 2017. V. 28 (4), № 045704.
9. Liu. X. et al. Peroxidase-Like Activity of Smart Nanomaterials and Their Advanced Application in Colorimetric Glucose Biosensors. // Small. 2019. V.5 (17). № 1900133.
10. Komkova. M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase // Journal of the American Chemical Society. 2018. V. 140. № 36. P. 11302–11307.
11. Sapsford K.E. et al. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology // Chemical Reviews. 2013. V. 113. № 3, P. 1904–2074.

УДК 615.46

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИУРЕТАНА ХИТОЗАНОМ / ГЕПАРИНОМ И ИЗУЧЕНИЕ ТРОМБОРЕЗИСТЕНТНОСТИ НОВОГО МАТЕРИАЛА

Н.Н. Дрозд[1], А.П. Луньков[2], Ю.В. Жуйкова[2], Б.Ц. Шагдарова[2], А.В. Ильина[2], В.П. Варламов[2]

[1] НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва, Россия
[2] Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Синтетические полимерные материалы широко используются в медицинской практике. Они обладают хорошими механическими свойствами, применяются для создания имплантов, катетеров, различных медицинских устройств. Для материалов, находящихся в контакте с живым организмом предъявляются особые требования к биоинертности и биосовместимости. Так, контактирование чужеродного материала с кровью вызывает быструю ответную реакцию в виде адсорбции белков крови, тромбообразования. Все медицинские материалы, применяемые на практике, со временем, активируют клеточный гемостаз, воспаление и тромбообразование. Таким образом, улучшение гемосовместимости материалов, находящихся в контакте с кровью живых организмов, является актуальной задачей [1]. Хитозан представляет собой аминополисахарид с уникальными биологическими свойствами, главным из которых является биосовместимость. Полисахарид используется для модификации поверхности различных материалов с целью улучшения биосовместимости. Кроме того, положительный заряд макромолекул обеспечивает возможность взаимодействия с гепарином, что позволяет создавать атромбогенные покрытия на основе послойного нанесения хитозана / гепарина. Поверхность плёнок из полиуретана (ПУ) была модифицирована природным поликатионом хитозаном. В результате активации плёнок с помощью гексаметилендиизоцианата (ГМДА) с последующим взаимодействием с хитозаном была получена положительно заряженная поверхность, ковалентно связанная с биополимером. Затем в результате ионного связывания было проведено послойное нанесение 9 бислоёв гепарина / хитозана, с верхним гепариновым слоем. Поверхность модифицированного материала была изучена методом атомно-силовой микроскопии. Наблюдали наличие на модифицированной поверхности ПУ характерных глобулярных полимерных структур, а также изменение поверхностных параметров (среднеквадратичной шероховатости, перепада высот). Также было показано повышение гидрофильности модифицированной поверхности ПУ в сравнении с контролем по результатам измерения контактного угла. Рассмотрено влияние модифицированной поверхности на характеристики крови человека и проведена оценка тромборезистентности (ТРЗ) пластин при инкубации в крови. Также было изучено влияние ПУ пластин на гемолиз эритроцитов [2]. Устойчивость пластин ПУ к появлению сгустков крови человека на поверхностях (ТРЗ) при инкубации 20, 40, 120, 240 мин в опытах in vitro достигала 83,94±8,12 % – 86,22±5,29 %. Степень гемолиза эритроцитов человека in vitro была незначительна и не превышала 0,01 %.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 18–015–00402 А)

ЛИТЕРАТУРА:

1. Jaffer I.H., Weitz J.I. The blood compatibility challenge. Part 1: Blood-contacting medical devices: The scope of the problem // Acta Biomaterialia. 2019. Т. 94. С. 2–10. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.06.021
2. Drozd N.N., Shagdarova B.T., Zhuikova Y.V., Il'ina A.V., Vasiliev M.N., Vasilieva T.M., Hein A.M., Varlamov V.P. Thromboresistant silicon plates modified with chitosan and heparin by the layer-by-layer assembly method // Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. 2019. Т. 24. С. 5–22. DOI: 10.15259/PCACD.24.001

УДК 579.8.043

РОЛЬ МУЛЬТИВИДОВЫХ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК В БИОКОРРОЗИИ ПОЛИЭТИЛЕНОВ

М.В. Журина, С.В. Мартьянов, А.В. Ганнесен, В.К. Плакунов

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Среди синтетических пластмасс, находящих широкое и разнообразное применение в медицинских конструкциях, одно из первых мест занимают полиэтилены (ПЭ), входящие в класс полиолефинов. Поэтому их чувствительность к воздействию микроорганизмов и борьба с вызываемыми микроорганизмами повреждениями является актуальной проблемой, требующей детального изучения. Существуют три основных типа полиэтиленов: 1) ПЭ высокого давления (ПЭВД), называемый также ПЭ низкой плотности (ПЭНП), имеет относительно низкую степень кристалличности (50–70 %), т. е. более доступен для биокорозии; ПЭ низкого давления (ПЭНД), называемый также ПЭ высокой плотности (ПЭВП), имеет высокую степень кристалличности (75–85 %) и менее доступен для биокоррозии; и, наконец. т.н. линейный полиэтилен (ЛПЭ) – вариант ПЭВД, у которого снижено количество разветвлений полимерной цепи, в результате чего он характеризуется повышенной эластичностью и применяется для изготовления пленок. Чувствительность его к биокоррозии примерно соответствует чувствительности стандартного ПЭВД.

Целью нашей работы были создание экспресс-метода определения биокоррозии ПЭ, выявление с его помощью наиболее активных микроорганизмов-деструкторов и сравнение процессов биодеструкции, осуществляемых моновидовыми и мультивидовыми микробными биопленками. В этих экспериментах использовали образцы нестабилизированной пленки ПЭВД толщиной 150 мкм (ГОСТ 10354–82). Происхождение микроорганизмов и условия культивирования описаны в недавно опубликованной нами работе (Журина и соавт., 2020).

Обычно процесс биокоррозии пластмасс измеряют путем длительной (от 30 сут. до нескольких месяцев) инкубации образцов пластмасс в природных субстратах (почве или водоемах) (Sangale et al., 2012; Esmaeili et al., 2013) с последующим измерением степени деструкции весовыми или инструментальными методами (путем определения смачиваемости поверхности пластмассы, измерения ее молекулярной массы с помощью гель-хроматографии, обнаружения реакционноспособных групп методами инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием, а также методом ядерного магнитного резонанса и т. д.) (Vimala, Mathew, 2016). Для исследования изменений поверхности пластмассы используются также микроскопические методы, в частности, методы электронной сканирующей микроскопии и атомной силовой микроскопии (Турова и соавт., 2020; Chauhan et al., 2018).

Для ускорения подбора микроорганизмов – активных деструкторов ПЭ нами разработан экспресс-метод, который позволяет получить результаты через 5–7 дней вместо многих недель или месяцев. Метод основан на массированном засеве индивидуальных микроорганизмов или их смесей на твердую питательную среду LB, в которую помещали испытуемые образцы ПЭ. Подробно этот метод описан в недавно опубликованной нами работе (Журина и соавт., 2020).

Через указанный период времени образцы извлекали, удаляли с их поверхности биопленку и измеряли светорассеяние при боковом освещении. С этой целью сконструирована установка, включающая фотодиодный источник света и цифровой микроскоп.

Светорассеяние полученных изображений контрольных и опытных образцов ПЭ измеряли с помощью денситометрической программы (Sorbfil TLC View) для денситометра Сорбфил (ТУ 4436–003–16943778–99, ЗАО НПО “Техноком”, Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета OriginLab 8.6. Поскольку тест на нормальность закона варьирования данных в наших экспериментах дал отрицательный результат, для оценки достоверности различий применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни–Уилкоксона при $p < 0.05$.

В качестве альтернативного метода степень повреждения поверхности полиэтилена определяли стандартным методом с использованием профилометра TR110new (“Time Group Inc.”, Китай). В целом результаты, полученные этими методами, совпали, хотя предлагаемый нами оптический метод более

удобен в применении. Он позволяет не только измерять степень повреждения поверхности ПЭ при кратковременном воздействии микроорганизмов, но может быть использован для ускорения поиска биоцидов, защищающих ПЭ от биокоррозии.

В результате предварительно проведенных исследований описанных в литературе активных деструкторов ПЭ (испытано более 30 моновидовых биопленок грамположительных, грамотрицательных бактерий, и аскомицетов), а также ряда их мультивидовых биопленок, наиболее эффективным сообществом оказалось сочетание грамположительных бактерий Micrococcus thailandicus HB, Kocuria rhizophila 4A-2G с аскомицетом Yarrowia lipolytica 367–3.

В экспериментах использовали два вида сред: неразбавленная среда LB и эта же среда, разбавленная дистиллированной водой в 10 раз с целью уменьшения возможного репрессирующего действия питательных субстратов, входящих в среду LB, на биосинтез ферментов, участвующих в биодеградации ПЭ. Однако, оказалось, что разбавление среды уменьшает эффект деструкции поверхности ПЭ. Это косвенно указывает на конститутивную природу деградирующих ПЭ ферментов. По современным представлениям, основную роль в деградации ПЭ играют ферменты, участвующие в метаболизме длинноцепочечных парафинов: алкангидроксилазные многокомпонентные системы, включающие монооксигеназы, специфичные для алканов с разной длиной углеродной цепи. Эти ферменты могут содержать в активном центре цитохромы P450 (CYP52, CYP153, CYP116B5) или флавины, как например, AlmA (у термофильных бактерий, LadA), атомы меди (pBMO), а также атомы меди в сочетании с флавинами (диоксигеназы) или негемовое железо (AlkB) и другие кофакторы (Турова и соавт., 2016; Moreno, Rojo, 2019). Все использованные нами в данных экспериментах микроорганизмы способны утилизировать парафины и, следовательно, должны синтезировать указанные ферменты.

Таким образом, доказана высокая эффективность использования разработанного нами экспресс-метода измерения деструкции ПЭ и выявлены сообщества микроорганизмов, эффективные в процессах биокоррозии ПЭ.

Работа выполнена за счет средств проекта РФФИ мк-18–29–05048 и частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

Журина М.В., Ганнесен А.В., Мартьянов С.В., Плакунов В.К. Экспресс-метод определения взаимосвязи биокоррозии полиэтилена биопленками Chromobacterium violaceum с их способностью формировать внеклеточный полимерный матрикс // Микробиология. 2020. Т. 89. № 1. С. 52–58.

Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Шумкова Е.С., Коршунова А.В., Бабич Т.Л., Полтараус А.Б, Назина Т.Н. Детекция генов деградации н-алканов alkB и ladA у термофильных углеводородокисляющих бактерий родов Aeribacillus и Geobacillus // Микробиология. 2016. Т. 85. № 6. С. 676–692.

Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Назина Т.Н., Груздев Д.С., Лаптев А.Б. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ с поверхности полиэтилентерефталатных материалов при экспозиции в водных средах // Микробиология. 2020. Т. 89. № 1. С. 99–110.

Chauhan D., Agrawal G., Deshmukh S., Royb S.S., Priyadarshini R. Biofilm formation by Exiguobacterium sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation // RSC Adv. 2018, 8, 37590. doi: 10.1039/c8ra06448b.

Esmaeili A, Pourbabaee AA, Alikhani HA, Shabani F, Esmaeili E. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of Lysinibacillus xylanilyticus and Aspergillus niger in soil // PLoS One. 2013 Sep. 23; 8(9):e71720. doi: 10.1371/journal.pone.0071720.

Moreno R., Rojo F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes in bacteria / In: F. Rojo (ed.). Aerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids, Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. 2019. Springer Nature Switzerland AG. P. 118–142.

Sangale M.K., Shahnawaz M., Ade A.B. A review on biodegradation of polythene: the microbial approach // J. Bioremed. Biodeg. 2012, 3:10. doi: 10.4172/2155–6199.1000164.

Vimala P.P., Mathew L. Biodegradation of polyethylene using Bacillus subtilis / Procedia Technology. 2016. V. 24. P. 232–239. doi: 10.1016/j.protcy.2016.05.031.

УДК 615.32

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЛИПИД-ТРАНСПОРТИРУЮЩИЕ БЕЛКИ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПЕРЕНОСЧИКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Д.Н. Мельникова, Т.В. Овчинникова

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Многие активные вещества, используемые в фармацевтике и косметологии, нуждаются в защитном экранировании от внешней среды. Это может быть достигнуто с помощью систем-носителей, которые включают лиганд-связывающие белки, липосомную или эмульсионную технологию, наночастицы и полимеры. Растущий интерес к области лиганд-связывающих белков обусловлен их доступностью к конструированию с помощью современных генетических методов. Таким образом, эти носители могут быть легко модифицированы, чтобы стать системами, специфически связывающими лиганды с различным терапевтическим действием.

В работе в качестве модельного белка был использован липид-транспортирующий белок чечевицы Lens culinaris (Lc-LTP2). В структуре Lc-LTP2 имеется гидрофобная полость, сформированная четырьмя a-спиралями. Lc-LTP2 содержит 8 цистеинов, которые участвуют в образовании дисульфидных мостиков, обеспечивающих стабилизацию структуры.

В качестве природных и имеющих косметическое и / или фармацевтическое применение лигандов для исследования были выбраны α-липоевая кислота, которая широко используется в качестве рацемического лекарственного средства от боли и парестезии, связанных с диабетической полинейропатией, N-пальмитоилсфингомиелин и N-(гексадеканоил)-β-D-галактозилсфингозин, а также сфингозин-1-фосфат, являющийся активным фармацевтическим ингредиентом для гиперпролиферативных заболеваний кожи, L-трео-сфингозин, имеющий потенциальные варианты лечения агрессивных лимфом, кроме это дексаметазон, который широко используется в качестве противовоспалительного лекарственного средства.

На основе метода флуоресцентной спектроскопии было показано влияние присутствия в растворе лигандов на связывание Lc-LTP2 с флуоресцентным зондом – 2-n-толуидинилнафталин-6-сульфоновой кислотой. Способность Lc-LTP2 связывать данные лиганды исследовали в условиях, приближенных к физиологическим (pH 7,4), а также в условиях, имитирующих желудочный сок (pH 2,5). Зависимость связывания от температуры осуществлялась при следующих значениях: 20 °C, 40 °C, 60 °C, 90 °C и 20 °C после охлаждения. Было показано, что константы связывания Lc-LTP2 с α-липоевой кислотой, сфингозин-1-фосфатом и треосфингозином равны 3,6 μM, 2,9 μM и 2,8 μM, соответственно. Однако дексаметазон, N-(гексадеканоил)-β-D-галактозилсфингозин и N-пальмитоилсфингомиелин не образуют комплексов с Lc-LTP2. Значительной разницы в значениях констант связывания при различных pH не было обнаружено. В случаях α-липоевой кислоты, L-трео-сфингозина и сфингозин-1-фосфата при температурах от 40 °C до 90 °C данные показывают «синий сдвиг» спектров флуоресценции и резкое падение интенсивности сигнала. Интересно отметить, что способность Lc-LTP2 связывать эти лиганды была почти полностью восстановлена после охлаждения образца до 20 °C.

Данное исследование является предпосылкой для дальнейшей работы, направленной на разработку систем для LTP-опосредованного транспорта и контролируемого высвобождения низкомолекулярных лекарств.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 197400150).

УДК 640

ПРИМЕНЕНИЕ БИОФАРАМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДЕСЕНСИБИЛИЗАЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.В. Печерский[1], В.И. Печерский, В.Н. Вильянинов[2], О.В. Печерская, В.Ф. Семиглазов[3]

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

[2] Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия

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

Антигены групп крови и тканеспецифичные антигены, а также пептидные копии тканеспецифичных антигенов, связанные с димерами MHC I класса, образуют уникальный антигенный код каждого индивида, на основании которого иммунная система отличает свои антигены от чужих. Ввиду общности филогенетического развития микроорганизмы экспрессируют антигены, сходные с антигенами групп крови (АВ0 и других) и с тканеспецифичными аутоантигенами. Иммунный ответ на перекрёстные микробные антигены с поражением собственных тканей организма является одной из причин развития аутоиммунных заболеваний. Интерстициальный цистит имеет аутоиммунную природу, представляя собой гиперчувствительность IV типа, подобно болезни Крона. Клиническая картина (болевой синдром, фиброзирование стенки мочевого пузыря, изъязвление слизистой мочевого пузыря) и гистологические изменения стенки мочевого пузыря (макрофагальнолимфоцитарная инфильтрация с увеличением численности тучных клеток) при интерстициальном цистите аналогичны клинической картине и морфологическим изменениям стенки кишки при болезни Крона. Синдром хронической тазовой боли, как и миофасциальный болевой синдром, обусловлены реакциями врождённого и приобретённого иммунитета, направленными против собственных тканей. Данные реакции развиваются в ответ на перекрёстные антигены микрофлоры, вызвавшей воспалительные заболевания органов малого таза и других локализаций. Патологические реакции врождённого и приобретённого иммунитета приводят к агрегации эритроцитов с последующим микротромбозом мелких сосудов и фиброзированием тканей. Болевой синдром при интерстициальном цистите, синдроме хронической тазовой боли и миофасциальном болевом синдроме обусловлены ишемией тканей и повышением мышечного тонуса. Патологические реакции приобретённого иммунитета у пациентов с хронической тазовой болью, как частного проявления миофасциального болевого синдрома, и с интерстициальным циститом, направленные против собственных тканей, сохраняются после элиминации возбудителя из-за формирования клеток иммунологической памяти. Проведение десенсибилизации при данных заболеваниях является патогенетической терапией. Т-хелперы (Th) могут переключать клеточный иммунный ответ на гуморальный и наоборот – переключать гуморальный иммунный ответ на клеточный. Участие Т-хелперов (Th) в регенерации может быть использовано для десенсибилизации – для переключения активизации ими цитотоксических Т-клеток и В-клеток на образование ими тканеспецифичных рецепторов у стволовых клеток, участвующих в регенерации тканей, к антигенам которых сформировалась гиперчувствительность иммунной системы.

ЛИТЕРАТУРА.

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

УДК 66.047

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОМ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

А.Ю. Хрущев, Э.Р. Акмаев, С.В. Колячкина, Т.Н. Лихих

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В связи с появлением на рынке большого количества фальсифицированных лекарственных средств все большую популярность набирают экспресс-методы контроля подлинности (аутентификации). Широко используются в практике методы, основанные на ИК-спектроскопии в ближнем и среднем диапазоне. Преимуществами такого подхода являются: высокая скорость анализа, минимальная пробоподготовка; а также отсутствие потребности в реактивах, расходных материалах и стандартных образцах, что делает эту группу методов одной из наиболее перспективных в области мониторинга качества лекарственных средств [1, 2].

КР-спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния света, Раман-спектроскопия), наряду с ИК-спектроскопией, относится к методам колебательной спектроскопии. Данный метод обладает рядом преимуществ: возможность проведения анализа водных растворов, низкая температурная зависимость аналитического сигнала, низкая интенсивность полос обертонов и комбинационных частот [3]. Однако в случае количественного определения действующих веществ лекарственных препаратов методом КР-спектроскопии возникает ряд сложностей, связанных со значительными вариациями содержания вспомогательных компонентов, что, в ряде случаев, может привести к искажению результатов анализа. Для решения данной проблемы широко используются методы многофакторного анализа [4, 5], а также метод внутреннего стандарта [6].

Метод полуколичественного анализа, построенный с использованием хемометрической обработки данных, обладает большей устойчивостью к вариабельности компонентного состава по сравнению с методом количественного определения. Данный подход позволяет определить не только подлинность препарата, но также качественно определить диапазон концентрации действующего вещества. Таким образом, целью данной работы является оценка возможности создания полуколичественного метода анализа жидких лекарственных форм, на примере препарата, содержащего тилозин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран лекарственный препарат, содержащий в своем составе тилозин в концентрации 45–55 мг/мл, а также вспомогательные вещества: 1,2 – пропандиол, бензиловый спирт, вода для инъекций. Тилозин – антибиотик группы макролидов, действующий на грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии, в том числе: стрептококки, стафилококки, лептоспиры, коринебактерии, клостридии, эризепилотриксы, пастереллы, хламидии, спирохеты и микоплазмы. В сельском хозяйстве тилозин находит применение в качестве стимулятора роста как кормовой антибиотик, а также часто назначается при лечении мелких домашних животных при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, дыхательной и мочеполовой систем. По степени воздействия на организм относится к малоопасным веществам.

Измерения проводили на Раман микроскопе inVia Renishaw (Великобритания) с лазером 785 нм на 50 % мощности, через 5х объектив с числовой апертурой 0,2 и ПЗС-детектор охлажденным до -70 °С. Образцы препарата помещали в прозрачную стеклянную виалу объемом 2 мл и толщиной стенок 1 мм. Для анализа была выбрана наиболее информативная область спектра 750–1800 $см^{-1}$. Измерение образца проводили в каждой виале по 10 раз, поворачивая ее вокруг своей оси перед снятием каждого спектра. Для увеличения соотношения сигнал/шум для каждого измерения проводили по 10 сканирований с последующим усреднением спектральных данных. Первичная обработка данных заключалась в сглаживании спектра с помощью фильтра Норриса, вычислении первой производной из спектра, коррекции базовой линии и длины оптического пути по методу MSC.

Для построения калибровочной модели были зарегистрированы спектры 7 серий лекарственного препарата, качество которых было предварительно проверено по нормативной документации с использованием метода ВЭЖХ. Были приготовлены и проанализированы образцы препарата в которых содержание тилозина было занижено относительно предельно допустимых значений на 5, 15, 25 мг/мл путем разбавления препарата деионизированной водой, а также завышено на 5, 15, 25 мг/мл путем добавления к препарату навесок стандартного образца тилозина. Таким образом, были получены 3 класса образцов, содержащих репрезентативные наборы данных: препараты с нормативным содержанием тилозина (70 спектров), с завышенным содержанием тилозина (30 спектров) и с заниженным содержанием тилозина (30 спектров) – Рисунок 1. На основе этих данных в программе TQAnalyst 9 была построена калибровочная модель с использованием дискриминантного анализа. На следующем этапе была проведена валидация модели. Для каждого класса был собран проверочный набор образцов, не участвовавших в построении модели. На проверочном наборе была проверена чувствительность модели, то есть ее способность правильно распознавать новые аутентичные образцы. Кроме того, была оценена специфичность модели, как возможность распознавать поддельные / некачественные образцы, не принадлежащие к целевому классу [7].

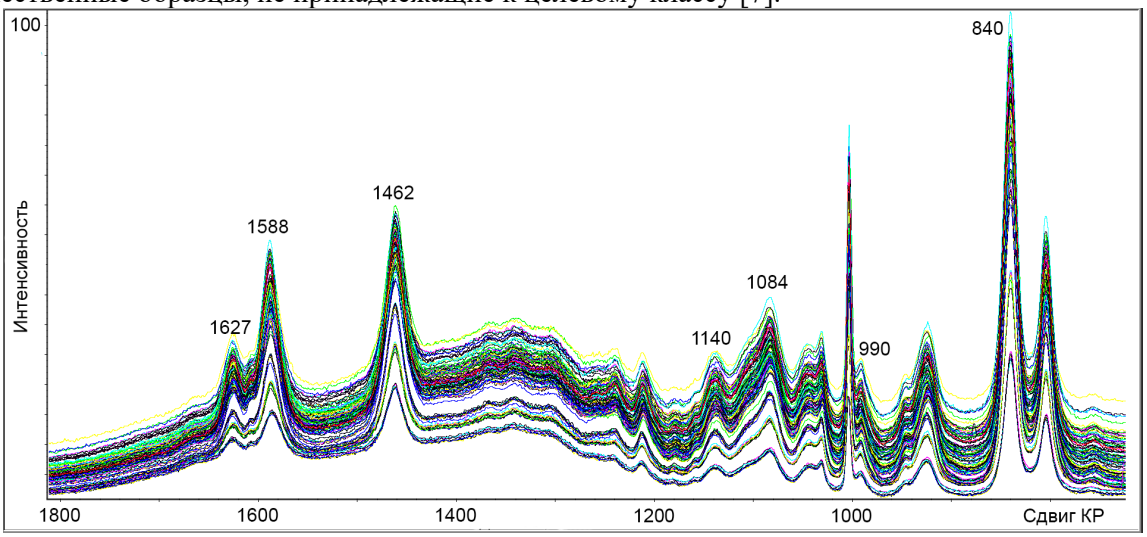


Рисунок 1. КР-спектры образцов с нормативным, завышенным и заниженным содержанием тилозина

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено отнесение основных полос, относящихся к действующему веществу (тилозин), содержащихся в спектре препарата (таблица 1) [8, 9]. Группа пиков, находящаяся в диапазоне частот 750–900 см$^{-1}$, принадлежит вспомогательным компонентам препарата.

Таблица 1. Полосы основных характеристических колебаний тилозина в исследуемом препарате.

Отнесение	Частота, см$^{-1}$
C=O валентные колебания	1627
C-N валентные колебания	1596
C-O валентные симметричные и ассиметричные колебания в RCOO- (тартрат ион)	1588
Деформационные колебания CH2-, CH3-групп	1462
Симметричные и ассиметричные C-O-C валентные колебания в алифатических простых эфирах	1140, 1084, 840
Деформационные колебания в trans RHC=CHR`	990

Для построения калибровочной модели было использовано 7 главных компонент, что описывает 88 % спектральной дисперсии данных. Оценку однородности образцов обучающего набора проводили методом главных компонент (МГК) [5,10]. Отображение образцов в пространстве главных компонент позволяет обнаружить группы и подклассы внутри обучающего набора. На рисунке 2 видно, что все серии образцов с номинальной концентрацией достаточно хорошо перемешаны (эллипс А), что свидетельствует об однородности этого класса. Препараты с повышенной (Б) и пониженной (В) концентрацией тилозина менее однородны, что связано со значительным различием в содержании действующего вещества для образцов этих классов.

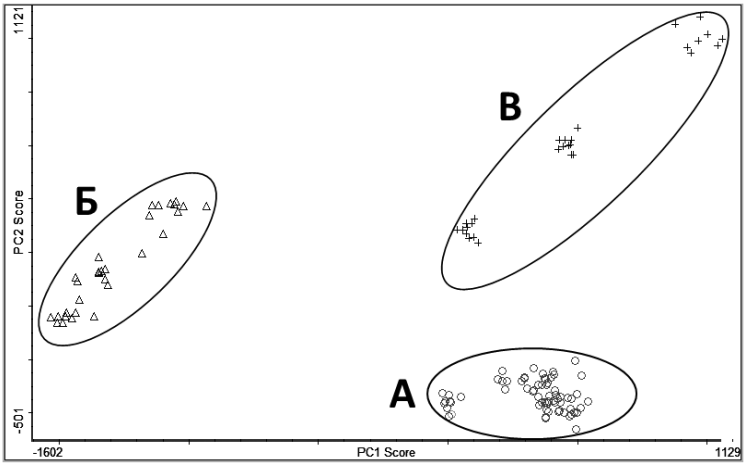


Рисунок 2. Распределение образцов обучающего набора в пространстве главных компонент

Качество разработанного метода оценивали путем кросс-валидации, в процессе которой спектральные данные каждой серии препарата последовательно удаляли из калибровочной модели, а затем использовали их в качестве проверочных образцов. По результатам данной диагностической процедуры все 13 серий образцов выдержали испытание на подлинность, а также они были корректно классифицированы согласно содержанию действующего вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере лекарственного препарата, содержащего в своем составе тилозин, было установлено, что полуколичественный анализ позволяет одновременно проводить определение подлинности, а также определять диапазон концентраций действующего вещества: его номинальное значение, повышенное или заниженное. Разработанная калибровочная модель в результате валидационных тестов показала устойчивость для разных серий лекарственного препарата. Таким образом, использование данной методики экспресс-анализа лекарственных препаратов позволяет точнее установить причину несоответствия качества образца, что предоставляет дополнительную информацию для дальнейшего испытания препарата арбитражными методами.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, А.В. Титова, Современное состояние проблемы применения ИК-спектроскопии в фармацевтическом анализе лекарственных средств, Химико-фармацевтический журнал, 42, № 8 (2008) 26–30
2. Д.А. Верескун, О.Е. Родионова, А.В. Титова А.В., Н.П. Садчикова, Изучение возможности использования БИК-спектроскопии в анализе таблеток комбинированного противомикробного препарата, Вестник Росздравнадзора, № 2 (2016) 62–66
3. D. Pivonka, J. Chalmers, P. Griffiths. Applications of Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Development, John Wiley & Sons, New York, 2007, pp. 293–308.
4. O. Ye. Rodionova A.L. Pomerantsev, Trends in Analytical Chemistry NIR-based approach to counterfeit-drug detection, Trends in Analytical Chemistry 29, № 8 (2010) 795 – 803
5. О.Е. Родионова, А.Л. Померанцев, Хемометрика: достижения и перспективы, Успехи Химии, 75, № 4 (2006) 302–321
6. А.Ю. Хрущев, Э.Р. Акмаев, В.О. Бондаренко, А.Е. Метлин, Использование гексацианоферрата (III) калия в качестве внутреннего стандарта при количественном определении кетопрофена методом КР-спектроскопии, Аграрная наука, 1 (2020), 13–16
7. O. Ye. Rodionova, P. Oliveri, A.L. Pomerantsev, Rigorous and compliant approaches to one-class classification, Chemometrics and Intellent Laboratory Systems, 159 (2016), 89 – 96
8. Б.Н. Тарасевич. ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы, Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова (2012) 4–31
9. А.Х. Купцов, Г.Н. Жижин. Фурье-спектры комбинационного рассеяния и инфракрасного поглощения полимеров. Справочник, Москва, Физматлит (2001) 26–29
10. К. Эсбенсен. Анализ многомерных данных, сокр. пер. с англ. под ред. О. Родионовой, Черноголовка, Издательство ИПХФ РАН (2005) 54–69

УДК 577.15

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ КОМПЛЕКСОМ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА МЕТОДОМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Т.И. Пономарева[1], Д.А. Слядовский[1], М.А. Тимченко[1], М.В. Молчанов[2], Е.А. Согорин[1]

[1] Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия
[2] Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Гиалуроновая кислота (ГК) является главным компонентом синовиальной жидкости и внеклеточного матрикса и участвует в процессах пролиферации, дифференциации и миграции клеток [1]. ГК также вовлечена в прогрессирование злокачественных опухолей. ГК – природный полимер, в водном окружении ГК имеет сложную вторичную и третичную структуру. Разработаны многочисленные подходы химической модификации ГК, что послужило появлению ряда форм препаратов, успешно используемых в медицине.

Цель работы – исследование способности комплекса ферментов из гомогената гепатопанкреаса камчатского краба, гидролизовать нативную ГК. Кинетика гидролиза была исследована методом ЯМР – спектроскопии.

В качестве субстрата использовалась ГК из гребня петуха (Sigma Aldrich). Гомогенат гепатопанкреаса камчатского краба (ГПК) выделяли и очищали согласно ранее разработанной нами методике [2]. Анализ кинетики гидролиза ГК под действием ГПК проводили методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения на ЯМР – спектрометре Bruker 600 AVANCE III (Bruker BioSpin, Германия). К раствору ГК, предварительно инкубированному в кислом фосфатном буфере pH 5.5 в присутствии 5 % D_2O при 37ºС в течение часа, добавляли очищенный комплекс ГПК (соотношение ГК по массе к тотальному белку ГПК=20:1) и помещали в ЯМР-ампулу. Измерения проводили при 37^0 С, спектры регистрировались через определенные промежутки времени в течение 4 дней. Расщепление ГК фиксировали по изменению в сигналах протонов ацетильной группы N-ацетил-D-глюкозамина ГК. Протоны ацетильной группы ГК в свободном состоянии в спектре ЯМР дают симметричный узкий сигнал, тогда как протоны той же ацетильной группы ГК, но входящей в ассоциаты, дают широкий сигнал несимметричной формы и смещённый в сильное поле (вправо) по оси химического сдвига на 0,04 м.д. Расчёт концентрации ГК проводили относительно известной концентрации добавленного маркера TSP и для ГК, в пересчёте на её дисахарид глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Анализ полученных результатов показал, что максимальная скорость реакции достигается в первые часы инкубации. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что гомогенат гепатопанкреаса камчатского краба проявляет высокую гиалуронидазную активность. Впервые в данной работе мы продемонстрировали перспективы использования гепатопанкреаса камчатского краба для получения препарата ГД, что может послужить основой для создания новых терапевтических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dicker, K.T., Gurski, L.A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R.L., Farach-Carson, M.C., Jia, X. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions, Acta Biomater, 2014 Apr; 10(4):1558–70, doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.019
2. Ponomareva, T., Sliadovskii, D., Timchenko, M., Molchanov, M., Timchenko, A., Sogorin, E. The effect of hepatopancreas homogenate of the Red king crab on HA-based filler. PeerJ. 2020 Feb 12; 8:e8579. doi: 10.7717/peerj.8579. eCollection 2020

УДК 66.047

МИКРОМИЦЕТЫ РОДА ASPERGILLUS КАК ПРОДУЦЕНТЫ ГЕМОСТАТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОТЕАЗ

А.Г. Очнева, А.А. Осмоловский

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,

Современные экономика и медицина нуждаются в препаратах протеолитических ферментов, способных быстро воздействовать на ряд факторов плазменного гемостаза. Используемые в настоящее время препараты имеют ряд ограничений, таких как большое число побочных эффектов, системное, а не локальное действие, аллергенность и др. Более того, у них сложный процесс получения, например, из ядов змей, что обуславливает их высокую стоимость. Ряд микроорганизмов продуцирует протеазы, обладающие действием белков системы гемостаза или способностью к их активации. Было показано, что многие представители рода Aspergillus являются активными продуцентами таких ферментов. Такие протеазы обладают разной специфичностью, сохраняют высокую активность в широком диапазоне pH и при разной температуре. Ввиду явной недостаточности представлений о распространенности таких ферментов среди представителей рода Aspergillus необходимо изучать разные штаммы, которые могут потенциально оказаться перспективными продуцентами. Более того, ферменты разных штаммов различаются по субстратной специфичности, что позволяет использовать эти ферменты для терапии целого ряда заболеваний, связанных с дисфункцией системы гемостаза и для диагностических целей.

Скриннинг активности ферментов штаммов микромицетов проводили в условиях двухстадийного культивирования в глубинных условиях. В скрининг вошли штаммы выделенные из почв Вьетнама: A.janus, A. raperi, A. ustus, A. candidus, A. aculeatus, A. amstelodami, A. giganteus, A. niger, A. fisheri. Для определения общей ферментной активности использовали нативные белки (казеин), для определения прямой активности, схожей с белками системы гемостаза – хромогенные пептидные субстраты, для определения активаторной активности – хромогенные пептидные субстраты с предшествующей инкубацией с донорской плазмой крови при 37^{O} C. В случае с казеином ферментативную активность определяли как количество свободного тирозина в супернатанте на мг белка в мл среды. В случае с хромогенными пептидными субстратами – как количество свободного пара-нитроанилина в растворе на мг белка в мл среды. Определение динамики накопления ферментов и ферментативной активности среди активных штаммов проводили также в глубинных условиях в течение 16 суток до выраженного спада активности.

В результате скрининга штаммов микромицетов были выделены штаммы A. raperi и A. candidus как продуценты самых активных ферментов. Было показано, что A. raperi обладает высокой прямой тромбиноподобной ($8,9*10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл), плазминоподобной ($7,54*10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл) и прямой активностью к плазминогену по урокиназному типу ($6,37*10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл), а A. candidus обладает высокой прямой тромбиноподобной ($8,7*10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл), плазминоподобной ($7*10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл) и активаторной к калликреину активностью ($6,1*10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл).

Таким образом, штаммы A. raperi и A. candidus являются перспективными штаммами-продуцентами гемостатически активных белков. Такие ферменты могут быть использованы в терапии и диагностике заболеваний системы гемостаза, а именно тромбозов или гемморагий различной этиологии.

УДК 547.426.22: 547.415.1

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ТРЕХКОМПОНЕНТНЫХ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ

Е.В. Шмендель*, Д.М. Макарова*, Н.Г. Морозова*, М.А. Зенкова**, М.А. Маслов*

** МИРЭА – Российский технологический университет, Москва Россия*
***Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

С целью лечения наследственных и приобретенных заболеваний с помощью генной терапии на сегодняшний день разрабатываются различные системы доставки нуклеиновых кислот. Катионные липосомы (КЛ) на основе поликатионного амфифила 2Х3 и цвиттер-ионного липида DOPE успешно себя зарекомендовали для переноса коротких и протяженных нуклеиновых кислот в эукариотические клетки [1]. Для увеличения стабильности КЛ и обеспечения более эффективного проникновения через плазматическую мембрану клеток-мишеней, в состав 2Х3-DOPE были введены гемини-амфифилы (ГА) на основе диглицерида, связанные гексаметиленовым, олигооксаметиленовым и полиэтиленгликольным спейсерами.

Для применения КЛ в генной терапии их размер должен не превышать 100 нм, поскольку более крупные частицы выводятся из организма ретикулоэндотелиальной системой, а небольшие частицы (менее 10 нм) быстро выводятся почками. Все образцы полученных трехкомпонентных КЛ имели размеры в пределах нормы. Следует отметить, что добавление синтезированных ГА в состав КЛ способно модулировать их размер. При введении 10 % мольн. ГА в состав КЛ наблюдалось наиболее резкое уменьшение среднего диаметра частиц. Добавление 2 % и 5 % мольн. ГА с полиэтиленгликольным спейсером также уменьшало размер КЛ по сравнению с контрольными 2Х3-DOPE, но менее значительно. Добавление 2 % и 5 % мольн. ГА с гексаметиленовым и олигооксаметиленовым спейсерами приводило к увеличению размера КЛ в 1.7 и 1.3 раз по сравнению с контрольными 2Х3-DOPE, соответсвенно.

Индекс полидисперсности является мерой гомогенности частиц и должен иметь значение ниже 0.300. Индекс полидисперсности полученных трехкомпонентных КЛ составлял от 0.121 до 0.296, что указывает на формирование однородных по размеру частиц (за исключением КЛ с 5 % мольн. ГА с гексаметиленовым и олигооксаметиленовым спейсерами).

Положительный ζ-потенциал обеспечивает не только повышение эффективности загрузки нуклеиновых кислот, но также является одной из причин эффективного накопления в клетках-мишенях, а также влияет на стабильность КЛ в процессе хранения. Согласно полученным данным все КЛ имели положительное значение ζ-потенциала.

Изучение цитотоксичности водных дисперсий ГА и трехкомпонентных КЛ было осуществлено в бессывороточных условиях с помощью WST-1 теста на клетках ВНК и НЕК 293. Все водные дисперсии ГА оказались нетоксичными. При этом наблюдалась высокая токсичность КЛ, содержащих ГА с гексаметиленовым спейсером в количестве 2 % и 5 % мольн. Следует отменить, что цитотоксичность, по-видимому, связана не с токсичностью самого ГА, а с его поверхностно-активными свойствами, поскольку водная дисперсия самого ГА и КЛ, содержащих тот же компонент в более высокой концентрации – 10 % мольн., были нетоксичны. Трехкомпонентные КЛ, содержащие ГА с олигооксаметиленовым и полиэтиленгликольным спейсерами, оказались нетоксичными для клеток ВНК и НЕК 293 и могут быть рекомендованы для дальнейших биологических испытаний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 0706–2020–0019).

ЛИТЕРАТУРА

[1] M.A. Maslov, T.O. Kabilova, I.A. Petukhov, N.G. Morozova, G.A. Serebrennikova, V.V. Vlassov, M.A. Zenkova, J. Control. Release. 160 (2012) 182–193.

УДК 577.2

ВЛИЯНИЕ ГИДРОФИЛЬНОСТИ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДНЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ ПО С5 ПОЛОЖЕНИЮ ПИРИМИДИНОВОГО ЦИКЛА ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ ДНК ПОЛИМЕРАЗАМИ

О.А. Заседателева, С.А. Суржиков, В.Е. Шершов, Р.А. Мифтахов, Д.А. Юрасов, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Исследования субстратной специфичности полимераз, направленные на расширение и детализацию представлений о молекулярных механизмах функционирования ДНК и РНК полимераз в присутствии различных аналогов нуклеозидтрифосфатов (1,2), служат пополнению арсенала актуальных методических подходов к созданию биологически активных соединений, селективно подавляющих работу полимераз патогенов и безвредных для человека, с целью терапии инфекционных заболеваний.

Нами были синтезированы dUTPs, модифицированные по С5-положению пиримидинового цикла рядом ароматических углеводородных заместителей, обладающих различными гидрофильными свойствами. Заместители были присоединены через линкер CH=CH-CH_2-NHCO-CH_2. С помощью полимераз Taq, Tth, Vent (exo-) и Deep Vent (exo-) исследована эффективность ПЦР-встраивания модифицированных дезоксиуридинов с использованием модельной ДНК-матрицы, содержащей мотивы A, AA и AAA в своей последовательности. Показано, что для всех использованных полимераз эффективность наработки ПЦР-продукта существенно повышается с ростом гидрофильности заместителя (3). При этом встраивание дезоксиуридина, модифицированного наиболее гидрофильным из исследованных фенильных заместителей – остатком 4-гидроксифенила, – происходит с эффективностью, равной 60–85 % от эффективности встраивания тимидина. Относительные эффективности встраивания дезоксиуридинов, модифицированных остатками 2-, 4-метоксифенила, фенила и 4-нитрофенила, составляют 20–50 %. А относительная эффективность встраивания дезоксиуридинов, модифицированных наиболее гидрофобными заместителями, – остатками 1-нафталена и 4-бифенила, – оказалась существенно пониженной и составила 2–18 % (3). Повышение эффективности ПЦР с увеличением гидрофильности заместителя в С5-положении dUTPs коррелирует с ранее полученным результатом, показывающим, что dUMPs, меченные в С5-положении гидрофильными цвиттерионными аналогами цианиновых флуорофоров, обладают более высокой эффективностью встраивания Taq-ДНК-полимеразой по сравнению с dUMPs, меченными положительно или отрицательно заряженными флуорофорами (4).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований [грант № 18–29–09151].

ЛИТЕРАТУРА

1. Jäger S., Rasched G., Kornreich-Leshem H., Engeser M., Thum O., Famulok M. A versatile toolbox for variable DNA functionalization at high density. J Am Chem Soc. 2005. 127, 15071–15082.
2. Kuwahara M., Nagashima J., Hasegawa M., Tamura T., Kitagata R., Hanawa K., Hososhima S., Kasamatsu T., Ozaki H., Sawai H. Systematic characterization of 2' – deoxynucleoside-5' – triphosphate analogs as substrates for DNA polymerases by polymerase chain reaction and kinetic studies on enzymatic production of modified DNA. Nucleic Acids Res. 2006. 34, 5383–5394.
3. Zasedateleva O.A., Surzhikov S.A., Shershov V.E., Miftakhov R.A., Yurasov D.A., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V. PCR incorporation of dUMPs modified with aromatic hydrocarbon substituents of different hydrophilicities: Synthesis of C5-modified dUTPs and PCR studies using Taq, Tth, Vent (exo-) and Deep Vent (exo-) polymerases. Bioorg Chem. 2020. 99:103829.
4. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. dUTPs conjugated with zwitterionic Cy3 or Cy5 fluorophore analogues are effective substrates for DNA amplification and labelling by Taq polymerase. Nucleic Acids Res. 2018. 46, e73.

УДК 547.458.88:513.71

МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ ПРОТИВОАНЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИГЛИКАНОВ КИСЛОЙ ПРИРОДЫ

С.Т. Минзанова, В.Ф. Миронов, Л.Г. Миронова, Е.В. Чекунков, В.А. Милюков

ИОФХ им. А.Е. Арбузова, Казань, Россия

Использование природных соединений в качестве основы лекарств – перспективный путь создания новых фармацевтических препаратов и новых лекарственных форм, особенно методами биотехнологии. Вследствие алиментарного дефицита железа даже в развитых странах среди детей младшей возрастной группы и женщин детородного возраста распространена анемия [1]. По данным Всемирной Организации здравоохранения (ВОЗ), последнее десятилетие характеризуется значительным ростом хронических и инфекционных заболеваний, в том числе таких социально значимых, как онкологические заболевания, почечная недостаточность, ВИЧ-инфекция, туберкулез. Как правило, анемия сопровождает данные заболевания [2]. Железодефицитная анемия возникает при недостаточном поступлении или плохой усвояемости железа, что наблюдается при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также при кровопотерях. «Злостная» анемия возникает как при недостатке микроэлемента железа, так и при недостатке ионов кобальта и меди.

Применяемые в настоящее время лекарственные препараты содержат преимущественно неорганические соединения металлов-микроэлементов, которые могут оказывать раздражающее воздействие на слизистую ЖКТ, проявлять токсические эффекты и вызывать системные нарушения при превышении дозировок [3]. В связи с поиском путей создания новых эффективных нетоксичных лекарственных средств внимание ученых привлекают процессы комплексообразования полисахаридов с макро-и микроэлементами. Обзор литературы демонстрирует широкий спектр биологической активности пектиновых полисахаридов и их химически модифицированных производных [4]. Комплексообразование с пектиновыми полисахаридами повышает терапевтическую и иммунологическую активность, снижает токсичность лекарственных препаратов [5]. Кроме того, пектиновые полисахариды позволяют решить проблему адресной доставки макро- и микроэлементов в кишечник, где происходит их всасывание, снижая ульцерогенный побочный эффект на ЖКТ.

В качестве противоанемического средства авторами работы [6] предложены полигалактуронаты железа, полученные на основе нестандартизованного пектина Grinsted XSS 100 со степенью метилирования 59.4 %. Для получения железо-полигалактуронатов пектин предварительно подвергали деметилированию в щелочной среде при действии раствора NaOH, далее к полигалактуронату натрия добавляли сульфат железа (II). Методом мессбауэровской спектроскопии изучена зависимость соотношения Fe(II)/Fe(III) в целевом продукте от условий получения. Установлено, что с повышением значений pH значительно возрастает доля Fe(III). Исследованиями (in vitro) японских авторов [7, 8] показано более выраженное повышение гемоглобина у крыс, получавших пектат железа, по сравнению с животными, получавшими в эквивалентных дозах неорганическое двухвалентное железо.

Практическую значимость имеют доклинические исследования лекарственного средства на основе синтезированного нами натрий-, кальций-, железополигалактуроната (ПГNaCaFe) для лечения анемии, проведенные нами в рамках мероприятия «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств» федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Полученные результаты доклинических испытаний подтверждают нетоксичность и эффективность Na-, Fe-, Ca-полигалактуроната для лечения железодефицитной анемии. Показано выраженное гемопоэз- и иммуностимулирующее действие ПГNaCaFe [9, 10], сопоставимое и даже превосходящее эффективность известного противоанемического лекарственного препарата Тотема.

Настоящая работа посвящена созданию высокоэффективных биодоступных противоанемических препаратов на основе пектиновых полисахаридов, а именно получению новых полиметаллокомплексов железа, меди и кобальта – металлов, выполняющих **ключевую** роль в функции кроветворения, при их различных соотношениях с учетом физиологической потребности, перспективных для лечения как железодефицитной, так и «злостной» анемии».

Новизной обладает предлагаемый подход к синтезу целевых продуктов, обеспечивающий получение водорастворимых (биодоступных) комплексов пектиновых полисахаридов с биогенными макро- и микроэлементами. Известно, что пектовая (неметоксилированная полигалактуроновая) кислота не растворяется в воде, что и обуславливает необходимость их перевода в растворимые в воде пектаты или полигалактуронаты натрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методика синтеза. На основе цитрусового пектина (Herbstreith&Fox, Германия) на первом этапе проводился синтез полигалактуроната натрия. Для этого пектин подвергали щелочному омылению раствором NaOH при температуре 60 °С в течение 2 часов. Далее согласно схеме 1 получали ПГNaFeCa и ПГNaFeCoCu. К раствору полученного пектата натрия добавляли раствор нескольких солей двухвалентного металла (солей кобальта, меди и железа при синтезе ПГNaFeCoCu; солей железа и солей кальция и железа при синтезе ПГNaFeCa) с концентрацией 0.02–0.002 моль/л и проводили процесс при постоянном перемешивании в течение 30 минут и температуре 55–60 °С. Осаждение целевых продуктов проводилось этиловым спиртом, далее их отделяли центрифугированием и сушили при температуре 50–55 ºС. Измельчение полученных металлокомплексов проводилось на шаровой мельнице до диаметра (d) не более 0.5 мм.

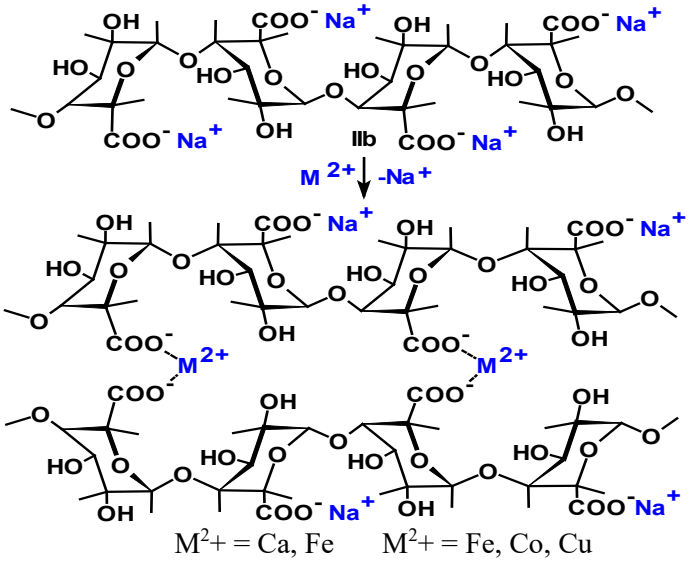


Схема 1. Предлагаемый подход для синтеза водорастворимых гетерометаллокомплексов на основе полигалактуроната натрия (степень солеобразования 100 %)

Целевые продукты ПГNaCaFeCoCu, одновременно содержащие все четыре металла, отвечающие за гемоглобин крови и за кроветворную функцию, – железо, кобальт, медь и кальций – получены смешиванием исходных металлокомплексов ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu (Fe : Cu : Co = 1 : 1 : 1) в определенном массовом соотношении 6:1 (Iа), 9:1 (Iб), 12:1 (Iс) с последующей обработкой на шаровой мельнице в течение 10 минут для обеспечения равномерного перемешивания.

Методика определения противоанемической активности ПГNaCaFeCoCu in vivo. Эксперимент был проведен на 15 самцах крыс линии Sprague Dawley в возрасте 6–7 месяцев. Животные были разделены на 4 группы: контрольная группа состояла из трёх крыс, другие группы – из четырёх. Во время эксперимента животных содержали на рационе, составленном из продуктов с пониженным содержанием железа: рис отварной на воде (31.5 %), хлеб сухой (60 %), творог обезжиренный (7 %), морковь (1.5 %). Содержание железа в железодефицитном рационе, определенное в компонентах рациона атомно-абсорбционным методом и рассчитанное на 100 г. рациона, составляло примерно 0.51 мг/100 г. корма, что в 4.5 раз ниже, чем в стандартном рационе.

Для моделирования постгеморрагической анемии, у животных делали кровопускание из кончика хвоста в течение трех дней объемом по 1 % от массы тела, или 15–17 % от общего объема кровотока, суммарный объем кровопотери составлял 45–50 % от объема кровотока. Аналогичный способ моделирования анемии описан для кроликов в Патенте BY 5336 C1 (от 30.09.2003 г.). До начала опыта (1-й день кровопускания) были исследованы исходные морфологические показатели крови и веса. Сразу после кровопускания крысам перорально вводили исследуемые препараты – металлокомплексы пектина, содержащие разное массовое соотношение металлов, в виде 3 %-ных водных растворов в объеме 2 мл на 100 г. массы тела животного. Препараты вводили также после прекращения кровопускания в течение 30 дней.

Схема эксперимента была следующая:

1 группа (контроль) – получала дистиллированную воду в объеме 2 мл/кг массы животного;

2 группа – комплексный препарат Iа при массовом соотношении металлокомплексов пектина ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu как 6:1 (60 мг/кг);

3 группа – комплексный препарат Iб при массовом соотношении металлокомплексов пектина ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu как 9:1 (60 мг/кг);

4 группа – комплексный препарат Iс при массовом соотношении металлокомплексов пектина ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu как 12:1 (60 мг/кг).

Морфологические показатели крови были определены на каждый день кровопускания, а также в динамике наблюдения – на 1, 3, 7, 10, 13, 23 и 33 день опыта при каждом заборе крови на гематологическом анализаторе Mythic 18 Vet, использующий кондуктометрический и спектрофотометрический методы (табл. 2 и 3). Образцы крови брали из надреза кончика хвоста в одноразовые пробирки для капиллярной крови марки «ЭДТА».

Статистическая обработка результатов выполнена методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента по сравнению с контрольной и опытной группами в Origin 2017.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведены комплексные исследования полученных соединений ПГNaCaFeCoCu, включая их состав, физико-химические свойства (ИК спектроскопия, АСМ, ДСР, ПЭМ) и биологическую активность.

Элементный состав ПГNaCaFeCoCu, определенный на элементном CHNS-высокотемпературном анализаторе EuroEA3028-HT-OM, количественное содержание металлов, определенное на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой iCAP 6300 DUO (Thermo Scientific, США), представлены в таблице 1. Установлено, что снижение количественного содержания кобальта и меди, увеличение содержания кальция и железа в комплексных препаратах в ряду ПГNaFeCa : ПГNaFeCoCu 6:1, 9:1, 12:1 приводит к увеличению кинематической вязкости их 0.5 %-ных растворов с 1.957 мм^2/с (6:1) до 2.293 мм^2/с (12:1), определенной с использованием вискозиметра Оствальда (К= 0.009820) (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание химических элементов в исследуемых образцах ПГNaCaFeCoCu

Образец	Содержание элементов, % масс.					C, %	H, %	Кинематическая вязкость, мм^2/с (20 ºС)
	Na (588.995)	Fe (259.940)	Co (228.616)	Cu (324.754)	Ca (317.933)			
Iа	4.39	1.17	0.30	0.22	2.26	29.39	4.35	1.957
Iб	4.22	1.22	0.22	0.17	2.44	27.46	4.37	1.961
Iс	4.34	1.25	0.15	0.12	2.47	30.50	4.45	2.293

Исследование противоанемической активности комплексных препаратов ПГNaCaFeCoCu на модели постгеморрагической анемии. В результате кровопускания в течение 3-х дней и специальной диеты с пониженным содержанием железа, у крыс во всех группах наблюдается анемия, характеризующаяся снижением показателей числа эритроцитов и концентрации гемоглобина (табл. 2, 3).

Таблица 2 – Изменение концентрации гемоглобина (г/л) при постгеморрагической анемии и введении тестируемых веществ

День исследования	1 группа Контроль	2 группа **Iа**	3 группа **Iб**	4 группа **Iс**
0 (исходный)	218,0 ± 8,4	203,5 ± 3,3	212,0 ± 4,3	205,5 ± 4,4
1 (после 1 кровопускания)	186,3 ± 10,2	178,3 ± 2,9	179,7 ± 1,2	179,0 ± 1,5
2 (после 2 кровопускания)	132,7 ± 7,7	147,8 ± 0,6	160,3 ± 17,1	138,5 ± 11,5
3 (после 3 кровопускания)	154,0 ± 5,1	142,8 ± 3,9	137,8 ± 5,9	154,0 ± 7,2
7	176,0 ± 8,3	173,5 ± 4,8	166,8 ± 1,2	168,8 ± 2,7
10	162,0 ± 17,8	183,0 ± 2,0	185,8 ± 2,9	183,3 ± 3,2
13	200,3 ± 9,4	197,3 ± 0,9	196,5 ± 1,3	198,8 ± 1,7
23	210,7 ± 4,3	202,5 ± 2,9	203,8 ± 3,3	204,5 ± 4,0
33	204,0 ± 5,0	201,8 ± 1,8	198,0 ± 1,3	204,0 ± 0,4
* – различия с контрольной группой статистически достоверны при $p < 0.05$				

Наиболее выраженное повышение исследованных показателей крови под действием комплексных препаратов Iа-с наблюдалось на 10 день (табл. 2, 3), что свидетельствует об их стимулирующем влиянии на восстановление клеток крови, или эритропоэз, у животных при острой кровопотере и на фоне кормления железодефицитным рационом. Выраженное повышение числа эритроцитов наблюдалось при введении пектинового комплексного препарата Iб (9:1) (табл. 3), что свидетельствует о наибольшей эффективности комплексного препарата при данном массовом соотношении ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu.

Результаты дальнейшего наблюдения (13–33 день) показали полное восстановление исследованных гематологических показателей крови во всех группах и отсутствие различий с контрольной группой.

Таблица 3 – Изменение числа эритроцитов ($\times 10^{12}$/л) при постгеморрагической анемии и введении тестируемых веществ

День исследования	1 группа Контроль	2 группа **Iа**	3 группа **Iб**	4 группа **Iс**
0 (исходный)	8,41 ± 0,36	8,41 ± 0,25	9,22 ± 0,17	8,83 ± 0,18
1 (после 1 кровопускания)	7,82 ± 0,35	7,55 ± 0,10	7,66 ± 0,29	7,75 ± 0,08
2 (после 2 кровопускания)	5,86 ± 0,42	6,48 ± 0,05	7,28 ± 0,65	6,62 ± 0,47
3 (после 3 кровопускания)	7,09 ± 0,18	6,50 ± 0,18	6,68 ± 0,10	7,01 ± 0,31
7	7,44 ± 0,21	7,43 ± 0,19	7,19 ± 0,07	7,18 ± 0,09
10	6,76 ± 0,54	7,93 ± 0,16 *	8,17 ± 0,07 *	7,93 ± 0,14 *
13	8,60 ± 0,38	8,60 ± 0,08	8,62 ± 0,11	8,62 ± 0,07
23	9,35 ± 0,13	9,04 ± 0,18	9,19 ± 0,20	9,02 ± 0,19
33	9,01 ± 0,20	8,79 ± 0,14	8,84 ± 0,19	9,01 ± 0,04
* – различия с контрольной группой статистически достоверны при $p < 0.05$.				

На основе пектиновых полисахаридов получены и исследованы гетерометаллокомплексы ПГNaCaFeCoCu, одновременно содержащие четыре металла, отвечающие за гемоглобин крови и за кроветворную функцию. Принципиальное отличие ПГNaCaFeCoCu заключается в комплексном воздействии на систему эритропоэза, т. к. в составе имеются три микроэлемента (железо, кобальт и медь), необходимые для кроветворения; в водорастворимости (биодоступности); а также в том, что макро- и микроэлементы связаны с органическими ионами природного нетоксичного вещества пектина – натуральной пищевой добавки, используемой в производстве йогуртов, сметаны, перспективных для детей и для взрослых. Макроэлемент – кальций, который содержится в составе гетерометаллокомплексов пектиновых полисахаридов, не снижает биологическую доступность железа, а дополнительно способствует нормализации обмена кальция в организме для больных с первичными и вторичными остеопорозами. Необходимо отметить, что пектиновые полисахариды обладают иммуномодулирующим, детоксикационным, радиопротекторным действием, что может обеспечить дополнительный терапевтический эффект предлагаемого лекарственного средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты являются фундаментальной основой для организации производства высокоэффективных нетоксичных лекарственных препаратов пролонгированного действия отечественного производства, перспективных для лечения и реабилитации детей с гематологическими заболеваниями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18–03–00310_ а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haram K. et al. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica. 2001. Vol. 80. – P. 683–688.
2. World Health Organization. Iron deficiency anemia assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva, Switzerland: WHO; 2001.
3. Лялякин П.Ф. Лекарства, которые вы выбираете. Москва: ТФ «Мир» ОНИКС 21 век. 2001. – С. 7–25.
4. S.T. Minzanova, V.F. Mironov, D.M. Arkhipova, A.V. Khabibullina, L.G. Mironova, Y.M. Zakirova, V.A. Milyukov // Polym., 2018. N. 10. – P. 1407. DOI: 10.3390/polym10121407.
5. Крисс Е.Е., Волченскова И.И., Бударин Л.И. // Координац. химия. 1990. Т. 6. Вып.1. – С. 11–21.
6. E. Kuzmann, V.K. Garg, A.C. de Oliveira et al. Mössbauer study of the effect of pH on Fe valence in iron – poly-galacturonate as a medicine for human anaemia // Radiation Physics and Chemistry. 2015. N. 107. – P. 195–198.
7. Miyada T.,. Iron bound to pectin is utilised by rats // British J. of Nutrition. 2011. V. 106. – P. 73–78.
8. Miyada, T., Nakajima, A., Ebihara, K. Degradation of pectin in the caecum contributes to bioavailability of iron in rats // British J. of Nutrition. 2012. V. 107 (10). – P. 1452–1457.
9. С.Т. Минзанова и др. Синтез и физико-химические свойства противоанемических комплексов железа и кальция с полигалактуронатом натрия // Докл. АН, 2016. Т. 467. № 4. – С. 431–435
10. S.T. Minzanova, V.F. Mironov et al. Complexation of pectin with macro – and microelements. Antianemic activity of Na, Fe and Na, Ca, Fe complexes // Carb. Polym., 2015. N. 134. – P. 524–533.

УДК 547.458.88:513.71

МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИГЛИКАНОВ КИСЛОЙ ПРИРОДЫ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

С.Т. Минзанова[1], Л.Г. Миронова[1], А.И. Дойникова[2], До Тхи Бич Нгок[2], В.А. Милюков[1]

[1] ИОФХ им. А.Е. Арбузова, Казань, Россия

[2] Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия

Биотехнологические науки занимают приоритетное положение в области современных высоких технологий. Одним из перспективных направлений является создание новых носителей и средств целевой доставки лекарственных препаратов. Пектин – это полисахаридный компонент растительного сырья, главную углеводную цепь которых составляют 1,4 – связанные остатки α-D-галактуроновой кислоты [1, 2]. По международной классификации они зарегистрированы как натуральная пищевая добавка Е440, т. к. обладают хорошей желирующей способностью и широко применяются в пищевой промышленности. Благодаря комплексообразующей способности, пектины широко используются в лечебно-профилактических целях в качестве детоксикантов и радиопротекторов [3].

Обзор литературы показывает, что пектины оказывают бактерицидное действие на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, несмотря на различия в составе и строении их клеточной стенки. На сегодняшний день исследованы различные формы пектинов: пектиновые растворы, частицы и наночастицы, нанокомпозиты и наноэмульсии. В работе [4] сообщается о синтезе нанокомпозита сульфида кадмия с пектином (PC / CSNC) в водной фазе при 60 °C, показавшего превосходную антибактериальную активность в отношении культуры кишечной палочки. Криворотовой Т.С. с соавторами [5] установлено влияние степени этерификации пектина на антимикробную активность частиц пектин-инулин-низин. Большое внимание направлено на исследование антимикробной активности наноэмульсий на основе пектина [6].

В работе [7] синтезированы наночастицы серебра с использованием цитрусового пектина (AgNP). Изучение антибактериальной активности AgNP на Escherichia coli и Staphylococcus aureus показало их перспективность в качестве антибактериальных агентов для применения в медицине. Авторами экспериментально установлено ингибирующее действие 1 % раствора яблочного пектина на рост стафилококков и стрептококков, равное 23,6–38,1 % [8].

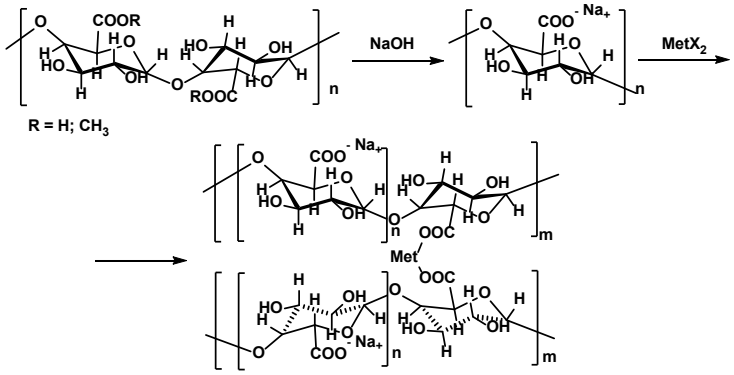
Целенаправленные исследования взаимосвязи структура-активность являются неотъемлемой составляющей при изучении природных молекул или их полусинтетических аналогов, что в свою очередь позволяет найти соединения с более высокой активностью или меньшей токсичностью. Настоящие исследования направлены на создание эффективных лекарственных средств на основе цитрусового пектина, обладающих антимикробной активностью и перспективных для прогнозирования противоопухолевой активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Базовой основой предлагаемого подхода для синтеза водорастворимых (биодоступных) комплексов пектиновых биополимеров с макро- и микроэлементами является разработанный нами подход, предполагающий полную деэтерификацию пектинов с образованием пектата натрия со степенью солеобразования 100 % с последующим вовлечением их в комплексообразование (Схема 1).

Для обеспечения водорастворимости металлокомплексов экспериментально была установлена пороговая концентрация степени замещения ионов натрия на металл (в пределах 1–25 % двухвалентного металла относительно исходного содержания одновалентного натрия) [9].

Ранее были синтезированы и исследованы металлокомплексы на основе полигалактуроната натрия – ПГNaCo и ПГNaNi [10]. Показано, что соединения ПГNaCo и ПГNaNi (концентрация 10 %) обладают антимикробным действием в отношении всех тест-микроорганизмов, а именно к штаммам бактериальных культур Staphylococcus aureus ATCC 6538-P, Escherichia coli ATCC 25922, Bacillus cereus NCTC 8035, Pseudomonas aeruginosa 9027 и культур грибов – Candida albicans ATCC 885–653, Aspergillus niger BKMF-1119.



Met = Mg; Co; Zn; Cr, Mn n=3–10; m=10–35

Схема 1. Предлагаемый подход для синтеза водорастворимых металлокомплексов на основе полностью деэтерифицированных полигалактуронатов натрия

В настоящей работе проведена оценка антимикробной активности полученных фармакологических композиций на основе натрий-, кобальт-, полигалактуроната (ПГNaCo) (табл. 1).

Антимикробное действие фармакологических композиций ПГNaCo: ПГNaZn, ПГNaCo: ПГNaMg; ПГNaCo: ПГNaCr (массовое соотношение 3:1) было изучено в концентрации (0.25–5.0) масс. % в общей сложности на трех музейных штаммах грамположительных бактерий (Staphylococcus aureus ATCC 209p, Bacillus cereus ATCC 8035) и грибов Candida albicans. Добавлением фармакологических композиций на основе натрий-, кобальт-, полигалактуроната ПГNaCo непосредственно в агаризованную питательную среду (МПА) или среду Сабуро (для Candida albicans ВКПГу-401/NCTC 885–653) получены 5 % концентрации исследуемых соединений. Полученные суспензии тщательно перемешивались и были внесены в стерильные чашки Петри, в контрольные чашки образцы фармакологических композиций на основе натрий-, кобальт-, полигалактуроната ПГNaCo не добавляли.

Таблица **1** – Антимикробная активность пектиновых фармакологических композиций на основе ПГNaC

Образец	Концентрация образца, %	Бактерии		Грибы
		Sa	Bc	Ca
ПГNaCo: ПГNaZn (3:1)	5	-	+/-	-
	2,5	+/-	+	-
	1	+	+	+/-
	0,5	+	+	+
	0,25	+	+	+
ПГNaCo: ГnaMg (3:1)	5	-	+/-	+
	2,5	+/-	+	+
	1	+	+	+
	0,5	+	+	+
	0,25	+	+	+
ПГNaCo: ПГNaCr (3:1)	5	-	+/-	-
	2,5	+/-	+	+
	1	+	+	+
	0,5	+	+	+
	0,25	+	+	+
ПГNaCo: ПГNaMn (3:1)	5	-	+/-	-
	2,5	+	+	+
	1	+	+	+
	0,5	+	+	+
	0,25	+	+	+

После застывания агара бактериологической петлей на поверхность среды наносили культуру каждого тест-штамма бактерий и гриба в виде штриха на МПА и агар Сабуро, соответственно. Чашки с МПА инкубировали при температуре (32.5±2.5) °С в течение 48 ч, чашки со средой Сабуро при температуре (22.5±2.5) °С в течение 5 суток. Если на средах с препаратом наблюдается заметное уменьшение количества колоний на чашках (более 70 %) по сравнению с контролем или отсутствие роста тест-микроорганизмов, это свидетельствует о наличии антимикробного действия (табл. 1). Из представленных в таблице 1 данных видно, что антимикробным действием в отношении всех тест – микроорганизмов обладают практически все исследованные фармакологические композиции на основе натрий-, кобальт-, полигалактуроната ПГNaCo в концентрации 5 % масс. Исключение составляет комплексный препарат ПГNaCo: ПГNaMg, который не угнетает в данной концентрации рост грибов (Candida albicans), а в отношении остальных тест-микроорганизмов в концентрации 5 масс. % обладает антимикробным действием.

Следует отметить, что исследуемые пектиновые фармакологические композиции ПГNaCo: ПГNaZn, ПГNaCo: ПГNaMg; ПГNaCo: ПГNaCr при массовом соотношении 3:1 в концентрации 2.5 масс.% обладают антимикробным действием в отношении штаммов грамположительных бактерий Staphylococcus aureus, проявляющемся в задержке их роста. Фармакологическая композиция ПГNaCo: ПГNaMn задерживает рост таких тест-микроорганизмов, как бактерии Bacillus cereus в концентрации 5 масс.%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе ПГNaCo со степенью солеобразования 100 % получены новые фармакологические композиции, а именно водорастворимые препараты металлокомплексов, содержащих макроэлемент магний и микроэлементы хром, марганец и цинк; исследованы их физико-химические свойства и антимикробная активность. Экспериментально на музейных штаммах грамположительных бактерий (Staphylococcus aureus, Bacillus cereus), грибов (Candida albicans) установлена концентрация препаратов на питательной среде, в которой они проявляют антимикробную активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18–03–00310)

ЛИТЕРАТУРА

Оводов Ю.С., Головченко В.В., Гюнтер Е.А., Попов С.В. Пектиновые вещества растений Европейского севера России // Екатеринбург: УрО РАН. 2009. – 110 с.
Voragen A.G.J., Schols H.A., Siliha A.I., Pilnik W. Enzymic lysis of pectic substances in cell walls: some implications for fruit juice technology // Chemistry and functions of pectins. 1986. – P. 231–247.
Pectin: Chemical Properties, Uses and Health Benefits (Food Science and Technology) / Ed. Ph. L. Bush. New York: Nova science publishers, 2014. – 268 p.
Gupta V.K., Pathania D., Asif M., Sharma G. // J. Mol. Liq. 2014. V. 196. – P. 107–112. DOI 10.1016/j.molliq.2014.03.021.
Krivorotova T., Staneviciene R., Luksa Ju., Serviene E., Sereikaite J. // LWT-Food Sci. Technol. 2016. V. 72. – P. 518–524.
Guerra-Rosas M.I., Morales-Castro J., Cubero-Marquez M.A., Salvia-Trujillo L., Martin-Belloso O. // Food Control. 2017. V. 77. – P. 131–138. DOI 10.1016/j.foodcont.2017.02.008.
Zhang W., Zhao X.J., Jiang Y., Zhou Zh. // Inorg. Nano-Met. Chem. 2017. V. 47. № 1. – P. 15–20. DOI 10.1080/1553174.2015.1137073.
Kutsyk R.V., Kosenko S.V., Haioshko O.B. Pharma Innovation 2016. V. 5. № 5. – P. 70–75.
Minzanova S.T., Mironov V.F. et al. Complexation of pectin with macro – and microelements. Antianemic activity of Na, Fe and Na, Ca, Fe complexes // Carb. Polym., 2015. N. 134. – P. 524–533.
Минзанова С.Т., Миронов В.Ф., Миронова Л.Г., Низамеев И.Р., Холин К.В., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Назаров Н.Г., Милюков В.А. // Химия природных соединений 2016. № 1. – С. 28–32. [Minzanova S.T., Mironov V.F., Mironova L.G., Nizameev I.R., Kholin K.V., Voloshina A.D., Kulik N.V., Nazarov N.G., Milyukov V.A. // Chem. Nat. Compd. 2016. V. 52. № 1. – P. 26–31. doi.org/10.1007/s10600–016–1539–1.

УДК 575.162

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

Е.В. Филатова, М.И. Шадрина, И.Н. Власов, П.А. Сломинский

Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – самая распространённая форма наследственных заболеваний сердца, которая характеризуется гипертрофией стенки левого и / или изредка правого желудочка, и встречается в общей популяции с часто-той 1:500. По современным представлениям в большинстве случаев ГКМП – аутосомно-доминантное заболевание, хотя и не исключается аутосомно-рецессивный тип наследования. В настоящее время идентифицировано около 50 генов и 1500 мутации в них, которые связаны с развитием ГКМП. Однако до сих пор не выявлены все гены, которые могут быть связаны с патогенезом ГКМП, и как минимум в четверти случаев генетическая основа ГКМП остаётся не выявленной. При этом патогенетическая значимость большинства выявленных при ГКМП мутаций остаётся до конца не выясненной, поскольку из-за низкой встречаемости большинства мутаций в популяции и небольшого размера семей провести косегрегационный анализ в достаточном объёме не представляется возможным. Более того, у российских больных до сих пор не описан спектр генов и мутаций, которые вносят вклад в развитие ГКМП в нашей популяции. В связи с этим крайне актуальной является изучение генетических факторов, связанных развитием ГКМП в российской популяции, в выборке из 99 неродственных русских пациентов с ГКМП из Московской области, диагностированных в соответствии с европейскими диагностическими критериями для семейной ГКМП. Секвенирование клинического было проведено с использованием набора для обогащения SomeSelectFocusedExome на секвенатореIlluminaHiSeq 2500 со средним покрытием 30. Биоинформационный анализ полученных последовательностей проводился в среде «R» с использованием алгоритмов CADD и REVEL и базы данных ClinVar. В результате было показано, что большинство мутаций с доказанной согласно ClinVar патогенетической значимостью у наших пациентов наблюдается в генах MYBPC3 и MYH7 (например, нонсенс мутации Q1233* и Y847* в гене MYBPC3 и миссенс мутация G741R в гене MYH7). Общая частота мутаций в этих генах в нашей выборке составила 5 %., Частота встречаемости отдельных мутаций в нашей популяции была очень низкой. Следует отметить, что, несмотря на то, что точно идентифицированные мутации не являются уникальными для нашей выборки больных и обнаруживаются у пациентов во всем мире, частоты этих мутаций в нашей популяции немного отличаются от тех, о которых сообщалось в Европе. Мы также идентифицировали несколько потенциально патогенетически значимых мутаций в генах саркомерных белков MYH7, MYBPC3, TNNT2, MYL3 и TPM1, которые считаются основными генами ГКМП. Эти потенциально патогенетически значимые варианты также очень редки и встречаются в отдельных случаях ГКМП у больных во всем мире. Они были классифицированы как патогенетически значимые с помощью анализа биоинформатики, проведенного в этом исследовании. 22 потенциально патогенетически значимых варианта выявлены в генах ACTN2, TRIM63, LDB3, TTN, MYH6, TCAP, NEXN и VCL, которые могут быть причиной развития ГКМП у 24 пациентов из нашей выборки. Некоторые из этих генов кодируют белки, которые являются структурными компонентами саркомера, тогда как другие структурно связаны с саркомером или участвуют в поддержании функции саркомера.

Выполнение работы частично поддержано Курчатовским геномным центром – ИМГ (соглашение № 075–15–2019–1664).

УДК 577.151.3

ПОРИСТЫЕ МИКРОЧАСТИЦЫ КАТАЛАЗЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА ОСНОВЕ ВАТЕРИТА $CaCO_3$

М.А. Тагирова, Н.Г. Балабушевич, Н.Л. Клячко, Д.В. Володькин

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

В настоящее время пористые микросферы ватерита широко применяются в качестве контейнеров для включения биологически активных веществ и основы для создания полимерных многослойных капсул. Среди полиморфных форм $CaCO_3$ ватерит обладает высокой удельной поверхностью, контролируемым размером частиц и мезопористой внутренней структурой [1].

Для высокоэффективного включения белков различной природы в микросферы ватерита активно используют соосаждение при формировании частиц [2–3].

В качестве белка для исследования включения в микросферы ватерита выбрана высокомолекулярная каталаза (250 кДа, pI 5,4). Каталаза относится к ферментам класса оксидоредуктаз, является хромопротеидом, имеющим в качестве простетической (небелковой) группы окисленный гемм, и состоит из четырех идентичных субъединиц с молекулярной массой около 60 кДа [4].

Цель работы – получение пористых микрочастиц каталазы с использованием микросфер ватерита.

Микросферы ватерита получали по стандартной методике смешиванием растворов $CaCl_2$ и Na_2CO_3 в присутствии каталазы в концентрации 4 мг/мл [3] с последующей инкубацией и промывкой от не связанного белка. Включение белка в микросферы определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм в промывочных и надосадочных растворах. Варьируя мольное соотношение глутарового альдегида по отношению к каталазе (от 10/1 до 900/1), проводили сшивание аминогрупп белка в микросферах ватерита и растворяли $CaCO_3$-матрицу с использованием этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Активность фермента спектрофотометрически измеряли путем мониторинга скорости разложения перекиси водорода при 240 нм. Сохранение удельной активности каталазы в микросферах рассчитывали как соотношение между активностью фермента после растворения микросфер в ЭДТА и нативной каталазы в равной концентрации в фосфатном буфере (pH 7,0). Подобраны условия обработки глутаровым альдегидом и растворения $CaCO_3$, позволяющие добиться наибольшего включения белка при сохранении высокой удельной активности фермента.

В результате исследования проведено включение каталазы методом соосаждения в микросферы ватерита, подобраны условия сшивания аминогрупп каталазы глутаровым альдегидом в порах ватерита и растворения $CaCO_3$-матрицы, получены и охарактеризованы пористые микрочастицы каталазы. Выявлено, что процесс сшивания микросфер глутаровым альдегидом влияет на включение и на сохранение удельной активности каталазы в микросферах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Volodkin, D. $CaCO_3$ templated micro-beads and – capsules for bioapplications // Advances in Colloid and Interface Science. – 2014. – Vol.207. – P.306–324.
2. Sharma, S., Verma, A., Teja, B.V., Pandey, G., Mittapelly, N., Trivedi, R., Mishra, P.R. An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2015. – Vol.133. – P.120–139.
3. Feoktistova N.A., Vikulina A.S., Balabushevich N.G., Skirtach A.G., Volodkin D. Bioactivity of catalase loading into vaterite $CaCO_3$ crystals via adsorption and co-synthesis // Materials and Design. – 2020. – Vol.185. – P.1–9.
4. Ścibior, D., Czeczot, H. Catalase: structure, properties, functions // Postepy Hig Med Dosw. – 2006. – Vol.60. – P.170–180.

УДК 615.012:014

ОСНОВНЫЕ ПУТИ ПРОВЕДЕНИЯ ВАЛИДАЦИИ ПРОЦЕССА ОЧИСТКИ ОБОРУДОВАНИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

А.А. Татарникова, Н.Л. Клейменова, Л.И. Назина

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия

Процедуры очистки поверхностей производственного оборудования, вступающего в непосредственный контакт с продуктом, должны быть валидированными [1]. Целью валидации очистки является проверка эффективности процедуры очистки в удалении остатков активных компонентов, микробиологических загрязнений и детергентов, так что мониторинг процедур очистки сводится к минимуму в рутинном производстве. Валидация очистки оборудования, предназначенного для выпуска продукции с одинаковыми активными компонентами, включает микробиологическое тестирование и определение остаточного количества детергентов / дезинфектантов [2]. Таким образом, для подтверждения валидации процедуры очистки следует выполнить не менее трех последующих успешных циклов очистки производственного оборудования.

В ходе анализа были выявлены основные методы, которые используются для оценки очистки производственного оборудования.

Визуальная инспекция поверхности оборудования. Данный метод применяется до и после очистки производственного оборудования для подтверждения устранения поверхностных загрязнений. Аналитическое тестирование взятых мазков с определенных мест производственного оборудования. Места отбора проб следует выбирать на основании чертежа производственного оборудования и характеристик оборудования (поверхности, очистка которых является самой трудной, поверхности, к которым доступ является самым трудным, места с неровной поверхностью и случайные места на производственном оборудовании).

Аналитический метод для определения остатков активных компонентов и детергентов. Чувствительность метода должна соответствовать рассчитанному значению критерия приемлемости.

Испытание микробиологической чистоты поверхности оборудования. Методами, используемыми для определения микробиологической чистоты поверхности оборудования, являются постоянно употребляемые фармакопейные методы. Методы контроля микробиологической чистоты должны быть верифицированы и иметь подтверждение отсутствия антимикробной активности у активных веществ и детергентов.

На основании данных исследований валидация процессов очистки представляет собой сложную процедуру, в ходе которой для каждого выбранного контаминанта устанавливаются следующие аспекты: уровень чистоты, метод отбора проб, критерии приемлемости. Записи об очистке производственного оборудования являются составной частью протокола валидации очистки и доказывают проведение установленной процедуры очистки, определенной рабочими инструкциями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Татарникова А.А., Клейменова Н.Л. Методика измерения производительности HEPA-фильтра в чистых помещениях // «Молодежь и XXI век – 2019». 2019. Том 5. С. 64–65.
2. Приказ Минпромторга России от 14.06.13 № 916 (ред. от 18.12.15) «Об утверждении правил надлежащей производственной практики».

УДК 615.276.4:54.058

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ХОНДРОИТИН СУЛЬФАТА: СОВРЕМЕННЫЕ РЕШЕНИЯ

А.И. Капитунова[1], Н.Е. Патюков[1], С.А. Сухих[1,2], О.О. Бабич[1,2]

[1] Балтийский Федеральный Университет им. И. Канта», Калининград, Россия
[2] Кемеровский государственный университет», Кемерово, Россия

Хондроитин сульфат (ХС) – это природная биомакромолекула, распространенная практически у всех беспозвоночных и позвоночных животных и у человека обеспечивает специфические биологические функции на молекулярном, клеточном и органном уровнях, такие как адгезия клеток, деление и дифференцировка клеток, морфогенез, органогенез и формирование нейронных сетей [1]. ХС применяется для профилактики заболеваний опорно-двигательного аппарата, строго оценивается по качеству, содержанию, структурным характеристикам и параметрам (таким как плотность заряда и молекулярная масса) [2]. Эти особенности имеют первостепенное значение для обеспечения терапевтической воспроизводимости и безопасного использования, а также для защиты пациентов от неэффективных и / или небезопасных и потенциально опасных лекарств.

Происхождение ХС, используемого в готовом продукте, может быть обнаружено только с помощью довольно дорогих и подробных биохимических / структурных анализов путем определения структуры дисахарида / олигосахарида и параметров молекулярной массы [1]. Методы исследования включают электрофорез, HPSEC, селективную ферментативную обработку и дальнейшее разделение составляющих дисахаридов / олигосахаридов с использованием сложных методов, включая капиллярный электрофорез, ВЭЖХ [2,3], FACE (флуоресцентно-ассистированный углевод электрофорез) [4] и масс-спектрометрии [5]. Профиль ХС достигается с помощью хорошо зарекомендовавших себя многоаналитических лабораторных методов, в частности электрофореза, HPSEC и eHPLC [1, 2], благодаря их высокой пропускной способности, чувствительности и воспроизводимости. Эти методы, применяемые до и после ферментативного расщепления ХС на более мелкие компоненты, могут различать ХС, полученные из различных животных или морских источников, на основе содержания дисахаридов, характера сульфатирования и молекулярного размера полимера, также используя аналитические стандарты ХС различного происхождения.

Таким образом, контроль качества конечного продукта ХС, должен строго регулироваться с применением современных аналитических методов для обеспечения качества, безопасности и эффективности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20–316–70002\19 от 21.11.2019)

ЛИТЕРАТУРА

1. Volpi, N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: New functions from an old natural macromolecule. Inflammopharmacology 2011, 19, 299–306.
2. Volpi, N. Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates. J. Pharm. Sci. 2007, 96, 3168–3180.
3. Volpi, N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. J. Pharm. Pharmacol. 2009, 61, 1271–1280.
4. Buzzega, D.; Maccari, F.; Volpi, N. Determination of molecular mass values of chondroitin sulfates by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). J. Pharm. Biomed. Anal. 2010, 51, 969–972.
5. Volpi, N. High-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry detection for the analysis of chondroitin sulfates/hyaluronan disaccharides derivatized with 2-aminoacridone. Anal. Biochem. 2010, 397, 12–23.

УДК 66.606

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И СТРУКТУРЫ УЛЬТРАТОНКИХ ВОЛОКОН НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ ДЛЯ МЕДЦИНЫ

П.М. Тюбаева[1,2], А.А. Ольхов[1,2], А.К. Зыкова[1,2], Е.С. Мороков[2], А.А. Попов[1,2]

[1] Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, Москва, Россия,
[2] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

Высокопористые полимерные носители биологически активных веществ в настоящее время находят широкое применение в биологии и медицине в качестве матриц пролонгированного действия, матриксов для клеточной инженерии, антибактериальных терапевтических систем, матриц контролируемого высвобождения лекарственных веществ и др. [1]. Волокнистые структуры и фибриллярные материалы на их основе можно получать различными способами, но наибольшее внимание следует уделять методу электроформования из раствора биополимеров. Данный метод позволяет получать волокна неограниченной длины с большой вариацией диаметров [2]. Разные конструктивные решения в установках для электроформования позволяют осуществлять модификацию поверхности волокон, контролировать широкий спектр свойств получаемых нетканых материалов [3]. В данной работе удалось установить ряд закономерностей, которые позволяют варьировать свойства волокнистых материалов на основе биополимера поли-(3-гидроксибутирата) (ПГБ).

На надмолекулярную структуру биополимерных волокон, образующих слой нетканого материала, получаемого методом электроформования, оказывают влияние не только молекулярные характеристики полимера, но и условия его выработки в волокно, процесса отверждения, а также этапы последующей обработки [4]. Пористость, геометрия, топология поверхности каждого отдельного волокна, а также их взаимная ориентация вносят существенный вклад в формирование физико-механических, диффузионных, теплофизических свойств материала. В работе установлено, что надмолекулярная структура ПГБ в значительной степени определяет скорость биодеструкции материала, его эксплуатационные характеристики, улучшение и контроль которых возможны несколькими эффективными способами: введение модифицирующих добавок, химическая обработка волокнистых материалов, варьирование технологических параметров процесса электроформования на различных этапах получения волокон [5, 6].

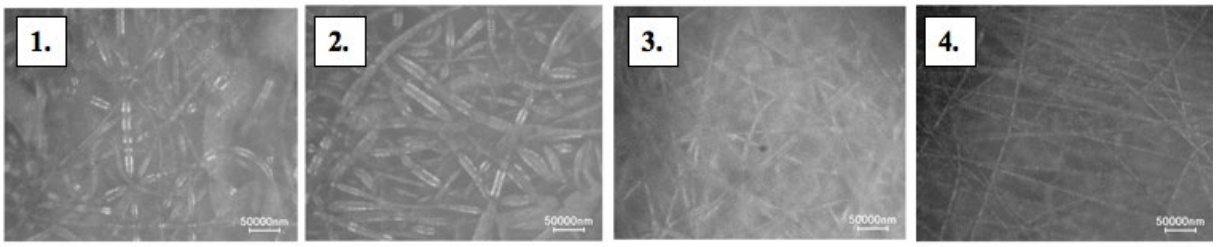


Рисунок 1. Микрофотографии материалов, полученных с применением различных рецептур формовочного раствора на основе ПГБ, в отраженном свете при увеличении в 200 раз.

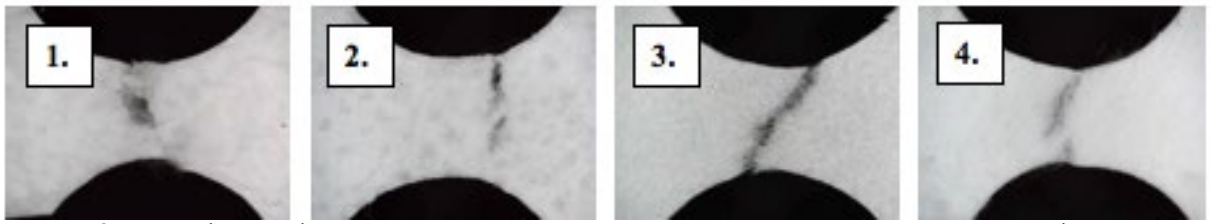


Рисунок 2. Микрофотографии материалов, полученных с применением различных рецептур формовочного раствора на основе ПГБ, в момент разрыва при максимальном нагружении.

В работе представлено два технологических решения для нескольких рецептур формовочных растворов биополимера ПГБ в хлороформе. Рассмотренные технологические решения позволяют получить фибриллярные композиты с различной морфологией волокон, обуславливающих отличия в физико-механических характеристиках нетканых материалов. Данное исследование дает возможность варьировать свойства биополимерных волокнистых полотен, которые могут применяться в изделиях для медицины, ветеринарии, гигиены, биологии, способных к биодеградации после использования. В работе изучено поведение таких материалов при нагружении в различных условиях, в том числе приближенных к одноцикловым нагрузкам в условиях среды живого организма.

Из рисунка 1 видно, что различные рецептуры, в которых содержание ПГБ в формовочном растворе составляло не более 15 %, позволяли существенно влиять на характер разброса диаметров формуемых волокон, на количество дефектов, к которым относятся утолщения, капли, склейки, разрывы. Именно эти структурные особенности определяли физико-механические свойства материала, которые представлены в Таблице 1.

Таким образом, контроль различий в морфологии волокнистого слоя позволяет варьировать показатель прочности на растяжение в диапазоне от 0,1 МПа до 1,3 МПа и относительное удлинение при разрыве от 1 до 5 %. Для визуализации эволюции микроструктуры при нагружении применялись два метода: оптическая микроскопия для наблюдения за изменениями на поверхности материала, а также метод высокочастотной акустической микроскопии для наблюдения за пошаговой трансформацией системы волокон в слое материала.

Таблица 1. Результаты физико-механических испытаний образцов с различными параметрами структуры

Номер рецептуры материала	Физико-механические характеристики		Структурные характеристики	
	Максимальная нагрузка, Н	Относительное удлинение, %	Средний диаметр волокон, мкм	Средняя толщина полотна, мм
1	2,4	4,4	8,2	0,16
2	0,9	3,3	9,5	Менее 0,1
3	7,8	1,3	13	0,3
4	2,3	5,0	13	0,2

Было установлено влияние размера волокна, плотности упаковки и объемной архитектуры на механическое поведение всей системы, формирующей нетканый материал. На рисунке 2 приведены микрофотографии материала в момент разрыва.

Следует отметить, что не только толщина материала оказывала существенное влияние на характер и место разрыва, но и взаимное расположение волокон. Акустическая микроскопия позволила установить, что технологические параметры процесса ЭФ существенно влияют на расстояние между волокнами, наличие пустот и, как следствие, образование в системе волокон наиболее напряженных склеенных волокон. Такие участки формируют каркас системы, который рвется в последнюю очередь и вносит наибольший вклад в прочностные характеристики материала. Технологические решение № 3 позволяет получить наибольшее число параллельно ориентированных, равномерно расположенных по всей структуре, скрепленных между собой волокон, выполняющих функции каркасов в нетканом материале, поэтому его максимальная нагрузка более чем в три раза выше, чем у других рецептур.

Установленные закономерности влияния условий технологического процесса на структуру и физико-механические свойства образцов материала на основе биополимера ПГБ, пригодного для изготовления медицинских изделий, дают возможность эффективно управлять качеством нетканых полотен. В зависимости от назначения и области применения можно получить материал с различными значениями пористости, проницаемости, а также с различными физико-механическими свойствами за счет создания определенной геометрии волокон в слое нетканого материала. Именно архитектура в объеме волокон существенно сказывается на скорости биодеградации и биорезорбции в живом организме, определяет эффективность применения материала в изделии медицинского назначения предназначенного для контакта с тканями живого организма.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, номер проекта 20–33–70095.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Xie G., Wang Y., Han X., Gong Y., Wang J. et al. // Ind. Eng. Chem. Res., 2016, V. 55. № 26. P. 7116.
[2] Филатов Ю.Н. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс). Под ред. В.Н. Кириченко. М.: Нефть и газ, 1997. С. 231
[3] Zhang C.X., Yuan X.Y., Wu L.L., Han Y., Sheng J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. // Eur. Poly. J., 2005, V. 41. № 3. P. 423–32.
[4] Deitzel J.M., Beck Tan N.C., Kleinmeyer J.D., Rehrmann J., Tevault D., Reneker D., Sendijarevic I., McHugh A. Generation of Polymer Nanofibers Through Electrospinning. // Army Research Laboratory Technical Report, 1999.
[5] Карпова С.Г., и др.. Смесевые композиции ультратонких волокон Поли-3-гидроксибутирата с комплексом цинк–порфирин. Структура и свойства. // Химическая физика, 2019, Т. 38. № 3. С. 37–51.
[6] Тюбаева П.М., и др. Изменение физико-механических свойств нетканых материалов медицинского назначения на основе полигидроксибутирата под действием озона. // Биохимическая физика, 2018. С. 169–171.

УДК 576.523

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ НА ПОДВЕРГНУТОЙ АНОДНОМУ ОКИСЛЕНИЮ ПОВЕРХНОСТИ СПЛАВА ВТ1–0, ИСПОЛЬЗУЕМОГО В ИМПЛАНТОЛОГИИ

Ф.А. Фадеев[1], Ю.Я. Хруник[2,3], С.В. Беликов[2], Д.В. Седнева-Луговец[1], О.В. Губаева[1], А.А. Попов[2]

[1] Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия
[2] Уральский Федеральный Университет им. Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия
[3] Институт высокотемпературной электрохимии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Сплавы на основе титана широко применяются в имплантологии, в частности, при изготовлении зубных протезов, при эндопротезировании суставов, в пластической хирургии. Одной из главных проблем имплантологии является биосовместимость материала, определяющая характер его взаимодействия с окружающими тканями. Для повышения уровня остеоинтеграции применяют различные способы обработки имплантата, улучшающие контакт клеток с его поверхностью, в том числе посредством придания ей рельефности. Анодирование титанового имплантата сопровождается отложением на его поверхности нанотрубок из диоксида титана, увеличивающих площадь поверхности и повышающих ее гидрофильность. Благодаря этому повышается уровень адгезии и пролиферации остеобластов на поверхности имплантата, что способствует его остеоинтеграции [1].

Фибробласты также оказывают влияние на приживление имплантата. Эти клетки мигрируют в область имплантации и участвуют в процессах регенерации, формируя грануляционную ткань. При этом избыточная активность фибробластов может сопровождаться формированием вокруг имплантата коллагеновой капсулы, что может привести к его подвижности и, как следствие, к отторжению.

Нами была проведена оценка секреторной и пролиферативной активности фибробластов человека на поверхности необработанного и анодированного по оригинальной методике [2] титана с поверхностью из нанотрубок диаметром 40 нм.

Фибробласты были выделены из кожи донора после получения информированного согласия. Для экспериментов использовали диски из титановой фольги (сплав ВТ1–0) с анодированной или с необработанной поверхностью. Адгезивную активность фибробластов на исследуемых поверхностях оценивали по показателям площади адгезировавшихся клеток и по их количеству через 6, 12 и 24 часа после посева. При оценке скорости пролиферации учет числа клеток осуществляли через 3, 5, 7 и 9 дней после посева, одновременно оценивая количество секретируемых компонентов в надосадочной жидкости и количество фибриллярного коллагена, отложенного на поверхности. Концентрацию секретируемых клетками компонентов в ростовой среде (интерлейкин-6, интерлейкин-8, проколлаген I типа) оценивали методом ИФА и пересчитывали на 1 тыс. клеток. Количество коллагена на поверхности материала оценивали окрашиванием сириусом красным с последующим вымыванием связавшегося красителя. Достоверных различий в количестве и площади адгезировавшихся клеток выявлено не было. Пролиферативная активность клеток на обоих типах поверхности также была сравнимой: различия в плотности клеточного монослоя были достоверными лишь на 7 сутки (~ в 1,5 раза выше на титане с необработанной поверхностью). Существенных различий в количестве откладываемого на поверхности фибриллярного коллагена, а также в количестве секретируемых проколлагена I и интерлейкина-6 также не выявлено. В то же время, на нанотрубчатой поверхности количество секретируемого фибробластами интерлейкина-8 было в 2–4 раза выше, чем на титане с необработанной поверхностью. Проведенные эксперименты показали отсутствие существенного влияния оксидной пленки, структурированной в форме нанотрубок, на адгезию, пролиферацию фибробластов, а также на секрецию ими проколлагена I и на отложение коллагена на поверхности титана. Полученные результаты позволяют предполагать, что анодирование поверхности титанового имплантата не будет дополнительно стимулировать образование коллагеновой капсулы вокруг него. В то же время, повышенный уровень секреции фибробластами на нанотрубчатой поверхности интерлейкина-8, являющегося стимулятором миграции нейтрофилов, может являться причиной усиления воспалительной реакции. Повышенная концентрация данного хемокина ассоциирована с высоким риском отторжения имплантата [3], и потому может рассматриваться как фактор риска при использовании имплантационных материалов с анодированной поверхностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Das K., Bose S., Bandyopadhyay A. TiO2 nanotubes on Ti: Influence of nanoscale morphology on bone cell–materials interaction. J. Biomed. Mat. Res. A. 2009; 90(1): 225–37.
2. Фадеев Ф.А. и др. Адгезия фибробластов кожи человека на модифицированном для применения в имплантологии титане с анодированным нанотрубчатым покрытием. Доклады академии наук. 2019; 486(1): 123–6.
3. Quabius E.S., et al. Dental implants stimulate expression of Interleukin-8 and its receptor in human blood – An in vitro approach. J Biomed. Mater. Res. Part B. 2012; 100B:1283–8.

УДК 66.047

СОЗДАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ДАРПИНОВ

Е.В. Коновалова[1], А.А. Шульга[1], Т.И. Лукьянова[1], А.Г. Воробьева[2], В.М. Толмачев[2], С.М. Деев[1]

[1] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

[2] Уппсальский университет, Уппсала, Швеция

Все молекулярные визуальные диагностики основаны на использовании меченных адресных соединений, которые накапливаются преимущественно в местах повышенного содержания узнаваемых ими молекул-мишеней, а также прибора, который способен детектировать эти сайты с высокой точностью. Принимая во внимание требования, предъявляемые к современным диагностическим методам, касающиеся чувствительности, глубины проникновения в ткани организма детектируемого сигнала, а также пространственное разрешение, можно с уверенностью констатировать, что методы, основанные на использовании радионуклидов, будут доминировать в клинике в предстоящие годы.

Для целей молекулярной диагностики желательно, чтобы адресные радиофармпрепараты как можно быстрее находили свою мишень, а не связавшиеся молекулы быстро покидали организм. Тем самым упрощается процесс получения высококонтрастного изображения опухоли и сокращается время диагностики. Обычно такое поведение характерно для сравнительно небольших молекул. Большинству этих требований удовлетворяют дарпины (DARPins, Designed Ankyrin Repeat proteins), которые являются искусственными белками, происходящими от природных анкиринов (ankyrin) [1]. Дарпины состоят, по меньшей мере, из трех повторяющихся мотивов. Обычно таких мотивов четыре или пять. Первый (N-capping repeat) и последний (C-capping repeat) повторы обогащены гидрофильными аминокислотными остатками для лучшей растворимости белка [2]. Благодаря небольшому размеру (прим. 15 кДа), простоте структуры и высокой специфичности к онкомаркерам, дарпины очень популярны в научном мире, где успешно используются в качестве адресных агентов. Немаловажным является то, что эти белки, в отличие от иммуноглобулинов, можно получать в больших количествах в бактериях. Их структуру легко модифицировать, приспосабливая под конкретные нужды. Например, присоединять различные таги, расширяющие функционал белка. Имея небольшие размеры, дарпины легче проникают в опухолевые ткани и быстрее выводятся из организма через почки, нежели иммуноглобулины. Поэтому эти белки предпочтительны при создании диагностикумов [3].

В данной работе были получены модифицированные адресные белки на основе дарпинов G3 и EC1 для их мечения короткоживущими изотопами, главными компонентами терапии и диагностики рака. Функционал дарпинов G3 и EC1 был расширен за счет добавления аминокислотных последовательностей, способных связывать короткоживущие радиоизотопы ионов металлов, на N- и / или C-конец молекулы. В качестве таких последовательностей выступали HHHHHH, HEHEHE, а также последовательности, содержащие единичные цистеины EEEC и GGGC.

Дарпин G3 – это каркасный белок длиной 136 а.о., избирательный и высоко аффинный лиганд рецептора эпидермального фактора роста второго типа HER2/neu (Kd, 90pM) [4]. Раковые опухоли с повышенным содержанием этого рецептора, характеризуются быстрым темпом роста и повышенным риском появления отдаленных метастазов. Стратификация пациентов по HER2/neu позволяет выбрать правильный способ лечения [5]. Дарпин EC1 – каркасный белок длиной 167 а.о., избирательный и высоко аффинный лиганд онкомаркера epCAM (Kd, 68pM), молекулы клеточной адгезии эпителия. Многие опухоли (рак стволовых клеток, ретинобластома) имеют повышенное содержание epCAM. Изотопно-меченный дарпин EC1 может использоваться в качестве высокоэффективного диагностирующего средства для локализации раковых опухолей, а также для отбраковки раковых стволовых клеток [6].

Гены дарпинов G3 и EC1 были собраны при помощи ПЦР из химически синтезированных олигонуклеотидов, содержащих частично комплементарные последовательности. Короткие последовательности на N- и / или C-концы дарпинов были добавлены при помощи ПЦР [7]. Для наработки дарпинов использовали клетки бактериального штамма E. coli BL21(DE3).

Бактерии, трансформированные соответствующими плазмидами, выращивали в автоиндукционных средах [8]. Рекомбинантные штаммы дарпинов характеризовались высокими выходами целевого продукта – не менее 100 мг с литра. Был разработан метод выделения и очистки белков, включающий металлохелатную аффинную и анионообменную хроматографии. При разработке метода очистки дарпинов особое внимание уделялось таким параметрам, как содержание в белковых препаратах эндотоксинов и хозяйских белков.

Правильная молекулярная масса и гомогенность препаратов мутантных дарпинов была подтверждена при помощи тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. Кинетику связывания мутантных дарпинов измеряли при помощи прибора LigandTracer [9]. Было установлено, что на мембранах клеток имело место быть два типа взаимодействия – низкоаффинное (в наномолярном диапазоне) и высокоаффинное (в пикомолярном диапазоне) [10].

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (научные проекты № 18–34–00899 мол_а и № 18–29–08030мк

ЛИТЕРАТУРА

[1] C.N. Jost, et al. (2013) Structure, 21: 1979–1991
[2] M.T. Stumpp, P. Amstutz (2007) Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 10:153–159.
[3] G.L. Sennhauser, et al. (2006) PLoS Biol. 5:106–113.
[4] N.E. Hynes, H.A. Lane (2005) Nat. Rev. Cancer. 5:341–354
[5] H.K. Binz, et al. (2004) Nat. Biotechnol. 22:575–582
[6] N.A. Stefan, et al. (2011) Mol. Biol. 413(4):826–843
[7] M.P. Malakhov, et al., J. Struct. Funct. Genomics, 5: 75–86
[8] F.W. Studier (2005) Protein Expression Purif., 41: 207–234
[9] S.M. Deyev, et al. (2019) Mol. Pharm., 16: 995–1008
[10– A.G. Vorobyeva, et al. (2018) Contrast Media Mol. Imaging, 6930425

УДК 616–006–092.9

ИНГИБИРОВАНИЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SET7/9 ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК К ГЕНОТОКСИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

А.А. Дакс, О.М. Семенов, А.В. Жарова, О.Ю. Шувалов, О.А. Федорова, А.В. Петухов, Н.А. Барлев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Метилтрансфераза Set7/9, продукт гена setd7, представляет собой фермент, осуществляющий метилирование гистонов III и H3, а также множества транскрипционных факторов, таких как p53, E2F1, YAP, эстрогеновый рецептор ER, NFκB и других. На основании того, что субстраты Set7/9 играют ключевую роль в регуляции клеточного ответа на генотоксический стресс, клеточного цикла и апоптоза, мы предположили и доказали, что при ингибировании экспрессии или активности Set7/9 повышается чувствительность раковых клеток к ДНК-повреждающим агентам доксорубицину и метилнитрозогуанидину (МНГ). Доксорубицин является ингибитором топоизомеразы II и приводит к активации систем репарации двуцепочечных разрывов, таких как гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов, в то время как МНГ обладает сходным с цисплатином действием, вызывая точечные модификации пуриновых оснований и активацию ошибочно спаренных нуклеотидов. Соответственно, Set7/9 опосредует устойчивость клеток к основным генотоксическим химиопрепаратам. В ходе наших исследований мы обнаружили, что повышенный уровень данного белка наблюдается при наиболее агрессивных формах рака легкого и рака молочной железы. Так, мы продемонстрировали, что для немелкоклеточного рака легкого с мутациями в гене KRAS, а также для HER2-позитивного подтипа рака молочной железы характерно повышение экспрессии Set7/9. Кроме того мы показали, что подавление экспрессии Set7/9, а также применение специфического ингибитора данного фермента (R) – PFI-2 повышает чувствительность клеток рака легкого и рака молочной железы к генотоксическим препаратам доксорубицину и цисплатину, широко применяемым в онкологии в настоящее время. Таким образом, метилтрансфераза может рассматриваться в качестве онкобиомаркера и перспективной мишени для разработки противораковой терапии.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19–75–10059.

УДК 577.151.35, 577.113.4:577.2.08

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

В.Е. Кузнецова, В.Е. Шершов, Р.А. Мифтахов, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

В настоящее время ДНК аптамеры рассматриваются в качестве не дорогой синтетической альтернативы антителам. Модифицированные ДНК аптамеры представляют собой перспективный класс высоко-аффинных лигандов, устойчивых к биодеградации. Разработаны многочисленные методы селекции как природных, так модифицированных аптамеров, в том числе клеточный SELEX. Этот вариант селекции позволяет выявить высокоаффинные варианты аптамеров, которые связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток. Одним из этапов процедуры селекции аптамеров является стадия амплификации, которая предполагает субстратную совместимость химически модифицированного 2'-дезокси-нуклеозид-5'-трифосфата с используемой ДНК-полимеразой. С синтетической не модифицированной комбинаторной библиотеки ДНК в реакции достраивания праймера (primer extension) получали библиотеку модифицированных ДНК при полной замене dTTP на производное дезоксиуридинтрифосфата, модифицированное фрагментом фенилуксусной кислоты, присоединенной по 5-положению транс-алкеновым линкером.

Синтетическая не модифицированная комбинаторная библиотека ДНК представляет собой набор одноцепочечных ДНК (5′-GCT CCT GAC GAT CGA CGA CCG AG-(N)40-GCA ACT GCA GCA TGC TTC GCA TT-3′), каждая из которых фланкирована стандартными последовательностями для связывания праймеров при амплификации, а центральная часть – вырождена. Праймер маркирован по 5'-концу флуоресцентным красителем Cy3. Реакцию достраивания праймера проводили в реакционной смеси (100 мкл), содержащей 6 мкМ праймер, 4 мкМ матрицу, dCTP, dATP, dGTP и модифицированный dUTP в концентрации 200 мкМ и ДНК-полимеразу в количестве 10 ед. акт. в рекомендованном производителем буфере при температуре 72 °С в течение 1 ч. Как видно из рисунка, при использовании Vent (exo-), Deep Vent (exo-) и Bst ДНК-полимераз обнаруживается смесь ДНК-продуктов различной длины, в то время как применение Kod XL и Pwo ДНК-полимераз приводит к преимущественному образованию ДНК-продукта нужной длины (рисунок 1).

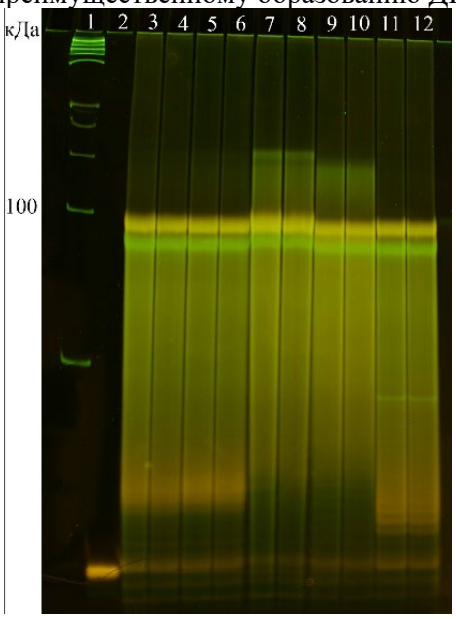


Рисунок 1 – Электрофоретическое разделение продуктов реакции удлинения праймера (primer extension) при использовании различных ДНК-полимераз (в двух повторах). Дорожка: 1 – маркер длин; 2 – праймер; 3, 4 – Vent (exo-) ДНК-полимераза; 5, 6 – Deep Vent (exo-) ДНК-полимераза; 7, 8 – Kod XL ДНК-полимераза; 9, 10 – Pwo ДНК-полимераза; 11, 12 – Bst ДНК-полимераза. Денатурирующий полиакриламидный гель (15 %-й, соотношение акриламид–бисакриламид, 19 : 1), 60 °С. Изображение геля получали путем инкубирования геля в растворе красителя Sybr Green.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ МК № 18–29–09151\18.

УДК 577.113.4

ИССЛЕДОВАНИЕ СУБСТРАТНЫХ СВОЙСТВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ DU И DC С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ УДЛИНЕНИЯ ПРАЙМЕРА (РЕХ) И ПЦР

О.С. Волкова, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов, С.А. Лапа

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Нуклеиновые кислоты (НК), являясь хранителями генетической информации, способны проявлять свойства моноклональных антител (аптамеры), катализировать реакции (рибозимы и дезоксирибозимы) и действовать как молекулярные переключатели (аптазимы). Включение модифицированных нуклеотидов в цепь НК позволяет повысить их разнообразие, изменить физико-химические свойства модифицированных аптамеров и аптазимов [1], что играет важную роль для их применения в медицинской диагностике и в качестве индивидуальных терапевтических средств. Одним из способов получения модифицированных НК является ферментативный. Главной проблемой в случае использования данного метода является субстратная совместимость модифицированных нуклеотидов с используемыми полимеразами.

Нами проведено изучение субстратных свойств производных dU и dC, имеющих модификации по С5 положению пиримидинового цикла (рис. 1). Проводили РЕХ и ПЦР при одновременном встраивании mod-dU и mod-dC в реакционную смесь с полным замещением природных dT и dC. Так же создавали пары dU+dC. В работе использовали ДНК-полимеразы Taq- и Vent (exo-). Для РЕХ использовали синтетические матрицы, которые содержали участки для включения 1, 2, 3 и 4 модифицированных нуклеотидов последовательно. Для ПЦР использовали фрагмент гена rpoB Mycobacterium tuberculosis [2].

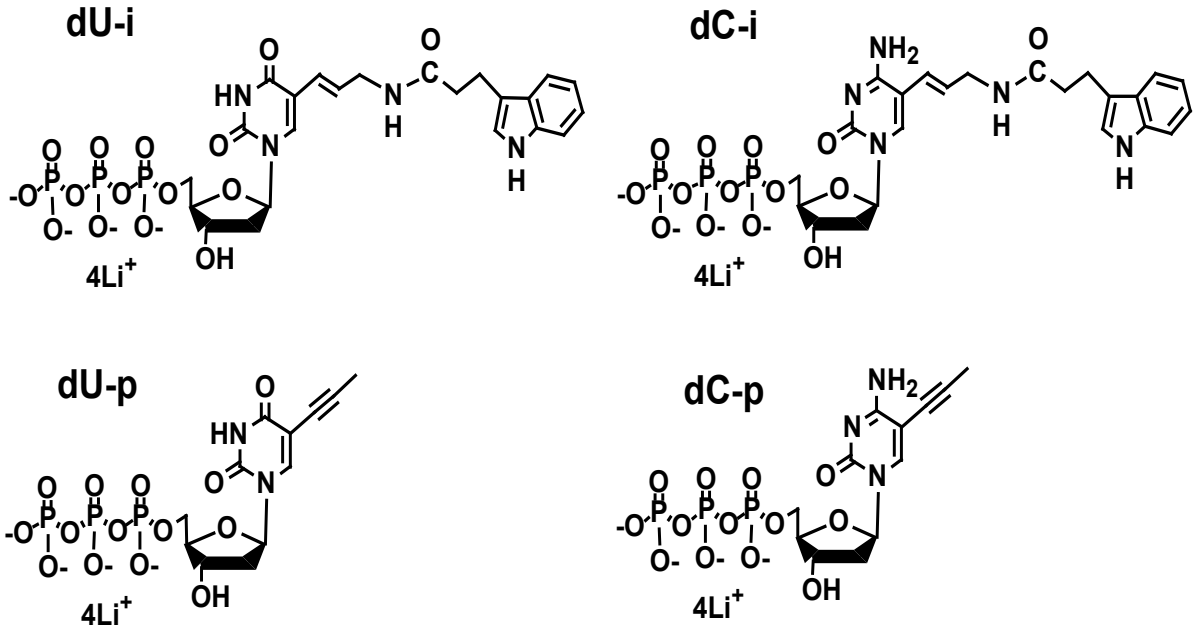


Рисунок 1. Модифицированные трифосфаты дезоксиуридина (слева) и дезоксицитидина (справа). dU-i и dC-i – производные, содержащие на пиримидиновых основаниях фрагменты 3-индолпропионовой кислоты, dU-p и dC-p – производные, содержащие на пиримидиновых основаниях 5-пропинил

При проведении РЕХ с Taq-полимеразой лучшими субстратами оказались mod-dU (выход продукта около 30 %). В случае же использования mod-dC наблюдалась слабая субстратная совместимость, причем использование mod-dC с индольным заместителем приводило либо к получению неполноразмерных продуктов, либо к полному их отсутствию. Для mod-dC с 5-пропинил-производным выход продукта составил около 30 %. В парах dU+dC выход реакции не превышал 10 %.

При использовании Vent (exo-) – полимеразы полноразмерные продукты получали во всех случаях. Результаты РЕХ с Vent (exo-) – полимеразой приведены на рис. 2а.

Taq-полимераза в ПЦР проявила способность встраивать некоторые модифицированные dU, но mod-dC оказались для нее более сложными субстратами, что коррелирует с результатами PEX данного исследования, нашими предыдущими работами и литературными данными.

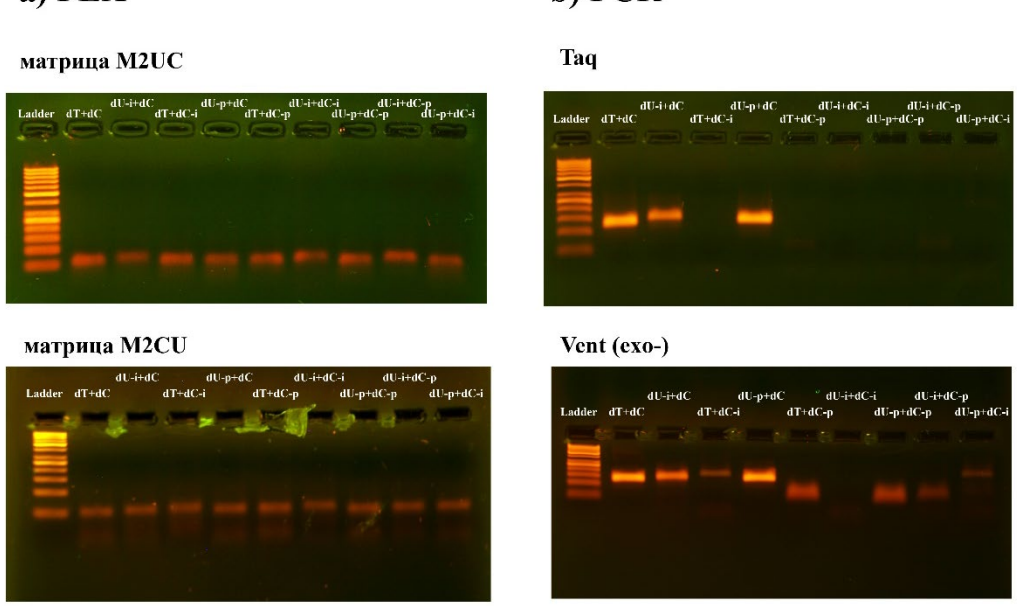


Рисунок 2. a). PEX с применением модельных матричных олигонуклеотидов M2UC и M2CU (длина 49 нт). На примере Vent (exo-) ДНК-полимеразы. Ladder – маркер длин продуктов GeneRuler 50bp; пары использованных dNTP указаны над соответствующими лунками геля. Сверху каждой фореграммы указана использованная синтетическая матрица b). ПЦР с применением бактериальной ДНК-матрицы. Сверху каждой фореграммы указана использованная полимераза. Окрашивание бромистым этидием.

Использование Vent (exo-) – полимеразы в ПЦР позволило воспроизводимо получать полноразмерные продукты, одновременно содержащие mod-dU и mod-dC. Наиболее сложным субстратом оказался dC-i (индол-модифицированный), в комбинации с mod-dU получали большое количество неполноразмерных продуктов, но при индивидуальном применении удавалось получить полнорамерный продукт. Результаты ПЦР приведены на рис. 2b.

Таким образом, показано, что Vent (exo-) – полимераза применима для проведения одновременного встраивания разноименных модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов в растущую цепь ДНК. Изучение особенностей одновременного встраивания в растущую цепь ДНК разноименных модифицированных нуклеотидов способствует получению аптамеров и аптазимов нового поколения для применения в диагностике и терапии.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19–04–01217.

ЛИТЕРАТУРА

Gawande B.N., Rohloff J.C., Carter J.D., von Carlowitz I., Zhang C., Schneider D.J., Janjic N. Selection of DNA aptamers with two modified bases // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2017. – № 114. – с. 2898–2903.

Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A. Identification of Rifampin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis Strains by Hybridization, PCR, and Ligase Detection Reaction on Oligonucleotide Microchips // J. Clin. Microbiol. – 2001. – № 39. – с. 2531–2540.

УДК 576.526

АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ. ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ НА АДГЕЗИОННЫЕ КОНТАКТЫ МЕЖДУ ЭНДОТЕЛИОЦИТАМИ И НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ

С.З. Бобык

ННГУ, Нижний Новгород, Россия,

В нормальных условиях воспаление – это здоровый и адаптивный процесс, который одновременно борется с инфекцией и участвует в восстановлении повреждений тканей. Однако ксенобиотики могут вызывать длительные, тяжелые и неадекватные воспалительные реакции, которые могу приводить к тяжелому течению болезней и различных токсических состояний [1].

Во время воспаления происходит рекрутирование нейтрофилов, которое инициируется переходными взаимодействиями между селектинами на эндотелиоцитах и их лигандами на нейтрофилах, приводящими к связыванию и свертыванию нейтрофилов [2].

Целью данного исследования являлась оценка влияния бактерий на силу адгезионных контактов между эндотелиоцитами и нейтрофилами посредством режима спектроскопии АСМ.

Материалом служили нейтрофилы, выделенные из цельной крови здоровых доноров обоих полов, стабилизированной ЭДТА. Клетки высаживали на $Si_3 N_4$ зонд, предварительно обработанный поли-L-лизином. Эндотелиальные клетки человека линии EA.hy 926 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ глутамина, НАТ во влажной атмосфере 5 % CO_2 [3]. Штамм S. aureus 2879 М выращивали (37 °С, 24 ч) в мясо-пептонном агаре. Оптическая плотность бактериальной суспензии была доведена до 0,75 (λ = 670 нм), что соответствовало $1 \cdot 10^9$ кл/мл. Статистическую обработку проводили в программе Origin 8.0.

В результате проведения FS-спектроскопии получили силовые кривые. На них четко визуализируются скачки («ступени»). Каждая ступень соответствует разрыву связей между лигандами нейтрофила, фиксированного на поверхности зонда и рецепторами эндотелиальной клетки, адгезированной на чашке Петри.

Результат взаимодействия нейтрофила с эндотелиальной клеткой оценивали по двум параметрам: сила адгезии – как разница между начальным уровнем и максимальной точкой «ступени» и работа адгезии, которую оценивали как площадь под кривой отвода, по формуле:

$A_{ад} = \int Fdl$, где F – сила взаимодействия клеток, Н; l – расстояние между клетками, м.

Внесение штамма стафилококка вызывало выраженную и однонаправленную реакцию снижения силы адгезии между нейтрофилами и эндотелиоцитами. Работа адгезии статистически значимо снижалась. Ослабление взаимодействия между нейтрофилом и эндотелиоцитом при кондиционировании золотистым стафилококком обусловлено изменениями экспрессионного профиля клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда, № 16–14–10179.

ЛИТЕРАТУРА

1. Villeneuve, D.L., Landesmann, B., Allavena, P., Ashley, N., Bal-Price, A., Corsini, E., et al. Representing the Process of Inflammation as Key Events in Adverse Outcome Pathways // Toxicological Sciences. 2018. V. 163(2). P. 346–352.
2. Phillipson, M., & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation // Nature Medicine. 2011. V. 17(11). P. 1381–1390.
3. Старикова Э.А., Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Фрейдлин И.С., Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю. Изменения поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток под влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов // Медицинская иммунология. 2003. V. 5(1–2). P. 39–48

УДК 547.565.2 : 577.158: 544.478.41

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА МАГНИТООТДЕЛЯЕМЫХ ОКСИДАХ

А.М. Сульман, О.В. Гребенникова, Е.М. Михайлова, М.Г. Сульман, В.Г. Матвеева

Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

Иммобилизованные ферменты широко используются в синтезах различных сложных лекарственных препаратов в мягких условиях без образования токсичных побочных продуктов. Кроме того, иммобилизованные ферменты применяются для очистки загрязненной воды, воздуха и почвы путем эффективного удаления стойких органических загрязнителей, диагностики заболеваний и коррекции различных генетических заболеваний из-за отсутствия метаболических ферментов [1–8]. Оксидоредуктазы (К.Ф. – 1) – это большой класс ферментов, которые катализируют биологические реакции окисления / восстановления. Промышленно значимым иммобилизованным ферментом является глюкозооксидаза (GOx, (К.Ф. 1.1.3.4), семейство оксигеназ, подкласс оксидоредуктаз). GOx используется в биосенсорах для определения содержания глюкозы. Иммобилизация GOx позволяет разработать биосенсоры глюкозы с улучшенной прочностью, чувствительностью, линейными диапазонами и пределами обнаружения. Другое важное применение иммобилизованного GOx – это биокатализатор для получения D-глюконовой кислоты (схема 1). D-глюконовая кислота и ее соли используются в качестве лекарств, пищевых добавок и добавок, компонентов чистящих средств и т. д. [9–12].

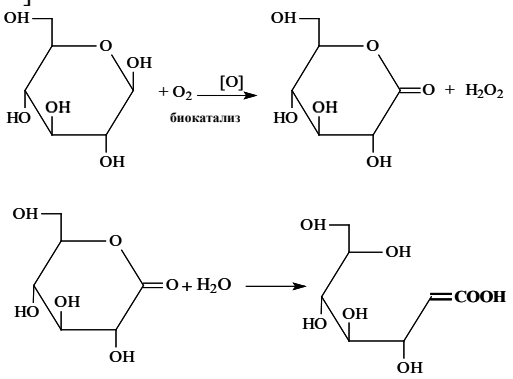


Схема 1. Схема окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты

Известно, что пористый диоксид кремния является отличным носителем для иммобилизации ферментов благодаря большой площади поверхности и легкой функционализации с использованием коммерчески доступных силанов. Существует множество примеров иммобилизации GOx и других ферментов семейства оксидоредуктаз (например, пероксидазы). на носителях на основе диоксида кремния. В последнее время, исследователи используют магнитные наночастицы (МНЧ), для создания магнитоотделяемых катализаторов, легкость выделения которых из реакционной смеси позволяет экономить энергию (исключается стадия очистки от катализатора) и создавать более дешевые и чистые целевые продукты [13–16].

Магнитный диоксид кремния, синтезированный в результате образования наночастиц оксида железа в порах SiO_2, был описан ранее как носитель магнитоотделяемых катализаторов. [17–21]. В этой статье представлены данные об иммобилизации GOx на мезопористых магнитных оксидах кремния (Fe_3O_4-SiO_2) и алюминия (Fe_3O_4-Al_2O_3). Магнитные оксиды модифицировались (3-аминопропил) триэтоксисиланом (APTES) для размещения аминогрупп на поверхности, а затем с помощью сшивающего агента (глутарового альдегида, GA) осуществлялось ковалентное связывание GOx. Оба магнитных носителя были синтезированы путем формирования наночастиц магнетита (Fe_3O_4) в результате термического разложения нитрата железа в порах мезопористых оксидов.

Для синтеза магнитного диоксида кремния (Fe_3O_4-SiO_2) использовался коммерческий мезопористый SiO_2 с порами 6 нм, в которых формировались МНЧ. Типичное изображение ПЭМ и рентгенограмма Fe_3O_4-SiO_2 представлены на рисунке 1.

Изображение ПЭМ четко отображает присутствие МНЧ в порах диоксида кремния. Рентгенограмма показывает широкий пик (22), который относится к диоксиду кремния, а также ряд более острых брэгговских пиков, интенсивность и положение которых типичны для шпинели (магнетит).

Для синтеза магнитного оксида алюминия использовался аналогичный подход с использованием коммерчески доступного мезопористого оксида алюминия. Для эффективного формирования МНЧ оксид алюминия предварительно обрабатывался 0,1 М раствором NH_4 OH в течение 12 часов. Изображение ПЭМ и рентгенограмма магнитного оксида алюминия представлены на рисунке 2.

Изображение ПЭМ показывает пористый носитель с небольшими наночастицами магнетита внутри пор. Рентгенограмма сложна из-за кристалличности исходного оксида алюминия. Он показывает набор пиков (обозначены черным), которые относятся к γ-Al_2 O_3, а также несколько (частично перекрывающихся) пиков, которые можно отнести к шпинели Fe_3 O_4.

Для ковалентного присоединения GOx, магнитный носитель первоначально функционализировали аминогруппами с использованием APTES, затем проводили реакцию с GA, после чего было взаимодействие альдегидных групп GA с аминогруппами GOx (схема 2).

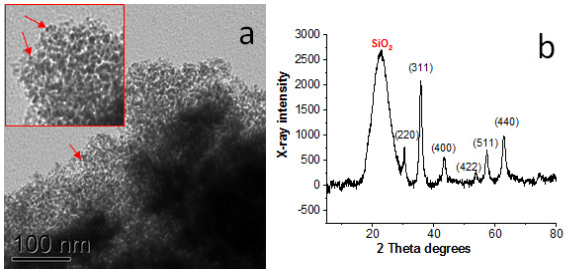


Рисунок 1-ПЭМ-изображение (a) и рентгенограмма (b) Fe3 O4-SiO2. На вставке в (a) показано изображение с большим увеличением. Красные стрелки указывают на наночастицы оксида железа

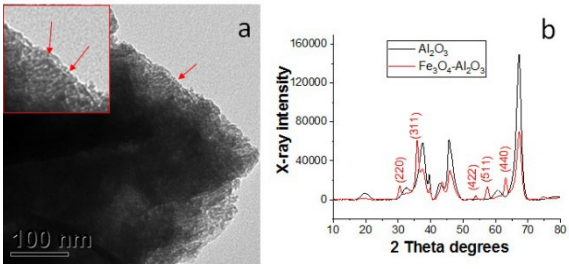


Рисунок 2-ПЭМ-изображение (a) и рентгенограмма (b) Fe3 O4-Al2 O3. На вставке в (a) показано изображение с большим увеличением. Красные стрелки указывают на наночастицы оксида железа

Активность иммобилизованного фермента исследовалась в процессе окисления D-глюкозы. Для характеристики поведения биокатализатора использовался параметр относительной активности, который определяли по формуле: $R = (A_i/A_0)x100$ % ,где A_0 и A_i – активности нативного GOx и иммобилизованного GOx, соответственно.

Все разработанные биокатализаторы были исследованы на окисление D-глюкозы в диапазоне pH 4–8. На рисунке 3 (a) представлена зависимость относительной активности от pH. Для сравнения биокаталитических свойств использовался нативный фермент и GOx, иммобилизованный на исходных (немагнитных) оксидах кремния и алюминия. Зависимость относительной активности для нативного GOx показывает резкий максимум (100 %) при pH 6, тогда как при более высоких и более низких значениях pH относительная активность резко уменьшается. Для всех иммобилизованных биокатализаторов GOx, разработанных в этой работе, относительная активность высока во всем диапазоне pH (рис. 3a). Кроме того, GOx на основе оксида алюминия показывает более низкую относительную активность (82 %), чем GOx на основе оксида кремния (89 %). В случае магнитных носителей, иммобилизованный GOx демонстрирует более высокую относительную активность (90 и 95 % для Fe_3 O_4-Al_2 O_3-GOx и Fe_3 O_4-SiO_2-GOx соответственно). Наилучшая относительная активность 95 % при pH 6 и 7 наблюдалась для Fe_3 O_4-SiO_2-GOx, тогда как нативный GOx в этих условиях показывает только 40 % от активности нативного фермента (100 %).

Влияние температуры на окисление D-глюкозы изучалось в 30–60°C при pH 6 для лучшего сравнения с нативным GOx. Зависимость относительной активности биокатализатора от температуры представлена на рисунке 3 (b). Нативный фермент проявляет максимальную активность при 40° C с последующим резким снижением выхода продукта, что указывает на потерю активности фермента, наиболее вероятную из-за денатурации при более высоких температурах. В случае иммобилизованного GOx, наблюдается более низкая относительная активность на 5–18 % при 40° C (в зависимости от носителя) по сравнению с активностью нативного GOx. С повышением температуры до 50 °C относительная активность значительно увеличивается (на 8–30 %) для иммобилизованного фермента по сравнению с нативным. При 60°C (самая высокая температура, используемая для тестирования биокатализатора в этой работе), нативный фермент теряет около 60 % каталитической активности, в то время как активность биокатализаторовна основе иммобилизованнного GOx снижается только на 4–18 %, в зависимости от типа носителя. Опять же, лучшие результаты были получены для Fe_3 O_4-SiO_2-GOx с относительной активностью 95 % в температурном диапазоне 35–50°C.

Для проверки стабильности магнитоотделяемых биокатализаторов при многократном использовании, проводилось десять последовательных экспериментов окисления D-глюкозы в оптимальных условиях (pH 6 и 40 °C). Биокатализатор был отделен с помощью редкоземельного магнита в течение 30–40 секунд после каждой каталитической реакции и снова использовался в следующем эксперименте. Результаты исследования показали, что для исходного оксида алюминия и диоксида кремния относительная активность уменьшается на 30 и 24 % соответственно после десяти последовательных экспериментов, что согласуется с данными литературы. Для биокатализаторов на основе магнитного оксида алюминия и диоксида кремния относительная активность уменьшается только на 13 и 11 % соответственно после того же количества последовательных реакций, демонстрируя гораздо более высокую стабильность катализатора.

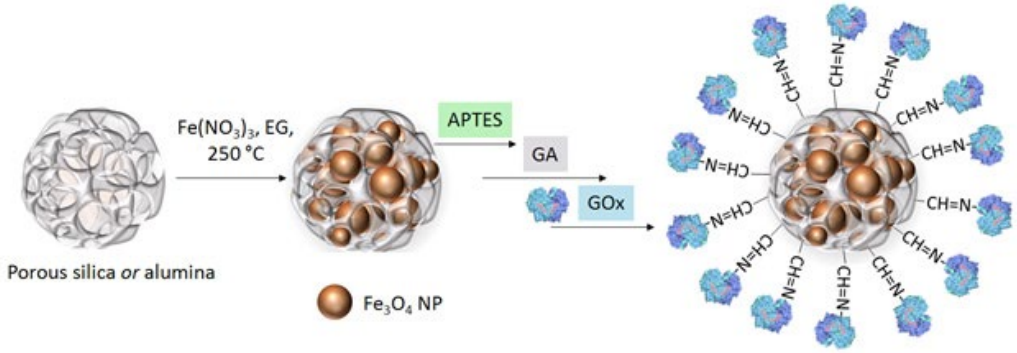


Схема 2-Схема синтеза биокатализатора

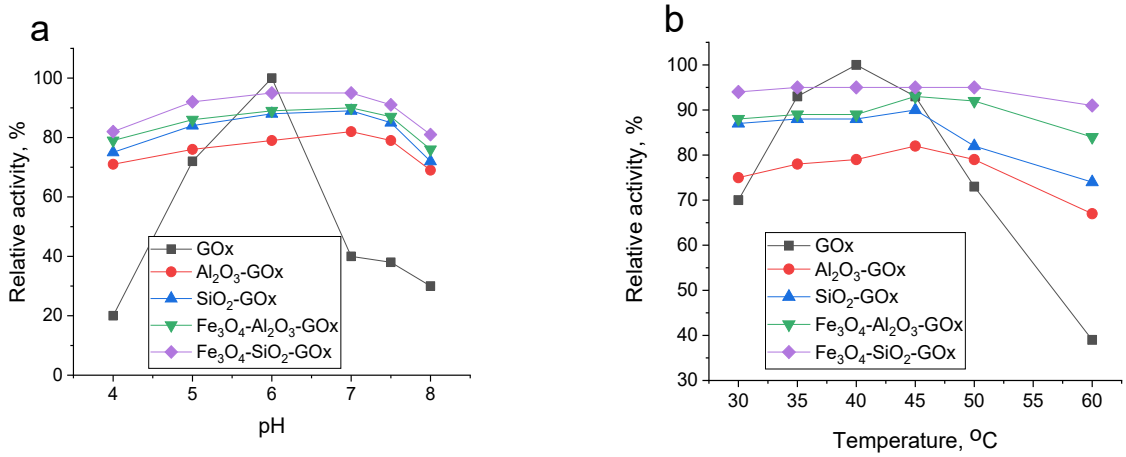


Рисунок 3, Влияние pH (a) и температуры (b) на относительную активность нативного и иммобилизованного GOx.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны высокоэффективные магнитоотделяемые биокатализаторы, путем иммобилизации GOx на мезопористые магнитные оксиды кремния и алюминия. Биокатализаторы были охарактеризованы с использованием физико-химических методов и исследованы в окислении D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. Разработанные биокатализаторы показали более высокую каталитическую активность при окислении D-глюкозы до D-глюконовой кислоты по сравнению с GOx, иммобилизованным на исходном оксиде алюминия и диоксиде кремния.

Оценивая влияние компонентов носителя на каталитические свойства, показана корреляция между структурой и свойствами носителя и выявляние синергизма от комбинации GOx и оксида железа в биокатализаторе. Высокая стабильность Fe_3 O_4-SiO_2-GOx и легкость отделения от реакционного раствора в сочетании с исключительной активностью в широком диапазоне pH и температуры делает этот катализатор перспективным для практического применения.

Авторы благодарят Российский фонд фундаментальных исследований (грант № 18–08–00468) и Российский научный фонд (проект № 19–79–00134) за финансовую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

Pal, P.; Kumar, R.; Banerjee, S., Manufacture of Gluconic Acid: A ReviewTowards Process Intensification for Green Production. Chem. Eng. Process. 2016, 104, 160–171.
Mohamad, N.R.; Marzuki, N.H.; Buang, N.A.; Huyop, F.; Wahab, R.A., Review; Agriculture and Environmental Biotechnology. An Overview of Technologies for Immobilization of Enzymes and Surface Analysis Techniques for Immobilized Enzymes. Biotechnol. Biotec. Eq. 2015, 29, 205–220.
Ahmad, R.; Sardar, M., Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. Biochem. Anal. Biochem. 2015, 4, 1–8.
Chen, S.; Wen, L.; Svec, F.; Tan, T.; Lv, Y., Magnetic metal–organic frameworks as scaffolds for spatial co-location and positional assembly of multi-enzyme systems enabling enhanced cascade biocatalysis. RSC Adv. 2017, 7, 21205–21213.
Sulman, E.M.; Matveeva, V.G.; Bronstein, L.M., Design of biocatalysts for efficient catalytic processes. Current Opinion in Chemical Engineering. 2019, 26, 1–8.
Drout, R.J.; Robison, L.; Farha, O.K. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal-organic frameworks, Coord. Chem. Rev. 2019, 381, 151–160.
Sheldon, R.A.; Brady, D. The limits to biocatalysis: pushing the envelope. Chem. Commun. 2018, 54, 6088–6104.
Bilal, M.; Asgher, M.; Shah, S.Z.H.; Iqbal, H.M.N. Engineering enzyme-coupled hybrid nanoflowers: The quest for optimum performance to meet biocatalytic challenges and opportunities. Int. J. Biol. Macromol. 2019, 135, 677–690.
Тихонов, Б.Б.; Сульман, Э.М.; Стадольникова, П.Ю.; Сульман, А.М.; Голикова, Е.П.; Сидоров, А.И.; Матвеева, В.Г. Катализ в промышленности, 2019, 19(1), 59–72.
Vranish, J.N.; Ancona, M.G.; Walper, S.A.; Medintz, I.L. Pursuing the Promise of Enzymatic Enhancement with Nanoparticle Assemblies. Langmuir, 2018, 34, 2901–2925.
Devine, P.N.; Howard, R.M.; Kumar, R.; Thompson, M.P.; Matthew D.; Truppo, M.D.; Turner, N.J. Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development. Nature Rev. Chem., 2018, 2, 409–421.
Kobayashi, Y.; Kohara, K.; Kiuchi, Y.; Onoda, H.; Shoji, O.; Yamaguchi, H. Control of microenvironment around enzymes by hydrogels. Chem. Commun., 2020, 56, 6723–6726.
Gao, L.; Fan, K.; Yan, X., Iron Oxide Nanozyme: A Multifunctional Enzyme Mimetic for Biomedical Applications. Theranostics 2017, 7, 3207–3227.
Uc-Cayetano, E.G.; Ordóñez, L.C.; Cauich-Rodríguez, J.V.; Avilés, F., Enhancement of Electrochemical Glucose Sensing by Using Multiwall Carbon Nanotubes decorated with Iron Oxide Nanoparticles. Int. J. Electrochem. Sci. 2016, 11, 6356 – 6369.
Krishnan, B.P.; Prieto-Lopez, L.O.; Hoefgen, S.; Xue, L.; Wang, S.; Valiante, V.; Cui, J. Thermomagneto-Responsive Smart Biocatalysts for Malonyl-Coenzyme A Synthesis, ACS Appl. Mater. Interfaces, 2020, 12, 20982–20990.
Shen, H.; Song, J.; Zhou, Z.; Li, M.; Zhang, R.; Su, P.; Yang, Y. DNA-Directed Immobilized Enzymes on Recoverable Magnetic Nanoparticles Shielded in Nucleotide Coordinated Polymers, Ind. Eng. Chem. Res., 2019, 58, 8585–8596.
Hilterhaus, L.; Liese, A.; Kettling, U.; Antranikian, G., Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2016; p 429.
Wang, Y.; Nor, Y.A.; Song, H.; Yang, Y.; Xu, C.; Yu, M.; Yu, C., Small-sized and large-pore dendritic mesoporous silica nanoparticles enhance antimicrobial enzyme delivery. J. Mater. Chem. B 2016, 4, 2646–2653.
Gonzalez-Delgado, I.; Segura, Y.; Martin, A.; Lopez-Munoz, M. – J.; Morales, G., β-galactosidase covalent immobilization over large-pore mesoporous silica supports for the production of high galacto-oligosaccharides (GOS). Microporous Mesoporous Mater. 2018, 257, 51–61.
Santos, K.M.A.; Albuquerque, E.M.; Innocenti, G.; Borges, L.E.P.; Sievers, C.; Fraga, M.A., The Role of Bronsted and Water-Tolerant Lewis Acid Sites in the Cascade Aqueous-Phase Reaction of Triose to Lactic Acid. ChemCatChem 2019,11, 3054–3063.
Liu, J.; He, Y.; Yan, L.; Li, K.; Zhang, C.; Xiang, H.; Wen, X.; Li, Y., Nano-sized ZrO2 derived from metal-organic frameworks and their catalytic performance for aromatic synthesis from syngas. Catal. Sci. Technol. 2019,9, 2982–2992.

УДК 66.047

ПОИСК ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

С.А. Кондратьева, А.И. Кузьмич, В.В. Плешкан, Д.А. Дидыч, О.А. Безбородова

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Рак остается одной из основных причин смертности в мире. Для разработки генотерапевтических противоопухолевых препаратов крайне важными являются исследования, проводимые на животных моделях. Такие модели должны быть максимально релевантны, в частности позволять многократное внутриопухолевое введение. С целью получения опухолевых моделей invivo, предназначенных для оценки специфического (противоопухолевого) действия генотерапевтических препаратов были изучены характеристики карциномы толстой кишки CT26, саркомы S37, аденокарциномы поджелудочной железы Pan02. При проведении исследований была оценена динамика роста первичного опухолевого узла в зависимости от прививочной дозы, латентный период выхода опухолевого узла, наличие или отсутствие метастатического поражения лимфатических узлов, внутренних органов и тканей, клеточный состав опухоли, а также средняя продолжительность жизни животных с перевиваемой опухолью.

Было показано, что наиболее адекватной прививочной дозой опухолевой модели саркомы S37 является 1,0 x 10^6 клеток, для модели аденокарциномы поджелудочной железы Pan02 – 1,0 x 10^6 клеток для карциномы толстой кишки CT26 – от 0,5x10^6 до 1,0x10^6 клеток на мышь при подкожной инокуляции опухолевых клеток на боковую поверхность тела.

При гистологическом исследовании установлено, что подкожные опухоли CT26, извлеченные у животных на 15 сутки роста представляют собой солидные, хорошо кровоснабжаемые образования со слабо выраженной стромой опухоли. В опухолях в центре узелков выявлены небольшие фокусы некроза и воспаления. Опухоль Pan02 прорастает в подкожно-жировую клетчатку, вся ткань опухоли инфильтрована клетками воспаления, в отдельных участках наблюдались скопления эритроцитов. При анализе срезов ткани опухоли S37 очагов воспаления или некроза выявлено не было, опухоль солидная и однородная.

Также у животных с опухолевой моделью саркомы S37 было отмечено наличие увеличенных лимфоузлов, преимущественно прилегающих к первичному очагу, расположенных в паховой и подмышечной области. Метастатический характер поражения увеличенных лимфоузлов был подтвержден гистологически.

Анализ клеточного состава опухолей проводили, определяя количество фибробластоподобных (Pdgfrb+) и лейкоцитарных (Cd45+) клеток. Для этого готовили опухолевые суспензии и с помощью цитофлуориметрического анализа с антителами на стромальный компонент (anti-Pdgfrb-PE) и на иммунные клетки Cd45 (anti-Cd45-PerCP-Cy5.5) оценивали представленность этих фракций в образцах опухолей. Доля раковых клеток в суспензиях CT26 составила 59,4 %, 62,7 % в суспензии S37, 1,6 % в суспензии Pan02; доля иммунных клеток в суспензиях CT26 составила 32,1 %, 37,3 % в S37, 73,4 % в Pan02. Можно предположить, что роль иммунного компонента в опухоли Pan02 более значительна, чем в опухолях CT26 и S37.

Средняя продолжительность жизни (СПЖ) животного с опухолью составила 33±3 суток для модели саркомы S37, 30±3 для модели аденокарциномы поджелудочной железы Pan02, 30±5 и 29±8 суток в зависимости от прививочной дозы (0,5x10^6 и 1,0x10^6 клеток на мышь, соответственно) для модели карциномы толстой кишки CT26.

Все три изученных модели солидных опухолей различались скоростью роста, метастатическим потенциалом и клеточным составом опухолей. Продолжительность жизни животных с привитыми опухолями составила не менее 29 дней, поэтому все исследуемые модели принципиально могут быть использованы для оценки фармакологического действия и спектра противоопухолевой активности генотерапевтических препаратов.

УДК 577.25

ПЕПТИДНЫЙ МОДУЛЯТОР КАНАЛА TRPV1 УМЕНЬШАЕТ БОЛЬ И ВОСПАЛЕНИЕ В МОДЕЛЯХ АРТРИТА У КРЫС

***Я.А. Андреев*[1,2]**

[1] *Институт Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия*
[2] *Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*

Артрит – это воспалительное заболевание, характеризующееся деградацией суставной поверхности и продолжающейся болью и гиперчувствительностью. Наиболее распространенными типами артрита являются остеоартрит (OA), поражающий более 13 % взрослого населения, и ревматоидный артрит (РА), аутоиммунное заболевание, поражающее более 1 % населения мира. OA характеризуется прогрессирующей дегенерацией суставного хряща, приводящей к модификации околосуставной кости, синовиального сустава и отрегулированных элементов ткани. Этиология OA сложна: инициация и развитие OA запускаются провоспалительными цитокинами, такими как интерлейкины, в частности IL-1β и фактор некроза опухолей TNF-α, а также генерируемыми активными формами кислорода (ROS). Традиционное фармацевтическое лечение пациентов с OA направлено на облегчение боли и обычно основано на применении кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), таких как ибупрофен и диклофенак, ингибирующих как изоформы циклооксигеназы ЦОГ-1 и ЦОГ-2, так и мелоксикам, блокирующий предпочтительно COX-2, таким образом, влияя на превращение арахидоновой кислоты в простагландины. RA является хроническим и системным аутоиммунным заболеванием, поражающим несколько симметричных суставов, включая синовиальный, суставной хрящ и кость. Он характеризуется прогрессирующей инвалидностью и множественными системными осложнениями, такими как сердечно-сосудистые, легочные, психологические и скелетные расстройства, приводящие к преждевременной смерти. Этиология RA сложна и включает продукцию аутоантигенов, таких как ревматоидный фактор (RF) и антитела против цитруллинированных белков (ACPA), B-клетками синовиальной ткани во время пре-RA стадии и инфильтрацию синовия мононуклеарными клетками (активированные T- и B-клетки) и макрофаги, высвобождающие цитокины, хемокины, молекулы адгезии, MMP и тканевые ингибиторы TIMP металлопротеиназ, разновидностей кислорода и азота во время воспалительной стадии.

Очевидно, что дополнительные фармацевтические мишени должны быть использованы для лечения OA и РА, и одной из наиболее важных таких целей является канал TRPV1. Роль TRPV1 в ноцицепции и воспалении суставов при артрите была доказана рядом исследований. У мышей, нокаутированных по TRPV1, наблюдалось ослабленное развитие RA, вызванного адъювантом Фрйнда (CFA). Повышенная экспрессия TRPV1 как на уровне мРНК, так и на уровне белка наблюдалась в синовиальных фибробластах и хондроцитах от пациентов с артритом. Активация TRPV1 усиливает экспрессию провоспалительных цитокинов IL-6, IL-1β и TNF-α и участвовать в создании ROS. С другой стороны, провоспалительные медиаторы и АФК активируют TRPV1 и повышают экспрессию TRPV1, что указывает на то, что TRPV1 участвует в передаче сигналов положительной обратной связи в процессе воспаления суставов. Наконец, применение агонистов TRPV1 и некоторых блокаторов уменьшает боль и воспаление суставов, что также указывают на важную роль TRPV1 при артрите.

Полипептид АРНС3, выделенный из морского анемоны Heteractis crispa, модулирует активность TRPV1, обладает анальгетическими и противовоспалительными свойствами и снижает температуру тела. Эффективность АРНС3 изучали на моделях экспериментального артрита, вызванного полным адъювантом Фрейнда (CFA) и моноиодид ацетатом (MIA), у крыс. Артрит, индуцированный CFA, считается моделью ревматоидного артрита, в то время как артрит, вызванный MIA, считается стандартом для моделирования разрушения суставов при остеоартрите. Эффекты АРСН3 в дозах 0,01 и 0,1 мг / кг сравнивали с мелоксикамом (золотой стандарт для лечения артрита), ибупрофеном (наиболее распространенным нестероидным противовоспалительным препаратом) и контрольная группа получала физиологический раствор. АРНС3 (0,1 мг / кг) значительно уменьшил симптомы экспериментального артрита и улучшил восстановление суставов. Он почти полностью восстановил способность опираться на пораженную лапу и полностью нормализовал механическую чувствительность. Синовиальную жидкость собирали из воспаленного коленного сустава для анализа уровня воспалительных цитокинов. АРНС3 значительно снижал выработку IL1b, возвращая его к норме на 15-й день исследования. Гистологический анализ выявил значительное улучшение динамики остеоартрита в воспаленных коленных суставах после лечения АРНС3 по сравнению с контрольными группами. Наблюдалось уменьшение, как воспалительной инфильтрации синовиальной оболочки, так и синовиальной гиперплазии. Более того, в конце наблюдения не было обнаружено увеличения деструктивных изменений в эпифизарном суставном хряще бедра и голени. Следовательно, модуляцию TRPV1 полипептидом АРНС3 можно рассматривать как эффективную терапию остеоартрита и ревматоидного артрита

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16–15–00167).

УДК 57.033

ИЗУЧЕНИЕ J-АГРЕГАТОВ ПРИРОДНОГО АНТИОКСИДАНТА АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ

Е.А. Куликов[1], И.С. Куликова[1], Е.В. Вязов[2], Р.Г. Гончарик[2], А.А. Селищева[1]

1 Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский институт», Москва, Россия
2 Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Астаксантин является природным каротиноидом, обладающий антиоксидантной и противовоспалительной активностью, он способен проникать через гематоэнцефалический барьер, сетчатку глаза и встраиваться в клеточную мембрану. Известно, что каротиноиды могут образовывать в смесях воды и органических растворителей (спирта или ацетона) большие агрегаты, которые получили название супрамолекулярных комплексов [1]. Как правило, эти сведения относятся к свободной форме каротиноидов и только для зеаксантина показано образование J-агрегатов из его моно- и диэфиров [2]. Агрегация каротиноидов происходит не только в искусственных системах, но является важным фактором правильного функционирования фотосинтетического аппарата [3]. Изучение агрегации каротиноидов представляет большой интерес, поскольку в зависимости от типа агрегации меняются фотохимические свойства каротиноидов, что может также влиять на их стабильность и биодоступность.

В многочисленных работах для **свободной** (неэтерифицированной) формы астаксантина (рис. 1), как и для других каротиноидов, были получены два типа комплексов (H и J), которые образуются в разных условиях [4–6]. В литературе практически отсутствуют сведения об образовании агрегатов эфирами астаксантина, содержание которых в стрессированной клетке H. pluvialis достигает 80 % от массы всех каротиноидов [7, 8].

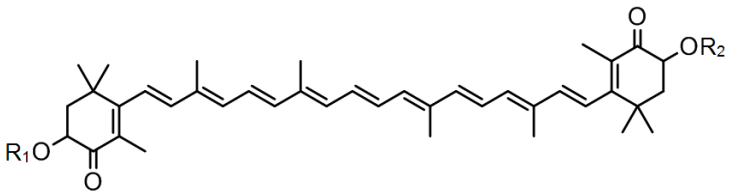


Рисунок 1. Структурные формулы свободной формы (R1 = H, R2 = H), его моно- (R1 – остаток жирной кислоты, R2 = H) и диэфиров астаксантина (R1 и R2 – остаток жирной кислоты).

Цель работы – оптимизация условий получения агрегатов эфиров астаксантина и изучение их физико-химических характеристик (размера, спектров поглощения).

В растворах с высоким содержанием воды астаксантин образует H-агрегаты с гипсохромным смещением спектра поглощения (в область меньших длин волн), молекулы располагаются «голова-к-голове» параллельно друг другу в так называемой «card packed» форме и удерживаются водородными связями. Напротив, J-агрегаты образуются в полярном растворителе с меньшим количеством воды и вызывают батохромный сдвиг спектра поглощения (в область больших длин волн). В таком случае молекулы располагаются «голова-к-хвосту», поэтому принято считать, что водородные связи не участвуют в образовании J-агрегатов [9].

В данной работе сначала астаксантин или его эфиры растворяли в смеси ТГФ: MeOH (1:3), в которой образовывались мономеры с максимумом поглощения 480 нм, а затем добавляли воду. При дальнейшей инкубации интенсивность поглощения на 480 нм снижалась, а максимум спектра поглощения каротиноида смещался в область 510–610 нм, что согласно литературным данным [5] говорит об образовании J-агрегатов (рис. 2). В случае свободного астаксантина и его моноэфиров за 1 час происходило смещение на 60–70 нм в область больших длин волн (рис 2А, 2Б). Аналогичный сдвиг для диэфиров наблюдался спустя сутки инкубации.

При изучении влияния содержания ТГФ на скорость агрегации установили, что увеличение доли ТГФ в водно-спиртовой смеси ТГФ: MeOH: 0,7M NaCl с (1:3:10) до (2:3:10) приводило к росту скорости агрегации астаксантина и его эфиров.

Увеличение ионной силы раствора приводило к ускорению агрегации. Так при инкубации свободного астаксантина при 25 °C в смеси ТГФ: MeOH: 0,7M NaCl смещение максимума поглощения происходит значительно быстрее по сравнению с водно-спиртовой смесью, не содержащей соли (данные не приводятся). Агрегация диэфиров без добавления соли не протекает вовсе.

Увеличение концентрации NaCl с 0.7 до 1.45 М привело к тому, что максимум поглощения свободного астаксантина мгновенно сместился в область 520 нм и 550 нм, моноэфиров – в область 495нм и 520 нм, а раствор диэфиров стал мутным. В течение суток все три раствора полностью обесцветились, астаксантин выпал в осадок либо образовал масляную фазу (как в случае этерифицированных форм).

Таким образом, увеличение ионной силы значительно ускоряет процесс агрегации, но в то же время ухудшает стабильность полученных растворов, что приводит к быстрому падению оптической плотности.

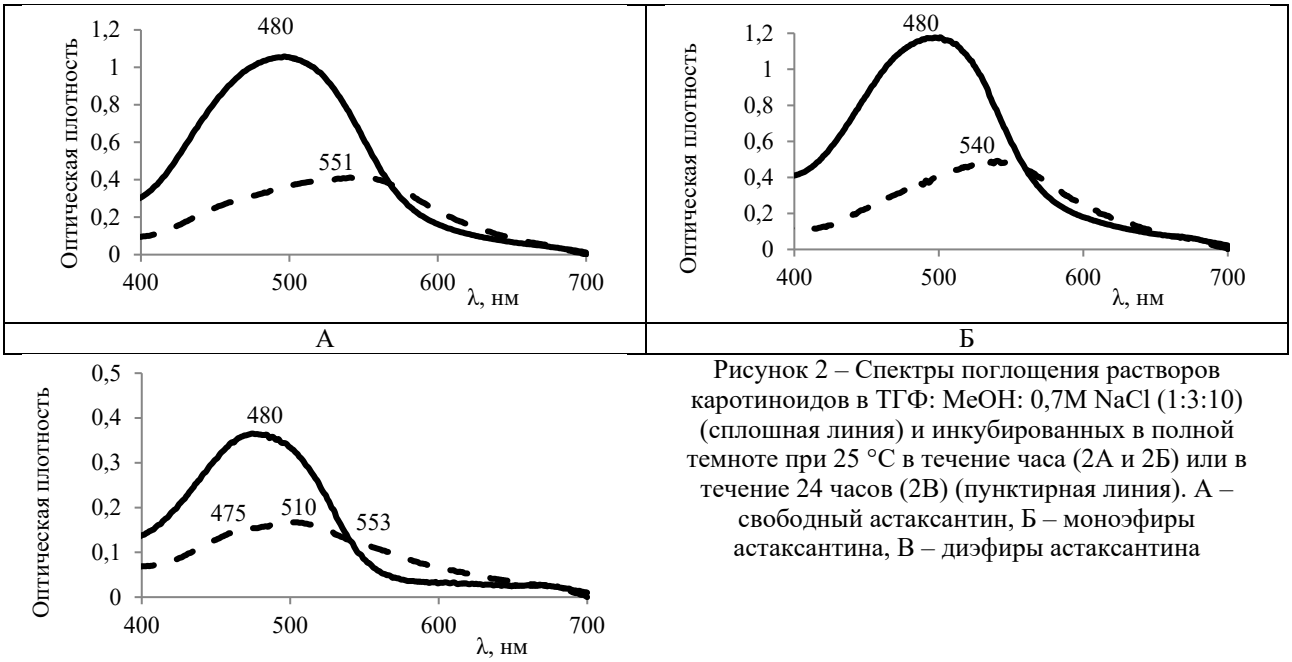


Рисунок 2 – Спектры поглощения растворов каротиноидов в ТГФ: МеОН: 0,7М NaCl (1:3:10) (сплошная линия) и инкубированных в полной темноте при 25 °С в течение часа (2А и 2Б) или в течение 24 часов (2В) (пунктирная линия). А – свободный астаксантин, Б – моноэфиры астаксантина, В – диэфиры астаксантина

Определение размера образовавшихся в растворе J-агрегатов астаксантина и его эфиров после инкубации в среде ТГФ: МеОН: 0,7М NaCl (1:3:10) в течение 24 часов при 4 °С проводилось методом динамического рассеяния света. Данные, полученные этим методом, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Размер J-агрегатов астаксантина и его эфиров при инкубации в среде ТГФ: МеОН: 0,7М NaCl (1:3:10) в течение 24 часов и 40 суток при 4 °С.

Форма каротиноида	Размер частиц, нм		Индекс полидисперсности		Разброс	
	24 часа	40 суток	24 часа	40 суток	24 часа	40 суток
Свободный астасантин	400±100	600±200	0,534	0,766	0,569	0,654
Моноэфиры астаксантина	900±100	600±200	0,350	0,474	0,600	0,633
Диэфиры астаксантина	2500±200	Расслоение	0,070	–	0,632	–

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для получения агрегатов эфиров астаксантина в данной работе была впервые использована водная смесь органических растворителей ТГФ: МеОН: H_2O/0,7М NaCl (1:3:10) и оптимизированы условия получения J-агрегатов моно- и диэфиров астаксантина. При изучении динамики их образования методом спектрофотометрии установили, что скорость образования J-агрегатов значительно вырастает при повышении ионной силы среды, что свидетельствует в пользу гидрофобных сил взаимодействия в агрегатах.

Поскольку в клетках присутствует большое количество различных солей, в первую очередь ацетаты и хлориды, которые добавляют для увеличения накопления астаксантина и его эфиров, то можно предположить, что агрегаты также могут образовываться в клетке и оказывать влияние на её фотохимические свойства.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19–54–04003) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19РМ-010)

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang C., Berg C.J., Hsu C.C., et al. Characterization of carotenoid aggregates by steady-state optical spectroscopy. The Journal of Physical Chemistry B. 2012, 116(35), 10617–10630.doi: 10.1021/jp3069514
2. Hempel J., Schädle C.N., Leptihn S., et al. Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2016, 317, 161–174. doi: 10.1016/j.jphotochem.2015.10.024
3. Ruban A.V., Horton P., Young A.J. Aggregation of higher plant xanthophylls: differences in absorption spectra and in the dependency on solvent polarity. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1993, 21(2–3), 229–234. doi:
4. Köpsel C., Möltgen H., Schuch H., et al. Structure investigations on assembled astaxanthin molecules. Journal of molecular structure, 2005, 750(1–3), 109–115. doi: 10.1016/j.molstruc.2005.02.038
5. Giovannetti R., Alibabaei L., Pucciarelli F. Kinetic model for astaxanthin aggregation in water–methanol mixtures. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2009, 73(1), 157–162. doi: 10.1016/j.saa.2009.02.017
6. Buchwald M., Jencks W.P. Optical properties of astaxanthin solutions and aggregates. Biochemistry. 1968, 7(2), 834–843. doi: 10.1021/bi00842a042
7. Denery J.R., Dragull K., Tang C.S., Li Q.X. Pressurized fluid extraction of carotenoids from Haematococcus pluvialis and Dunaliella salina and kavalactones from Piper methysticum. Analytica chimica acta. 2004, 501(2), 175–181. doi: 10.1016/j.aca.2003.09.026
8. Boussiba S., Fan L., Vonshak, A. [36] Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga Haematococcus pluvialis. In Methods in enzymology. 1992, 213, 386–391. doi: 10.1016/0076–6879(92)13140-S
9. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids, vol. 4: natural functions. Basel, Switzerland: Springer Science & Business Media. 2008, 370p.

УДК 576.5

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ КАК ИНСТРУМЕНТ ПОИСКА МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ОПУХОЛИ: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ

Д.А. Дидыч, А.И. Кузьмич, В.В. Плешкан, И.В. Алексеенко, Е.Д. Свердлов

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Опухоль представляет из себя многокомпонентную эволюционирующую систему, состоящую из раковых клеток, клеток микроокружения и внеклеточного матрикса. Поэтому свойства опухоли и ее поведение зависят не только от внутренних особенностей раковых клеток, но и от взаимодействий раковых клеток с микроокружением. Открытие иммунных контрольных точек, обеспечивающих иммунносупрессию в опухоли, свидетельствует о важности межклеточных взаимодействий, в отдельных случаях играющих ключевую роль в существовании опухоли. В связи с этим поиск лиганд-рецепторных взаимодействий между раковыми клетками и другими клетками опухоли является начальным этапом в определении потенциальных мишеней для создания противоопухолевых препаратов. Целью данной работы было на основе данных транскриптомов отдельных опухолевых популяций клеток определить потенциальные лиганд-рецепторные взаимодействия между раковыми клетками, иммунными (CD45+) и не иммунными (Pdgfrb+CD45-) клетками стромы в модельных подкожных опухолях CT26 (колоректальная карцинома) и Pan02 (аденокарцинома поджелудочной железы). На первом этапе путем подкожного введения раковых клеток, стабильно экспрессирующих GFP, были получены опухоли, из которых были приготовлены клеточные суспензии. Опухолевые клетки окрашивали с помощью флуоресцентно меченых антител к общему лейкоцитарному антигену CD45 и к маркеру мезенхимальных клеток Pdgfrb(CD140b) и проводили отбор интересующих популяций клеток с помощью FACS. Из отобранных популяций клеток были выделены образцы тотальных РНК, из которых после удаления рРНК были приготовлены библиотеки кДНК, предназначенные для RNA-seq. Секвенирование проводили на платформе NovaSeq 6000 Illumina. С помощью анализа данных секвенирования были получены транскриптомы популяций раковых клеток, иммунных и не иммунных клеток стромы для обеих исследуемых моделей опухолей. Учитывая клеточную специфичность и уровень экспрессии генов, кодирующих известные лиганды и рецепторы, были определены наиболее выраженные потенциальные межклеточные взаимодействия. В дальнейшем планируется оценить роль отдельных предсказанных взаимодействий в развитии опухолей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17–00–00194 (17–00–00190).

УДК (57.052+57.053+577.25):612.829

МИКРОРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАПИИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ

Л.Н. Гринкевич

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

В связи с увеличением продолжительности жизни населения планеты, ухудшением экологии и значительными стрессовыми нагрузками наблюдается рост заболеваний сопровождающихся когнитивными нарушениями. В связи с этим, актуальнейшим направлением научных исследований становится изучение молекулярных механизмов обучения и долговременной памяти. В последние годы в этой области знаний осуществлен значительный прорыв главным образом, связанный с развитием относительно новой области науки – эпигенетики. Показано, что эпигенетические метки (метилирование ДНК, посттранскрипционные модификации гистонов, или экспрессия определенных микроРНК) определяют какие гены и в каких структурах будут экспрессироваться, в том числе, и в ответ на изменение окружающей среды. Проведенные широкомасштабные исследования показывают что эпигенетические процессы играют и важную роль в формировании долговременной памяти и их дисфункция приводит к различным когнитивным нарушениям [1]. В данном докладе основное внимание будет уделено роли микроРНК в обучении и памяти и потенциальной возможности улучшения когнитивных функций через воздействие на биогенез микроРНК при нейродегенеративных, неврологических и возрастных дисфункциях.

микроРНК это высоко консервативные, небольшие молекулы РНК (22–24 нуклеотида) каждая из которых может регулировать экспрессию сотен генов через репрессию, или деградацию их матричных РНК (мРНК). Таким образом, нарушение регуляции даже одной микроРНК может оказывать значительный системный эффект. Наиболее высок и разнообразен уровень экспрессии микроРНК в ЦНС (уже идентифицированы сотни). В последние годы было показано что этот регуляторный эпигенетический путь активно вовлекается и в формирование долговременной памяти [2]. Причем нарушение биогенеза отдельных микроРНК может являться причиной когнитивных нарушений [3]. Кроме того, микроРНК выходя во внеклеточное пространство могут служить межклеточными коммуникаторами и потенциально биомаркерами для диагностики болезней [4].

С нарушением экспрессии микроРНК связывают развитие таких психоневрологических расстройств как, шизофрения, расстройства аутистического спектра, синдром дефицита внимания, эпилепсия, и синдром Туретта. Наиболее полно в этой связи изучена шизофрения, которая является генетически сложным заболеванием, включающим несколько генов и часто связана с когнитивными нарушениями, в патогенез которых в значительной мере вовлекаются и микроРНК [5]. Так, психиатрический консорциум GWAS по шизофрении (PGC) идентифицировал полиморфизм rs1625579 в гене MIR137, который кодирует микроРНК miR-137, как самую сильную новую ассоциацию с шизофренией что предполагает ее дальнейшее использование в качестве мишени для терапии [5]. Кроме того, данная микроРНК, а также miR-22–3p, miR-92a-3p детектируется в периферической крови, и их комбинация может служить биомаркером для выявления шизофрении [6]. Биоинформационный анализ их мишеней показал, что комбинация miR-22–3p, miR-92a-3p и miR-137 тесно связана с синаптической структурой и функцией, которые играют важную роль в этиологии и патофизиология данного заболевания [6]. Однако, точные профили изменений в miRNA у пациентов с шизофренией и их связь с прогнозом остаются в основном неизвестными, тем не менее выражаются надежды что с дальнейшим накоплением знаний и развитием технологий редактирования геномов эти сложности удастся преодолеть [7]. Так, благодаря использованию CRISPR-опосредованных технологий были обнаружены синергетические эффекты распространенных вариантов риска шизофрении [8], что может быть важным для разработки способов терапии.

Важнейшую роль микроРНК играют и в нейродегенеративных патологиях, таких как болезни Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона которые в значительной мере ассоциируются с когнитивными дисфункциями. К настоящему времени уже идентифицированы десятки микроРНК и сотни их генов мишеней в той или иной мере связанными с нейродегенеративными заболеваниями [9 3]. И что важно, обнаружены микроРНК (miR-9–5p, miR-21–5p, семейство miR-29, miR-132–3p, miR-124–3p, miR-146a-5p, miR -155–5p и miR-223–3p), которые чаще всего дисрегулировались при данных патологиях, и вовлеченных в механизмы нейродегенерации.

Полагают, что полученные данные будут способствовать познанию молекулярных механизмов, лежащих в основе нейродегенерации с дальнейшей возможностью ее протекции [9]. В настоящее время также разрабатываются подходы с применением микроРНК для лечения болезни Хантингтона направленные на подавление мутантного гена хантингтина (HTT) [10]. При этом, генная терапия разрабатывается на основе однократного введения пациенту аденоассоциированного вирусного (AAV) вектора, содержащего предшественник микроРНК, с целью уменьшения общей трансляции HTT в клетках-мишенях.

В связи с моногенностью болезни Хантингтона ожидается прогресс в его лечении в достаточно обозримое время. В настоящее время проводятся доклинические исследования на животных и клеточных моделях.

Кроме того, идентифицирован также целый ряд микроРНК связанных со старением и развитием старческой деменции. Более того, часть этих микроРНК циркулирует во внеклеточных жидкостях и потенциально способна служить биомаркерами для диагностики и прогнозирования когнитивных нарушений [11, 12]. С другой стороны, появились исследования, свидетельствующие о том, что изменение экспрессии некоторых микроРНК при старении могут выполнять и адаптивные функции, в частности miR-29 [13].

В связи со сложностью устройства ЦНС, многообразием клеточных элементов с уникальным спектром микроРНК в них, функции микроРНК изучены еще очень фрагментарно, что затрудняет решение прикладных задач, связанных с воздействием на микроРНК. Оптимизм в данной области определяется появлением технологий редактирования, активации и репрессии генов с применением системы CRISPR/Cas9. CRISPR/Cas9-технологии созданы для разрезания ДНК и удаления или вставки нужных генов в нужном месте. Для чего используется система редактирующая иммунитет у бактерий. Точность доставки обеспечивает молекула РНК-гида, комплементарная нужному участку ДНК. Белок Cas9 обеспечивает разрез ДНК. Более того CRISPR/Cas9 система была приспособлена для эпигенетической регуляции экспрессии генов [14]. Создан каталитически неактивный белок Cas9, не способный делать разрез, но способный доставлять на определенный участок геномной ДНК регуляторные белки, либо ферменты регулирующие эпигенетические модификации ДНК и гистонов. Точность доставки также обеспечивает молекула РНК-гида. Таким образом любой ген, в том числе и кодирующий микроРНК предшественники, может быть обратимо активирован или репрессирован по замыслу экспериментатора [14]. Найдены и аналоги белка Cas9, способные расщеплять вместо ДНК молекулы РНК, что позволяет избирательно выключать любые микроРНК и соответственно изучать их функции, либо манипулировать их содержанием с целью терапии [15, 16].

В последние годы, разработаны также системы CRISPR/Cas9 позволяющие проводить редактирование генома в конкретной клеточной популяции, не затрагивая другие органы и ткани, что особенно важно для использования CRISPR-Cas9 с целью изучения механизмов функционирование ЦНС, или для регуляции экспрессии генов, дисфункция которых наблюдается при когнитивных нарушениях [17, 18]. Причем в этих технологиях использованы данные о дифференциально экспрессирующихся микроРНК в различных клетках и тканях, что позволяет создать специфичный для нужного типа клеток переключатель. Таким образом в ближайшем будущем нас могут ожидать удивительные открытия как в области молекулярных механизмов формирования ДП, так и в разработке подходов к лечению заболеваний, связанных с когнитивными нарушениями.

С другой стороны, накапливается все больше данных о том, что когнитивные процессы, в том числе нарушенные в старости, или вызванные нейродегенеративными и психиатрическими заболеваниями можно улучшить через интенсификацию познавательных процессов, тонкий ручной труд или физические упражнения. Все эти занятия улучшают эпигенетические процессы, в том числе связанные с функционированием микроРНК, вовлекаемые в формирование долговременной памяти и протектирующие нейроны от гибели. Так показано, что применение обогащенной среды (сочетание умственных и физических упражнений) нормализует биогенез микроРНК-miR-134 и соответственно улучшает формирование ДП нарушенное стрессом [19]. Применение обогащенной среды также способно улучшить память в старости, потенциально, через увеличение биогенеза кластера miR-183/96/182, тесно связанного с формированием долговременной памяти в гиппокампе [20], или через индукцию экспрессию miR-137 ассоциированную с нейрогенезом у взрослых [21]. Таким образом, сочетание умственных и физических упражнений и терапии направленной на нормализацию эпигенетического ландшафта, способны улучшить качество жизни через протекцию когнитивных нарушений.

Высокая консервативность микроРНК, позволяет успешно использовать модели обучения на животных, обладающих простыми нервными системами для изучения функций miRNA в механизмах пластичности. С этой целью успешно применяются несколько видов животных в том числе и моллюски, ЦНС которых содержит значительное количество гигантских нейронов с хорошо идентифицированными функциями [22]. В течение многих лет в качестве модели обучения мы используем выработку условных оборонительных рефлексов у моллюска Helix. Нами было показано, что при обучении у Helix, как и у позвоночных животных, происходят значительные изменения эпигенетических модификаций гистонов [24, 25]. Важную роль в обучении и долговременной памяти играют и микроРНК. Нами показано, что нарушение образования зрелых микроРНК путем введения Poly-L-lysine hydrobromide (PLL) – ингибитора активности фермента Dicer, значительно нарушает формирование долговременной памяти у этого животного. [26].

Для дальнейшего изучения функций микроРНК в формировании механизмов пластичности нами совместно с Институтом цитологии и генетики СО РАН впервые осуществлено секвенирование miRNAиз ЦНС Helix с использованием метода miRNA-seq и биоинформатического анализа и показано наличие большого количества высоко-консервативных miRNA принимающих участие в когнитивных процессах животных и человека. Данные представлены в NCBI Sequence Read Archive (SRA) [27].

Таким образом, разработка различных моделей обучения с применением разных видов животных, использование различных моделей с когнитивными нарушениями, применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и новейших технологий редактирования генома и эпигенома позволяет надеяться на прогресс в сложнейшей области исследований по выяснению механизмов когнитивных функций и способов их восстановления в случае нарушения.

Работа поддержана программой фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 63).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kim S., et al.. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. Exp Mol Med. 2017; 49(1):e281.
2 .Hu Z., Li Z. miRNAs in synapse development and synaptic plasticity. Curr Opin Neurobiol. 2017; 45:24–31.
3. Wu Y.Y.,.Functional roles and networks of non-coding RNAs in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. J Biomed Sci. 2020; 27(1):49.
4. Smith A.C.W., Kenny P.J. MicroRNAs regulate synaptic plasticity underlying drug addiction. Genes Brain Behav. 2018; 17(3):e12424.
5. Liu YP, Meng JH, Wu X, Xu FL, Xia X, Zhang XC, Liu Y, Yao J, Wang BJ. Rs1625579 polymorphism in the MIR137 gene is associated with the risk of schizophrenia: updated meta-analysis. Neurosci Lett. 2019; 713:134535.
6 .Ma J, et al.Psychiatry Res. Identification of miR-22–3p, miR-92a-3p, and miR-137 in peripheral blood as biomarker for schizophrenia. 2018; 265:70–76.
7. Cao T., Zhen X.C. Dysregulation of miRNA and its potential therapeutic application in schizophrenia. CNS Neurosci Ther. 2018; 24(7):586–597.
8. Schrode N, et al. Synergistic effects of common schizophrenia risk variants. Nat Genet. 2019 Oct; 51(10):1475–1485.
9. Juźwik CA, et al. microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. Prog Neurobiol. 2019; 182:101664.
10. Miniarikova J, Evers MM, Konstantinova P. Translation of MicroRNA-Based Huntingtin-Lowering Therapies from Preclinical Studies to the Clinic. Mol Ther. 2018; 26(4):947–962.
11. Kumar S, Vijayan M, Bhatti JS, Reddy PH. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017; 146:47–94.
12. Paul S., Reyes P.R., Garza B.S., Sharma A. MicroRNAs and Child Neuropsychiatric Disorders: A Brief Review. Neurochem Res. 2020; 45(2):232–240.
13. Ripa R, et al.. MicroRNA miR-29 controls a compensatory response to limit neuronal iron accumulation during adult life and aging. BMC Biol. 2017; 15(1):9.
14. Cano-Rodriguez D, Rots MG.Epigenetic Editing: On the Verge of Reprogramming Gene Expression at Will. Curr Genet Med Rep. 2016; 4(4):170–179.
15. Aquino-Jarquin G. Emerging Role of CRISPR/Cas9 Technology for MicroRNAs Editing in Cancer Research. Cancer Res. 2017; 77(24):6812–6817.
16. Zhou J, et al. CRISPR-Cas9 Based Genome Editing Reveals New Insights into MicroRNA Function and Regulation in Rice. Front Plant Sci. 2017; 8:1598.
17. Hirosawa M., et al.Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch. // Nucleic Acids Res. 2017; 45(13):e118. doi: 10.1093/nar/gkx309.
18. Hoffmann M.D., et al.. Cell-specific CRISPR-Cas9 activation by microRNA-dependent expression of anti-CRISPR protein // Nucleic Acids Res. 2019; 47(13):e75.
19. Shen J., et al.The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus. J Affect Disord. 2019; 248:81–90.
20. Jawaid A., et al. Memory decline and its reversal in aging and neurodegeneration involve miR-183/96/182 biogenesis. Mol Neurobiol. 2019; 56(5):3451–3462.
21. Jessop P., Toledo-Rodriguez M. Hippocampal TET1 and TET2 Expression and DNA Hydroxymethylation Are Affected by Physical Exercise in Aged Mice. Front Cell Dev Biol. 2018; 6:45.
22. Kandel E. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. Mol. Brain. 2012; 5 (14): 1–12.
23. Гринкевич Л.Н. Эпигенетика и формирование долговременной памяти. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2012; 98(5):553 – 574.
24. Danilova AB, et al. Histone H3 Acetylation is Asymmetrically Induced Upon Learning in Identified Neurons of the Food Aversion Network in the Mollusk Helix Lucorum. Front Behav Neurosci. 2010; 4:180.
25. Danilova AB, et al.Inability of juvenile snails for long-term memory formation depends on acetylation status of histone H3 and can be improved by NaB treatment. PLoS ONE. 2012; 7(7):e41828.
26. Гринкевич Л.Н. Влияние введения ПОЛИ-L-ЛИЗИНА на формирование долговременной памяти у моллюска Helix // Медицинский академический журнал, 2019; 19(4):87–92.
27. Vasiliev GV, et al. Sequencing of Helix lucorum central nervous system small RNAs. NCBI Sequence Read Archive (SRA) SRP136226. 2018.

УДК [677.047.6.042.62:577.15]:623.459.6

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПРИДАНИЯ ИМ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ ОТ ДЕЙСТВИЯ ТОКСИКАНТОВ

И.В. Лягин, О.В. Маслова, О.В. Сенько, Н.А. Степанов, А. Асланлы, Е.Н. Ефременко

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Идея функционализации волокон и волокнистых материалов ферментами и / или нанообъектами не нова, и исследования в данной области проводятся уже длительное время (в частности, при разработке самоочищающихся материалов и др.). Тем не менее, современный уровень знаний позволяет реализовать многие давно известные подходы на качественно новом уровне. Так, в качестве объектов для внедрения инноваций могут выступать сами волокнистые материалы (например, нановолокна [1], металлоорганические каркасные структуры [2] и т. д.), так и препаративная форма самих ферментов. В последнем случае принципиально могут быть задействованы самые разнообразные наноформуляции ферментов и, в частности, фермент-полиэлектролитные комплексы [3]. В этом случае искусственное увеличение размеров биологически-активного катализатора может способствовать более эффективному его удерживанию в матрице волокна или волокнистого материала без необходимости его ковалентной пришивки к такому носителю.

В ходе данной работы был исследован процесс функционализации различных органических волокнистых материалов ферментом – гексагистидин-содержащей органофосфатгидролазой (His_6-OPH), эффективно катализирующей гидролитическую детоксификацию опасных фосфорорганических токсикантов [4] и микотоксинов [5]. Максимальная активность фермента сохранялась при использовании материалов, содержащих в своём составе не более 80 % вискозного волокна, и среды с pH 7–7,5. В отсутствие ковалентной сшивки His_6-OPH с волокнистым материалом фермент, ожидаемо, довольно быстро вымывался из него. Так что остаточная активность на втором и последующем цикле составляла менее 10 % от той, что наблюдалась на первом цикле использования. Дополнительное покрытие ад(б)сорбированного фермента пэгилированным поликатионом не принесло какой-либо стабилизации такой системы.

Гораздо более позитивно проявили себя фермент-полиэлектролитные комплексы His_6-OPH с блок-сополимером полиэтиленгликоля с полиглутаминовой кислотой. Это позволило в 8 и более раз увеличить сохраняемую исходную каталитическую активность и эффективно препятствовать быстрому вымыванию His_6-OPH из функционализуемого волокна. Таким образом, была подтверждена первоначальная гипотеза о возможности модификации волокнистого материала ферментом в отсутствие необходимости их ковалентной сшивки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18–29–17069).

ЛИТЕРАТУРА

[1] Wong D.E., Senecal K.J., Goddard J.M. Immobilization of chymotrypsin on hierarchical nylon 6,6 nanofiber improves enzyme performance. // Colloids Surf. B Biointerfaces, 2017, v. 154, p. 270–278.
[2] Sun Q., Fu C.W., Aguila B., Perman J., Wang S., Huang H.Y., Xiao F.S., Ma S. Pore environment control and enhanced performance of enzymes infiltrated in covalent organic frameworks. // J. Am. Chem. Soc., 2018, v. 140(3), p. 984–992.
[3] Lyagin I.V., Efremenko E.N. Biomolecular engineering of biocatalysts hydrolyzing neurotoxic organophosphates. // Biochimie, 2018, v. 144, p. 115–121.
[4] Efremenko E.N., Lyagin I.V. Advanced biocatalysts based on hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase for chemical and biological defense. // Вестник войск РХБ защиты, 2019, т. 3(2), с. 111–116.
[5] Lyagin I., Efremenko E. Enzymes for detoxification of various mycotoxins: origins and mechanisms of catalytic action. // Molecules, 2019, v. 24(13), p. 2362.

УДК 577.2.04

ПРЕВЕНТИВНОЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ НА РАЗВИТИЕ МЕЛАНОМЫ B16

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова, В.В. Яглов

НИИ морфологии человека, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

За последние несколько лет в научной литературе резко увеличился объем информации о влиянии воды с пониженным содержанием дейтерия (Deuterium-depleted water, DDW) на различные биологические процессы. Продемонстрированы эффекты DDW на различные физиологические и патологические процессы, такие как депрессия у человека [1], долговременная память у крыс [2], антивозрастные изменения [3], метаболизм глюкозы [4] у экспериментальных животных и человека [5]. Имеются данные о положительных её эффектах при лучевом воздействии. Так, показано, что у мышей, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, значительно увеличивалась продолжительность жизни при летальном облучении, а также наблюдались более выраженные процессы репарации и усиление клеточного иммунитета у мышей в отдалённые сроки после нелетальных доз лучевого воздействия [6]. Длительное употребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводит к снижению степени тяжести лучевых повреждений, обусловленных действием гамма-излучения в низких дозах в условиях ежедневного воздействия [7]. Накоплен значительных опыт о различных эффектах, DDW на рост, развитие и прогрессирование опухолей, эффективность химио- и радиотерапии. Во многих работах отмечался противоопухолевый эффект DDW [8,9]. Целью нашего исследования являлось изучение профилактического и терапевтического эффектов потребления воды с пониженным содержанием дейтерия на развитие меланомы B16 у мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Эксперимент выполнен на самцах мышей C57/Bl6 (n=60) (филиал «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий). За животными, содержавшимися в виварии, осуществлялся уход по нормам и правилам обращения с лабораторными животными в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985 г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» (гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999 г.). Мыши были распределены на 3 группы. Первая группа (n=20) получала минерализированную дистиллированную воду с обедненным содержанием дейтерия 50ppm (Кубанский государственный университет, Россия) ad libitum со дня инокуляции опухоли, вторая группа (n=20) начала пить такую же воду за 30 дней до инокуляции. Третья группа (n=20) – контрольная, получала минерализованную дистиллированную воду (146 ppm) со дня инокуляции опухоли.

Мышам каждой группы подкожно вводили суспензию $5x10^5$ мышиных клеток меланомы B16 в 100 мкл среды для культивирования клеток RPMI в правую боковую область. Клеточная линия мышиной меланомы была получена из Коллекции опухолевых клеточных линий НИИ морфологии человека. Жизнеспособность клеток меланомы, оцененная по методу MTT, составила около 95 %. Через 20 дней после инокуляции у 100 % мышей наблюдалась зрительная и пальпируемая опухоль. Оценивали выживаемость и среднюю продолжительность жизни. Размеры опухоли (продольный и поперечный диаметры) измеряли ежедневно с помощью штангенциркуля и рассчитывали объем опухоли. Индекс торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали следующим образом: ТРО = 1 – средний объем опухолей в опытной группе/ средний объем опухолей в контроле х 100 %.

Статистический анализ проводился с использованием программного пакета Statistica 7.0 (StatSoft, США). Логарифмический тест использовали для сравнения кривых выживаемости. Центральная тенденция и дисперсия признаков с приблизительно нормальным распределением были представлены как среднее и стандартная ошибка среднего (M ± m). Количественные сравнения независимых групп были выполнены с использованием критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена для равенства дисперсий и $\chi 2$. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У мышей-опухоленосителей, потреблявших дистиллированную воду, выживаемость равномерно снижалась после прививки опухолевых клеток. Минимальная продолжительность жизни составила 31 суток, максимальная – 50 суток. Средняя продолжительность жизни в этой группе составляла 41.33±2.22 суток. У мышей-опухоленосителей, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия с момента прививки опухолевых клеток, также отмечалось постепенное уменьшение продолжительности жизни. Минимальная продолжительность составила 25, максимальная – 50 суток. Средняя продолжительность жизни в этой группе составляла 38.83±2.69 суток. У мышей-опухоленосителей, начавших потреблять воду с пониженным содержанием дейтерия за 30 дней до прививки опухолевых клеток, как и в предыдущих группах отмечалось постепенное уменьшение продолжительности жизни. Минимальная продолжительность составила 45, максимальная – 100 суток. Средняя продолжительность жизни в этой группе статистически значимо превысила значения двух предшествующих групп и составила 70.10±7.44 суток. Вскрытие животных после гибели показало наличие не только солидной опухоли, но и множественных метастазов в органы грудной и брюшной полости. Изучение торможения роста опухоли в группах с различными режимами потребления воды с пониженным содержанием дейтерия показало, что у животных, получавших воду с момента подсадки опухоли, отмечалось замедление роста опухоли по сравнению с группой, потреблявшей дистиллированную воду, вплоть до 25-х суток. Затем торможение роста опухоли уменьшалось и после 45-х суток рост опухоли был более выражен, чем у животных, потреблявших дистиллированную воду. У мышей, начавших потреблять воду с пониженным содержанием дейтерия за 30 суток до имплантации опухоли, торможение роста опухоли было более высоким и стабильным.

ОБСУЖДЕНИЕ

Меланома B16, линия опухолевых клеток мыши, часто используется для изучения образования солидных опухолей из-за высокого злокачественного потенциала. Клетки меланомы могут начать распространяться даже на ранних стадиях развития опухоли, поэтому они также используются для моделирования метастазирования [10]. Мыши в контрольной группе показали сходную скорость образования опухоли после инокуляции клеток меланомы. Анализ выживаемости показал, что 50 % контрольных мышей умерли на 41-й день после инъекции опухолевых клеток, и средняя продолжительность жизни также составила 41 день. Это доказывает, что прогрессирование опухоли и метастазирование у контрольных животных имели одинаковую скорость. Многочисленные метастазы, обнаруженные при посмертном обследовании мышей, считаются основной причиной смерти.

В последние несколько лет все больше свидетельств указывает на то, что истощение дейтерия в плазме оказывает положительное влияние на предотвращение прогрессирования рака. Недавние исследования показали, что низкий уровень дейтерия способствует ингибированию пролиферации раковых клеток in vitro и in vivo [11,12]. В настоящее время предприняты серьёзные попытки объяснить биологические эффекты изотопов различных элементов в организме [13]. Однако, изменение баланса между уровнями изотопов водорода, а именно протия и дейтерия в организме млекопитающих продемонстрировало неожиданные биологические эффекты, механизмы которых до сих пор плохо изучены из-за недостатка знаний о специфической роли дейтерия в метаболизме. Истощение дейтерия, которое началось с момента трансплантации опухоли, не изменило параметры выживаемости у мышей, за исключением минимальной продолжительности жизни. Выживаемость 50 % животных, получавших DDW, и их средняя продолжительность жизни также были одинаковыми. Более продолжительная минимальная продолжительность жизни и значительное ингибирование роста опухоли в течение 15 дней после образования солидной опухоли указывают на то, что истощение дейтерия каким-то образом предотвращало быстрый рост опухоли на начальной стадии. Это соответствует данным S. Paryad-zanjani et al., что потребление DDW снижает скорость роста меланомы F10 у мышей C57Bl / 6 в течение 30 дней после трансплантации [14]. Наши данные показывают, что противоопухолевый эффект истощения дейтерия постепенно снижается через 25 дней после инокуляции опухоли. Месяцем ранее замена водопроводной воды на DDW значительно повысила все показатели выживаемости. Более длительная продолжительность жизни и более высокие показатели ингибирования роста опухоли доказывают, что пониженное содержание дейтерия к моменту инокуляции опухолевых клеток ингибировало как рост опухоли, так и метастазирование. Стабильное подавление роста меланомы в течение 50 дней после трансплантации может быть опосредовано ингибированием пролиферации или активацией апоптоза опухолевых клеток [15].

Возможно, оба механизма были задействованы. Известно, что замена обычной воды на DDW с содержанием дейтерия менее 50 ppm в течение одного месяца значительно снижает концентрацию дейтерия в организме [16], а увеличение продолжительности потребления DDW усиливает его физиологические эффекты [17]. Таким образом, различия в показателях ингибирования роста опухоли у мышей с различными режимами потребления DDW демонстрируют зависящий от времени эффект истощения дейтерия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что наши результаты демонстрируют то, что истощение дейтерия оказывает противоопухолевый эффект, подавляя рост опухоли и метастазирование. Но развитие противоопухолевого эффекта требует предварительного истощения содержания дейтерия. Это свидетельствует о том, что противоопухолевый эффект зависит не только от степени истощения дейтерия. Комплекс физиологических изменений, вызванных истощением дейтерия, вероятно, также обусловлен ослаблением роста опухоли. Для изменения физиологических параметров требуется определенный период времени, поэтому только предварительное истощение дейтерия продемонстрировало противоопухолевый эффект.

Исследование частично выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–015–00236 А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Strekalova T., et al. Deuterium content of water increases depression susceptibility: The potential role of a serotonin-related mechanism // Behav. Brain Res. – 2015. – V. 277. – P. 237–244. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.039
2. Mladin C., et al.Deuterium Depleted Water has stimulating effects on long-term memory in rats // Neurosci. Lett. – 2014. – V. 583. – P. 154–158. doi: 10.1016/j.neulet.2014.09.037
3. Ávila D.S., Somlyai G., Somlyai I., Aschner M. Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a C.elegans model. //Toxicol. Lett. – 2012. – V. 211. – P.319–324. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.04.014
4. Molnár M., Horváth K., Dankó T., Somlyai G. Effect of deuterium oxide (D2 O) content of drinking water on glucose metabolism on STZ-induced diabetic rats; Proceedings of the 7th International Conference Functional Foods in the Prevention and Management of Metabolic Syndrome; North Charleston, SC, USA. 4–5 December 2010. – P. 154–155.
5. Somlyai G., Somlyai I., Fórizs I., Czuppon G. Papp A, Molnár M. Effect of Systemic Subnormal Deuterium Level on Metabolic Syndrome Related and other Blood Parameters in Humans: A Preliminary Study // Molecules. – 2020. – V. 25. – N. 6. – P. 1376. doi: 10.3390/molecules25061376.
6. Синяк Ю.Е. Первый международный симпозиум по "бездейтериевой" воде // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2010. – Т. 44. – № 4. – С. 66–67.
7. Раков Д.В. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия и кислорода18 О на развитие лучевых повреждений после гамма-облучения // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2007. – Т.41. – № 3. – С. 36–39.
8. Cong F.S., Zhang Y.R., Sheng H.C., Ao Z.H., Zhang S.Y., Wang J.Y. Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis // Exp. Ther. Med. – 2010. – N1. – P. 277–283. doi: 10.3892/etm_00000043.
9. Gyöngyi Z, et al.Deuterium depleted water effects on survival of lung cancer patients and expression of Kras, Bcl2, and Myc genes in mouse lung. //Nutr Cancer. – 2013 – v. 65 – N2 – P. 240–246. doi: 10.1080/01635581.2013.756533
10. Giavazzi R, Decio A. Syngeneic murine metastasis models: B16 melanoma. // Methods. Mol. Biol. – 2014. – N.1070. – P. 131–140. doi: 10.1007/978–1–46–14–8244–4_10
11. Yavari K, Kooshesh L. Deuterium depleted water inhibits the proliferation of human MCF7 breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest // Nutrition and cancer. – 2019. – V.71. – N.6. – P.1019–1029. doi: 10.1080/01635581.2019.1595048
12. Hassanzade A, Mandegary A, Sharif E, Rasooli R, Mohammadnejad R, Masoumi-Ardekani Y. Cyclooxygenase inhibitors combined with deuterium-enriched water augment cytotoxicity in A549 lung cancer cell line via activation of apoptosis and MAPK pathways. //Iran J. Basic Med. Sci. – 2018. – V. 21. – N.5. – P. 508–516. doi: 10.22038/IJBMS.2018.25366.6269.8
13. Basov A, Fedulova L, Vasilevskaya E, Dzhimak S. // Molecules. – 2019. – V.24. – N.22. – P. 4101. doi: 10.3390/molecules24224101
14. Paryad-zanjan S, Mahjoob MJ, Amanpour S, Kheirbakhsh R, Haji Akhoundzadeh M. A supplemental treatment for chemotherapy: control simulation using a mathematical model with estimated parameters based on in vivo experiment. //IFAC-PapersOnLine – 2016. – V.49. – N.26. – P.277–282. doi: 10.1016/j.ifacol.2016.12.138
15. Cong F, Laskay G, Somlyai G, Jakli G. Effects of deuterium depletion on proliferation and apoptosis in cultured murine haemopoietic cells. //Eur. Chem. Bull. – 2012. – V.1 – N.1 – P.44. doi: 10.17628/ecb.2012.1.39–47
16. Artsybasheva O, Barysheva E, Shashkov D, Vlasov R, Tekutskaya E. Changes of oxidation during use the food diet with deuterium depleted water in laboratory animals with purulent inflammation. //Russ. Open Med. J. – 2014. – V. 3. – art.0201.
17. Lisitsyn AB, Baryshev MG, Basov AA, Barysheva EV, Bykov IM, Dydykin AS, et al. Influence of deuterium depleted water on the organism of laboratory animals in various functional conditions of nonspecific protective systems // Biofizika. – 2014. – V.59. – N.4. – P. 757–765.

УДК 577.325

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛАГЕНАЗЫ, СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА

С.М. Панкова, Ф.А. Сакибаев, Т.Н. Беляева, А.Н. Дубовицкая, М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Коллагеназа (КФ 3.4.4.19) – фермент семейства металлопротеаз, способный к гидролизу коллагена. Молекулярная масса клостридиальных коллагеназ составляет 68–130 кДа. Значения изоэлектрической точки коллагеназы – 5.62 [1]. Бактериальная коллагеназа может быть использована в диагностических и лабораторных целях: для удаления некротических тканей из ран, лечения заболеваний глаз, операционных спаек, для профилактики морщин, ускорения рассасывания швов и рубцовых образований [2]. Одна из наиболее перспективных задач современной медицинской биотехнологии – создание биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов для применения в лечебных и фармацевтических целях.

Хитозан – аминополисахарид животного происхождения, деацилированная производная хитина, широко используемая как перспективный носитель для иммобилизации ферментов, ввиду ряда ценных характеристик. Он нетоксичен, неиммуногенен, обладает высокой сорбционной ёмкостью, проявляет антибактериальное и противогрибковое действие, влияет на процессы регенерации поврежденных кожных покровов, биодеградируем естественным метаболическим путем. [3]

Методом адсорбции нами были получены гетерогенные биопрепараты коллагеназы, иммобилизованной на матрицах кислоторастворимых среднемолекулярного (Mr = 200 кДа, степень деацетилирования – 82 %) и высокомолекулярного (Mr = 350 кДа, СД = 94.85 %) хитозанов [4]. Изучена зависимость протеолитической активности свободной коллагеназы и полученных гетерогенных биокатализаторов от температуры инкубации, кислотности среды и концентрации субстрата – азоказеина.

Выявлено, что иммобилизация коллагеназы на матрице хитозана приводит к сдвигу температурного оптимума в сторону более высоких температур (с 37 до 40 °С). Оптимальное значение pH для функционирования нативного фермента равно 7.5. Сорбированный на матрицах хитозана энзим высоко активен при pH 7.0–7.5. Значения Km и Vmax для иммобилизованной на высокомолекулярном хитозане и свободной коллагеназы не отличаются; у фермента, сорбированного на среднемолекулярном хитозане, наблюдается снижение максимальной скорости реакции и изменение степени сродства энзима к субстрату. Иммобилизация коллагеназы на матрицах кислоторастворимых среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов приводит к повышению стабильности фермента по отношению к денатурирующим факторам, в частности к воздействию высоких температур.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме гранта, выполняемых молодыми учеными под руководством кандидатов и докторов наук в научных организациях Российской Федерации РФФИ 19–34–50042 мол_нр.

ЛИТЕРАТУРА

1. H.E. Van Wart // Handbook of proteolytic enzymes. – 3rd Edn. – Academic Press, 2013. – V. 1. – P. 607–611.
2. U. Eckhard, D. Nu, P. Ducka, E. Scho, Brandstetter H. // Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications. J. 64, (2008).
3. М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение: учебное пособие / Воронежский государственный университет. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017. – 261 с.
4. М.Г. Холявка, В.Г. Артюхов, С.М. Сазыкина Исследование процессов УФ-модификации свободного и иммобилизованного трипсина // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 1. С. 66–70.

УДК 640

ЭКДИСТЕРОН ПОДАВЛЯЕТ РОСТ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

О. Шувалов, О. Федорова, А. Дакс, Е. Тананыкина, Ю. Гненная, Н. Барлев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Экдистерон (Ecdy) – это гормон членистоногих, который регулирует их развитие. Он также синтезируется рядом растений для борьбы с насекомыми-вредителями. Интересно, что у человека экдистерон обладает рядом полезных фармакологических эффектов, в том числе анаболическим и адаптогенным. Он широко продается в качестве пищевой добавки для повышения физической работоспособности спортсменов. Несмотря на описанное в литературе (ERbeta) – зависимое анаболическое действие в мышцах на рецепторы эстрогена, молекулярные механизмы множества других фармакологических эффектов, вызванных экдистероном, остаются неизвестными.

Цель исследования – изучение фармакологического действия экдистерона на клеточные линии рака молочной железы человека различных молекулярных подтипов. Удивительно, но в отличие от анаболического воздействия на мышечные ткани, мы обнаружили супрессивное действие экдистерона на изучаемую панель клеточных линий рака молочной железы человека. Используя технологию энергетического профилирования SeaHorse, мы продемонстрировали, что экдистерон ослабляет гликолиз и дыхание, а также значительно снижает метаболический потенциал клеточных линий тройного негативного рака молочной железы (TNBC). Кроме того, мы обнаружили экдистерон-зависимую индукцию аутофагии. Помимо этого, экдистерон синергично усиливал доксорубицин-зависимую гибель всех изученных линий рака молочной железы.

В совокупности наши результаты показывают, что экдистерон стоит рассматривать как новый потенциальный адъювант для генотоксической терапии при лечении больных раком молочной железы. В дальнейшем необходимо расширить исследования с использованием животных моделей, а так же прояснить молекулярные механизмы воздействия экдистерона на опухолевые клетки.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ # 18–75–10076.

УДК 640

СОЧЕТАННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ NUTLIN И ИНГИБИТОРА ТИРОЗИНКИНАЗ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК HER2-ПОЗИТИВНОГО ТИПА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О. Федорова, О. Шувалов, А. Дакс, А. Гудович, Н. Барлев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Рак молочной железы (РМЖ) – злокачественное новообразование, развивающиеся из клеток эпителия протоков и долек паренхимы молочных желез. На данный момент одним из важнейших молекулярных маркеров, определяющих подбор дальнейшей терапии при РМЖ, является амплификация онкогена HER2. HER2 представляет собой тирозин-киназный мембранный рецептор, который относится к семейству рецепторов эпидермального фактора роста. Каждый пятый случай РМЖ характеризуется сверхэкспрессией данного белка. HER2, являясь онкопротеином, участвует в сигналинге через PI3K/AKT, MAPK-киназный и других путях, таким образом регулируя клеточную пролиферацию, миграцию, дифференцировку, апоптоз и подвижность клеток. Соответственно, HER2 является не только биомаркером, но и важной терапевтической мишенью. Оверэкспрессия HER2 ассоциируется не только с агрессивностью заболевания, которая приводит как к более низкой продолжительности жизни пациентов, но и с резистентностью к цитотоксическим препаратам. Сегодняшняя стандартная схема терапии РМЖ HER2-позитивного подтипа включает в себя сочетание антител против HER2, ингибиторов тирозин-киназной активности (таких как афатиниб, лапатиниб, нератиниб) и ряда генотоксических препаратов. Нутлин-3 является одним из первых специфических ингибиторов взаимодействия MDM2-p53, который продемонстрировал многообещающие результаты, как противораковый препарат.

Цель исследования – изучить влияние сочетанного воздействия Nutlin и ингибиторов тирозинкиназ (афатиниба, лапатиниба и нератибина) на пролиферацию Her2-позитивных раковых клеток. При этом для данного исследования мы взяли клеточную линия РМЖ Her2-позитивного подтипа SKBR3, в которой показано, что экспрессируется мутантная форма p53 (R175H). Важно отметить, что такие мутации приводят не только к потере функций p53, но и приобретению опухолей новых онкогенных свойств.

Мы оценили совместное воздействие афатиниба, нератиниба и лапатиниба с DMSO (в качестве контроля) или Nutlin-3. Мы показали, что при совместном воздействии Nutlin и афатиниба наблюдается устойчивость по сравнению с клетками, которые были обработаны только ингибиторами с DMSO. Мы также показали с помощью ингибитора трансляции циклогексимида, что MDM2 влияет на период полужизни Her2. Кроме того, с помощью метода GST-pulldown нами было показано белок-белковое взаимодействие MDM2-Her2. Таким образом, мы предполагаем, что влияние нутлина обусловлено накоплением MDM2 в клетках, экспрессия которого в свою очередь приводит к резистентности клеток к действию афатиниба.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ # 18–75–10076 и РФФИ # 18–315–20013 мол_а_вед.

УДК 66.047

ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУСНЫХ И АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ (ПЦР, ИФА, РЛА)

А.И. Чижикова, А.М. Стойнова

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия,

Инфекционные и аутоиммунные заболевания являются большой угрозой для здоровья человека и животных в нашем мире. Существуют различные вирусные заболевания, такие как респираторные инфекции (вирус гриппа, риновирусы, коронавирус и другие), инфекции ЖКТ (ротавирус, аденовирус и другие), экзантематозные инфекции, инфекции печени, неврологические, инфекции кожи и слизистых оболочек. Аутоиммунные заболевания вызываются нарушением функции иммунной системы, что приводит к воспалению и разрушению здоровых тканей организма. Обнаружение биомаркеров в анализируемых биожидкостях особенно важно при ранней диагностике потенциального заболевания, это позволяет четко и своевременно оценить ситуацию и выбрать систему адекватных оздоровительных мероприятий.

Современные методы идентификации заболеваний очень разнообразны. Методики позволяют в кратчайшие сроки выявлять возбудителей инфекции и выявлять антитела к антигенам. Одним из самых популярных методов выявления инфекционных заболеваний является метод ПЦР (метод полимеразной цепной реакции). Плюсами данного метода являются высокая чувствительность, специфичность и простота в работе.

Существует два метода ПЦР – диагностики. Метод ПЦР в реальном времени позволяет проводить детекцию продуктов амплификации в процессе реакции и вести мониторинг кинетики накопления ампликонов. Метод является количественным [1]. Происходит комплементарное достраивание участка геномной – ДНК, in vitro, с помощью термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы), происходит процесс амплификации (многократное копирование) [2].

Второй метод – электрофоретическая детекция продуктов ПЦР-ЭФ – является качественным методом. Происходит электрофоретическое разделение ПЦР – продуктов в агарозном геле согласно размеру фрагментов ДНК.

К серологическим методам относят методы выявления антител или антигенов в биологических жидкостях. Иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА) имеют высокую специфичность иммунохимической реакции, антитела связываются с соответствующими им антигенами [3].

Метод РЛА – реакция латекс-агглютинации, используется также для диагностики инфекционных заболеваний и обнаружения антител. В качестве носителя антигена или антитела используются синтетические полимерные частицы, такие как латексы [4].

Плюсами данных методов молекулярной диагностики являются экономия времени проведения анализа, высокая чувствительность проводимых тестов, высокая специфичность, простота и безопасность работы и низкая себестоимость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., Гусякова О.А. Полимеразная цепная реакция. История открытия. Новый этап развития // Лабораторная диагностика профилактика инфекционных заболеваний. -2017. – Т154. – № 4. С. 17–19.
2. Костюк С.А., Кулага О.К., Хворик Д.Ф. Новые аспекты клинического применения полимеразной цепной реакции // «Медицинские новости». -1999. – С. 433.
3. Сотников Д.В., Определение специфических антител методом ИХА. – Москва. -2006.
4. Волина Е.Г., Яшина Н.В. Методические указания к постановке реакции латекс-агглютинации для диагностики инфекционных заболеваний. – Москва. -2006.

УДК 66.047

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ BRCA1, BRCA2, CHEK2, ATM, PALB2, BLM, NBS1 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКЕ ЯИЧНИКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЧИПОВ

А.И. Закаморная[1], И.С. Абрамов[1], А.Ю. Иконникова[1], Д.О. Фесенко[1], Т.С. Лисица[1,2], Т.В. Наседкина[1]

[1] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия
[2] Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Наследственный рак молочной железы и рак яичников (РМЖ/РЯ) составляют не менее 5–10 % от общей заболеваемости РМЖ/РЯ. Описан рядвысокопенетрантных мутаций в генах BRCA1 и BRCA2, а также мутации в генах CHEK2, PALB2, NBN, BLM, ATM со средней пенетрантностью, которые повышают риск развития РМЖ/РЯ. Для более точной оценки вклада редких генетических вариантов в риск развития заболевания необходимы исследования больших групп пациентов с РМЖ/РЯ и здоровых доноров что, в свою очередь требует разработки недорогих и эффективных методов генетического скрининга.

Нами разработан биочип для одновременного анализа 13 мутаций: BRCA1 (185delAG, 300T>G, 5382insC, 4153delA, 4158A>G, 3819delGTAAA, 2080delA, 3875delGTCT), BRCA2 (6174delT, 6998insT), CHEK2 (1100delC, IVS2+1G>A, 4 70T>C), ATM (5932G>T), PALB2 (172_175delTTGT), BLM (1642 C>T), NBS1 (657del5). Пробоподготовка заключается впроведении мультиплексной одноэтапной ПЦР с одновременным флуоресцентнным маркированием ПЦР-продуктов, далее проводится аллель-специфичная гибридизация с олигонуклеотидными зондами на биочипе. Вывод о генотипе делается на основе флуоресцентных сигналов ячеек биочипа.

Для апробации методики было выполнено генотипирование пациентов с РМЖ/РЯ (n=242). Результаты генотипирования приведены в таблице 1. Все выявленные мутации были верифицированы методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Также как и в других исследованиях, наиболее часто обнаруживали мутацию BRCA1 5382insC, она была выявлена у 9,1 % пациентов.

Таблица 1. Частота мутаций у пациентов с РМЖ/РЯ.

Ген	Мутация	Пациенты с РМЖ/РЯ (n=242)	% пациентов с мутацией	Ген	Мутация	Пациенты с РМЖ/РЯ (n=242)	% пациентов с мутацией
BRCA1	5382insC	22	9,1	CHEK2	1100delC	2	0,83
	300T>G	2	0,83		470T>C	7	2,89
	4153delA	1	0,41	ATM	5932G>T	1	0,41
	4158A>G	1	0,41	NBS1	657del5	1	0,41
	185delAG	1	0,41	BLM	1642C>T	1	0,41
	2073delA	1	0,41	PALB2	172–175delTTGT	1	0,41
BRCA2	6174delT	1	0,41				

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 05.604.21.0234, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0234).

ЛИТЕРАТУРА

1. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. Т. 11, № 4. С. 258–264.

УДК 579.25

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ВСПЫШЕК СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ B. ANTHRACIS В ТУРКЕСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ

А.Б. Шевцов [1], Л.Ю. Лухнова [2], У.А. Избанова [2], В.Б. Луцай [1]

[1] РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан
[2] Национальный научный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева, Алматы, Казахстан

Территория Казахстана является неблагополучной по сибирской язве, официально случаи заболеваний регистрируют с 1935 года. В настоящее время болезнь не имеет широкого эпидемического и эпизоотического распространения. Относительный показатель заболеваемости людей сибирской язвой в Казахстане в 1999–2018 гг. составляет от 0,01 до 0,24 на 100 тысяч населения. Туркестанская область расположена в южном регионе Казахстана и является наиболее неблагополучной по сибирской язве с индексом эпизоотичности – 0,41 [1]. Основными закономерностями сибирской язвы в Туркестанской области являются сезонность заболеваний, связь с погодными и природно-климатическими факторами, ландшафтная приуроченность. Заболевания сибирской язвой животных происходят в июне-сентябре (пик август-сентябрь). Высокая температура воздуха (от +21º С до +49ºС) и низкая влажность (130+250 мм), поедание сельскохозяйственными животными высохшей травы способствует заражению. У людей инфекция регистрируются в летне-осенний период, повторяя сезонную закономерность заболеваний сельскохозяйственных животных. Как правило, заражаются жители сельской местности, имеющие частный скот, являя классический пример «семейных» вспышек сибирской язвы. Основными причинами сохранения и вегетации возбудителя являются природно-климатические факторы, а именно наличие территорий с преобладанием черноземных и каштановых почв. Плотность очагов составляет 2,0–4,0 на 1000 км^2. В настоящее время на территории области зарегистрировано 222 стационарно неблагополучных пункта, 403 эпизоотических и эпидемических очагов сибирской язвы, 48 почвенных. С 1935 по 2019 годы зарегистрировано 475 случаев заболевания людей, 2695 случаев заболевания сельскохозяйственных животных [2]

32 штамм Bacillus anthracis были генотипированы с использованием мультилокусного анализа числа вариабельных тандемных повторов (MLVA25) [3]. Штаммы выделены от животных или пациентов с установленным диагнозом «сибирская язва» с территории Туркестанской области в период 1962–2011 годы. Вариабельность установлена в локусах: BAMS30, BAMS28, BAMS23, BAMS22, BAMS13, BAMS05, BAMS03, pXO2, pXO1, CG3, vrrC1 и vrrA. Кластерный анализ методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA) сгруппировал штаммы в 17 генотипов и 7 клональных комплексов из которых наиболее представлен 1, 3 и 10. Отмечается выделение идентичных генотипов с территории населённых пунктов с интервалом от 2 до 37 лет. При этом есть случае выделение двух генотипов в одной вспышке с отличием на 1–2 тандемных повтора в гипервариабельных локусах.

Ретроспективный анализ вспышек сибирской язвы в Туркестанской области в период 1961–2011 годы показал, что в Туркестанской области остается высокий риск заражения возбудителем сибирской язвы. Результаты молекулярно-генетического анализа свидетельствуют о сохранении очагов в длительном периоде.

ЛИТЕРАТУРА

Атшабар Б.Б., Бурделов Л.А, Избанова У.А., Лухнова Л.Ю. // Паспорт регионов Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. – Алматы, 2015. – Вып. 1 (31). – 178 с.

Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве населенных пунктов Республики Казахстан (1935–2018 гг.)» / под общей редакцией д.м.н. Л.Ю. Лухновой. – Алматы: КНЦКЗИ, 2019. – 460 с.

Lista F, Faggioni G, Valjevac S, Ciammaruconi A, Vaissaire J, et al. Genotyping of Bacillus anthracis strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis // BMC Microbiol. – Vol. 6. – P.

УДК 615.849.19, 544.773.432

ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА В 3D-КУЛЬТУРАХ

П.Ю. Бикмулина[1], Н.В. Кошелева[2,3,4], А.И. Шпичка[1,5], В.И. Юсупов[6], Ю.А. Рочев[1,7], П.С. Тимашев[1,5,6,8]

[1] Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия
[2] Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия
[3] МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[4] Российская Медицинская Академия Непрерывного Профессионального Образования Минздрава РФ, Москва, Россия
[5] МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[6] Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия
[7] National University of Ireland, Galway (NUI Galway), Galway, Ireland
[8] Институт химической физики имени Н.Н. Семенова, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Фотобиомодуляция (ФБМ) – это метод, основанный на нетепловом воздействии света определенной длины волны и низкой интенсивности на клетки и ткани (1). ФБМ повсеместно применяют для терапии и профилактики широкого круга заболеваний. Воздействие ФБМ направлено в основном на подавление воспалительных реакций и ускорение регенеративных процессов. Наиболее выраженные эффекты такого характера показаны для излучения красной и инфракрасной областей спектра (2). Механизмы воздействия ФБМ на различные типы клеток в разных условиях могут отличаться и до конца не изучены. Так, одни и те же параметры облучения могут приводить как к стимулированию пролиферации, так и к активации дифференцировки клеток (3). Предполагается, что излучение может воздействовать на клетки несколькими путями – через фотореактивацию ферментов (супероксиддисмутазы) в очагах воспаления, фотолиз комплексов оксида азота (NO), ингибирующих комплексы дыхательной цепи митохондрий, а также с помощью воздействия на порфирины мембран митохондрий (4). Известно, что основной мишенью красного и инфракрасного излучения в клетке является комплекс IV (цитохром с-оксидаза) митохондрий (5). При поглощении света компонентами дыхательной цепи митохондрий происходит фотодиссоциация комплекса NO-цитохром с-оксидаза, что ведет, с одной стороны, к увеличению активности дыхательной цепи, скорости переноса электронов, продукции АТФ и небольших количеств активных форм кислорода (АФК), а с другой стороны – к высвобождению NO, который может выступать в качестве сигнальной молекулы (в частности, в процессах дифференцировок). АФК также являются медиаторами множества сигнальных путей в клетке, в том числе противовоспалительных и антиапоптотических. Вследствие увеличенной продукции АТФ изменяются уровни pH и ионов Ca^{2+}, что зачастую является митогенным сигналом. Таким образом, после воздействия ФБМ происходит повышение метаболической активности и клеточного дыхания, усиление пролиферации и снижение числа апоптотических клеток (6). Такие свойста ФБМ позволяют предположить, что данный метод обладает большим потенциалом для применения в области тканевой инженерии и регенеративной медицины. В настоящее время внимание этих областей сосредоточено на создании 3D-систем культивирования клеток, повторяющих условия нативной ткани in vivo. Так, скаффолды из различных биоматериалов способны имитировать внеклеточный матрикс, что позволяет воссоздать трехмерное микроокружение для клеток. Однако зачастую такие методы сталкиваются с проблемами, например, ограниченной диффузией кислорода и питательных веществ, недостаточной васкуляризацией, и как следствие, стрессом и гибелью клеток внутри объемных конструктов. Целью данной работы стало изучение механизмов и эффектов ФБМ, а также исследование потенциальных возможностей ФБМ стимулировать физиологическую активность клеток в 3D-условиях.

МЕТОДЫ

В исследовании использовали культуры клеток с различными типами метаболизма – мезенхимные стромальные клетки человека (МСК) и линию клеток нейробластомы человека SK-N-BE(2). Клетки культивировали на ростовой среде ДМЕМ/Ф12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для подтверждения фенотипа первичной культуры МСК клетки анализировали на наличие специфичных поверхностных белков на проточном цитофлуориметре Sony SH800S (Sony Biotechnology, USA).

Для ингибиторного анализа клеточного дыхания использовали различные токсические вещества-ингибиторы комплексов дыхательной цепи митохондрий: ротенон в концентрациях от 0,001 до 150 мкМ, нитропруссид натрия от 20 до 100 мкМ, азид натрия от 1 до 50 мМ. В качестве трёхмерной системы культивирования клеток были выбраны гидрогелевые скаффолды из модифицированного фибрина. Культивирование проводили в разных вариантах (высота гидрогеля – 1,5 или 3 мм, концентрация фибрина – 25 или 50 мг/мл) в течение 3–7 дней в инкубаторе при температуре 37^0 С и 5 % CO_2. ФБМ клеток производилась с помощью LED-установки при 2 режимах: 633 нм, 1200 секунд, 2,2 Дж/м^2 и 840 нм, 600 секунд, 2,2 Дж/м^2 (см. табл. 1). Внешний вид и схема установки для ФБМ представлены на рис. 1. Облучение производилось однократно либо за 2 часа до воздействия ингибиторов на клетки, либо одновременно с добавлением ингибитора / полимеризацией фибринового гидрогеля. Так как было необходимо подобрать параметры ФБМ не только для стандартных монослойных культур, но и для условий трехмерных гидрогелей, были проведены спектрофотометрические исследования гидрогелей различных модификаций на предмет прозрачности геля для длин волн 633 и 840 нм.

Таблица 1. Технические параметры матричных LED-установок для ФБМ

Длина волны, нм	633±8	840±18
Мощность, мВ	160±20	320±40
Плотность потока, мВ/см^2	1.8±0.2	3.6±0.4
Интенсивность, Дж/см^2	2.2±0.2	2.2±0.2
Энергия, Дж	96±10	96±10
Время, сек	1200	600
Число сессий	1	1

Анализ эффектов ФБМ на физиологическую активность клеток проводили различными методами. Долю апоптотических клеток в популяции оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии и флуоресцентных красителей пропидий йодида и Аннексина-7, общую жизнеспособность и метаболическую активность – колориметрическими тестами на цитотоксичность (MTT, аламаровый синий), действие которых основано на неспецифическом восстановлении реагента в детектируемую форму различными внутриклеточными ферментами. Темпы пролиферации анализировали количественно спектрофлуориметрическим методом определения количества ДНК в образце (PicoGreen). Жизнеспособность клеток была визуализирована, для этого использовали тест Live/Dead и лазерный сканирующий конфокальный микроскоп (Olympus, Japan). Также была проведена оценка активности митохондрий. С использованием цейтраферной микроскопии (CellInsight CX7, Thermofisher, USA) было исследовано количество активных митохондрий, окрашенных MitoTracker Green, в динамике в течение 8 часов после ФБМ. Количественную оценку активности клеточного дыхания по уровню потребления кислорода проводили с помощью прибора Seahorse (Agilent, USA), принцип действия которого основан на анализе потребления кислорода каждым отдельным комплексом (I–IV) при последовательном разрушении дыхательной цепи специфическими ингибиторами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе методами проточной цитофлуориметрии апоптотической гибели клеток после облучения при выбранных режимах выявлено не было, что говорит об отсутствии негативных эффектов ФБМ для интактных клеток. Фибриновый гидрогель толщиной 10 мм (что значительно превышает толщины гелей, используемых в клеточных экспериментах) оказался оптически прозрачным как для красного (633 нм), так и для ближнего инфракрасного (840 нм) света. При воздействии на культуры клеток ингибиторов дыхания (в частности, ротенона) жизнеспособность снижалась пропорционально концентрации токсина, при этом клетки линии SK-N-BE(2) оказались менее устойчивы к воздействию ротенона, чем МСК. Однако ФБМ была способна нейтрализовать этот эффект при концентрациях ротенона до полулетальной, и эффективность двух типов облучения для данных клеток с разным метаболизмом различается. Так, МСК оказались более чувствительны к ФБМ красной области спектра, а клетки нейробластомы – к инфракрасному облучению, и в обоих случаях происходило увеличение общей метаболической активности клеток на 10–15 % по сравнению с необлученными контролями. Трехмерные условия гидрогеля также оказывали неблагоприятное действие на клетки, в частности, происходило значительное ингибирование пролиферации. Повышенная концентрация, и особенно толщина гидрогеля значительно снижали активность клеток, по-видимому, вследствие ограничения диффузии. ФБМ, особенно при длине волны 840 нм, была способна нейтрализовать этот эффект, активируя пролиферативную активность клеток и приводя к увеличению числа ДНК в образцах в среднем на 15 % через 3 суток культивирования (рис. 2 в).

Параллельно наблюдали эффекты, отмеченные и в монослойных культурах – увеличение жизнеспособности и метаболической активности (рис. 2 г, д). Число активных митохондрий клеток, помещенных в условия гидрогеля, в течение нескольких часов после ФБМ было несколько выше. Данный эффект подтверждается данными Seahorse: повышение уровня потребления кислорода после облучения для обоих типов клеток достигает 20 %. При этом наиболее выраженные изменения в клеточном дыхании наблюдаются в течение 2 часов от момента ФБМ.

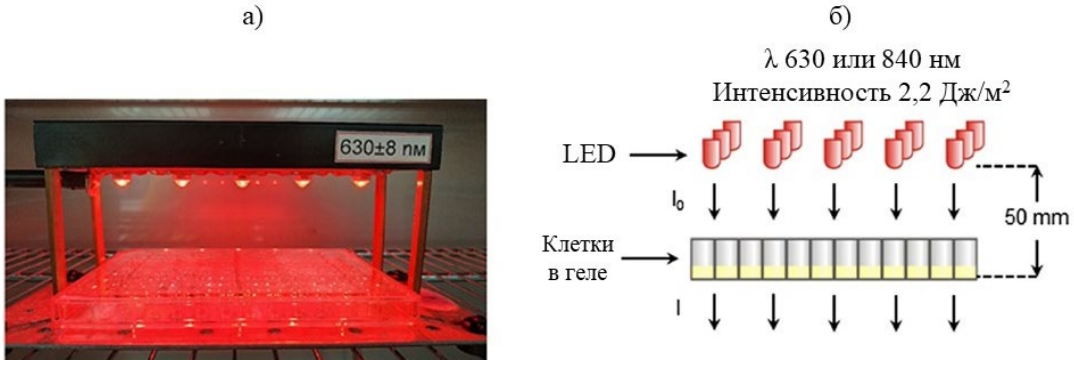


Рисунок 1. Внешний вид матричной LED-установки для ФБМ (а); схема матричной LED-установки (б); на подставке находится культуральный планшет с лунками, заполненными фибриновым гидрогелем с клетками; LED-матрица располагается на расстоянии 50 мм от верхнего края планшета

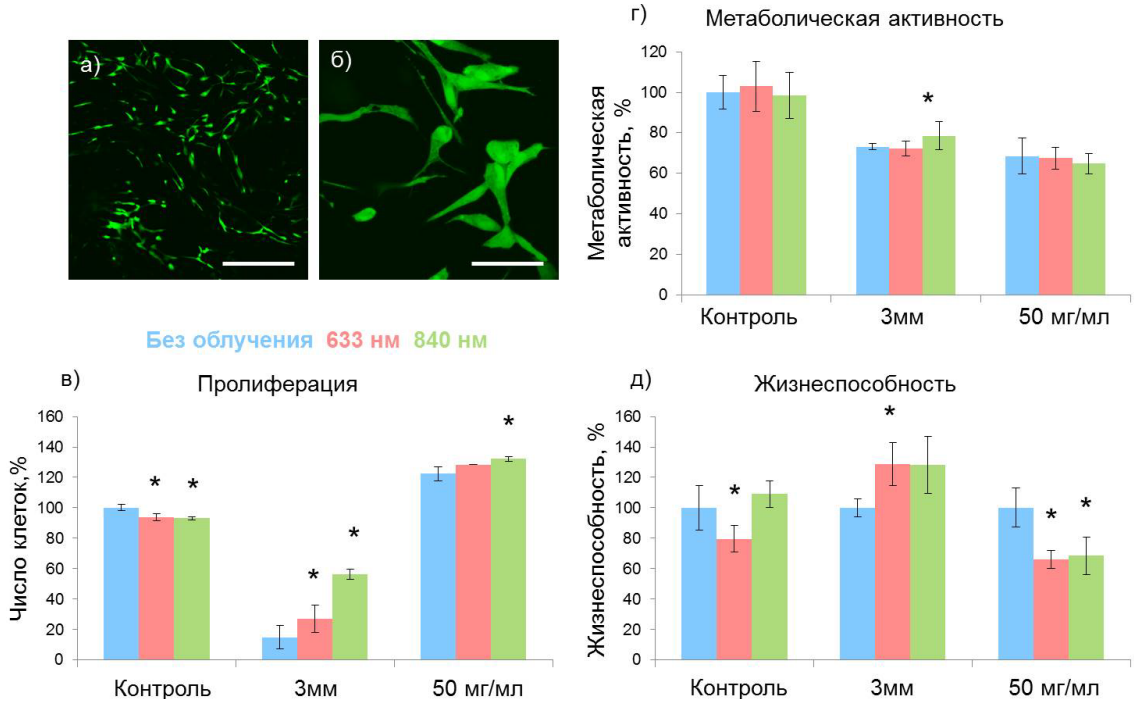


Рисунок 2. Визуализация жизнеспособных МСК, культивируемых в модифицированном фибриновом гидрогеле, полученная с помощью теста Live/Dead; зеленые клетки – живые, окрашенные кальцеином; масштабный отрезок составляет 100 и 20 мкм, соответственно (а, б). Количество ДНК МСК, культивируемых в течение 3 дней в контрольных образцах (фибриновый гидрогель высоты 1,5 мм и концентрации 25 мг/мл – контроль), более толстых (фибриновый гидрогель высоты 3 мм и концентрации 25 мг/мл – 3 мм), и более концентрированных (фибриновый гидрогель высоты 1,5 мм и концентрации 50 мг/мл – 50 мг/мл) (в). Метаболическая активность клеток, оцененная с помощью метода аламарового синего, для тех же образцов (г). Количественная оценка теста Live/Dead для тех же образцов (д)

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, было показано, что ФБМ красной и ближней инфракрасной области спектра приводит к увеличению их метаболической активности клеток за счет активации дыхательной цепи митохондрий, стимулирует пролиферацию и обладает антиапоптотическими эффектами. Использованные в работе режимы ФБМ по-разному воздействуют на клетки с разным типом метаболизма. Инфракрасное облучение имеет более выраженные эффекты в трехмерных системах. Результаты данного исследования демонстрируют высокий потенциал метода ФБМ для применения в области тканевой инженерии за счет его способности стимулировать физиологическую активность клеток в неблагоприятных условиях затрудненной диффузии кислорода и питательных веществ в трехмерном конструкте, а также удобства в использовании и неинвазивности. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов облучения у разных типов клеток и в разных условиях культивирования поспособствует выяснению его роли в процессах дифференцировки и регенерации, а также более грамотному и эффективному применению ФБМ в терапии.

Данное исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований грант № 20–04–60063 (выделение первичных культур МСК) и грант 18–29–06059 (создание биоматериалов).

ЛИТЕРАТУРА

1. George S, Hamblin MR, Abrahamse H. Effect of red light and near infrared laser on the generation of reactive oxygen species in primary dermal fibroblasts. J Photochem Photobiol B Biol. 2018 Nov; 188:60–8.
2. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang Y-Y, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. Ann Biomed Eng. 2012; 40(2):516–33.
3. Fekrazad R, Asefi S, Eslaminejad MB, Taghiar L, Bordbar S, Hamblin MR. Photobiomodulation with single and combination laser wavelengths on bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation and differentiation to bone or cartilage. Lasers Med Sci. 2019 Feb 27; 34(1):115–26.
4. Владимиров ЮА. Лазерная терапия: настоящее и будущее. Соровский образовательный журнал. 1999; (12):2–8.
5. Karu TI. Molecular mechanisms of the terapeutic effect of low-intensity laser radiation. Lasers life Sci. 1988; 2(1):53–74.
6. Wong-Riley MTT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: Role of cytochrome c oxidase. J Biol Chem. 2005 Feb 11; 280(6):4761–71.

УДК 577.344:611.441

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ УПОТРЕБЛЕНИИ ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, В.А. Митрофанова, В.В. Яглов

НИИ морфологии человека», Москва, Россия

Организм человека и млекопитающих животных состоит из воды на 70 %. Атомы водорода, входящие в состав воды, в процессе метаболизма участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, реакциях замещения и других катаболических и анаболических процессах. Таким образом, атомы водорода воды интегрируются во все классы органических соединений в организме и участвуют в обеспечении, как структурной функции, так и гомеостатических реакций. Известно, что водород имеет три изотопа: протий, дейтерий и тритий. Биологическая роль двух последних изотопов и их отличия в распределении в организме и участии в реализации основных функций крайне мало исследованы.

Потребляя воду, организм получает и протий и дейтерий. Содержание дейтерия в питьевой воде не нормируется нормативными документами, что обусловлено его различным содержанием в природной воде. Минимальное содержание дейтерия регистрируется в льдах Антарктиды, наиболее высокой в оазисах пустынь. Стандартом считается содержание дейтерия в среднеокеанической воде с глубины 500 м равное 155,76 ppm. Вода с содержанием дейтерия менее 130г/л считается обедненной дейтерием. Потребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводит к смещению баланса дейтерия/протия в первую очередь в биологических жидкостях, в тканях этот процесс менее выражен [1]. Однако в научной литературе в последние годы появились работы показывающие изменения процессов пролиферации и апоптоза, активности цикла трикарбоновых кислот при изменении баланса дейтерия/протия [5–7]. Работ, посвященных морфофункциональным изменениям эндокринных желез, являющихся одними из основных регуляторов метаболизма и морфогенеза при понижении содержания дейтерия в питьевой воде, на сегодняшний день нет.

Цель исследования – изучить структурные изменения щитовидной железы мышей при длительном потреблении воды с пониженным содержанием дейтерия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на самцах мышей линии C57Bl/6, полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Столбовая»). Экспериментальную группу составили животные, которые вместо водопроводной воды потребляли воду с пониженным содержанием дейтерия 10ppm. Содержание дейтерия в воде определяли с помощью спектрального жидкостного изотопного анализатора T-LWIA-45-EP («Los Gatos Research», США). Контрольную группу составили животные, потреблявшие дистиллированную воду. Животных выводили из эксперимента через 2, 3 и 4 недели передозировкой золетила.

Уход за животными, содержавшимися в виварии, осуществлялся по нормам и правилам обращения с лабораторными животными, в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985 г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999 г. Эксперимент проведен в соответствии с правилами работы с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977 г.

Доли щитовидной железы фиксировали в растворе Буэна и после автоматизированной гистологической проводки заливали в парафин. Изготавливали срезы, которые после депарафинизации окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили гистологическое и морфометрическое исследование препаратов щитовидной железы с помощью световой микроскопии и компьютерной морфометрии с использованием программы «ImageScope» («Leica Microsystems», Германия). Определяли размеры фолликулов, количество фолликулов в 1 мм^2 площади среза железы и высоту фолликулярных тироцитов.

Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 7.0 («Statsoft Inc.», США). Для описания количественных признаков проводили анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения с использованием критериев Колмогорова-Смирнова, Лиллиефорса, Шапиро-Уилка. Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий, по качественному признаку – χ^2. Статистически значимыми различия считались при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через две недели после начала эксперимента у мышей контрольной и опытной групп был выявлен ряд отличий в гистологическом строении щитовидной железы. У мышей контрольной группы щитовидная железа представляла собой парный орган паренхиматозного строения, состоящий из двух долей, снаружи покрытых соединительно-тканной капсулой, от которой отходили тонкие перегородки, делящие паренхиму на дольки. Паренхима была представлена группами фолликулов овальной, реже круглой формы различных по размеру. Наиболее крупные фолликулы встречались в периферических зонах долей. Фолликулы были заполнены плотным коллоидом. Фолликулярный эпителий был, как правило, кубической формы. Ядра имели круглую форму. В большинстве случаев в ядре визуализировалось ядрышко. Цитоплазма характеризовалась умеренной базофилией. В железе активно проходили процессы десквамации эпителия в полость фолликулов. Стромальный компонент был слабо развит. Венозные сосуды имели свободный просвет.

У мышей, потреблявших воду с содержанием дейтерия 10ppm, щитовидная железа имела аналогичное строение. В паренхиме наблюдались изменения, заключавшиеся в уменьшении размеров фолликулов. Однако число фолликулов в единице площади не увеличивалось, а наоборот, статистически значимо уменьшалось. Фолликулы, как и в контроле, имели овальную и круглую форму. Более крупные фолликулы также обнаруживались в периферических зонах долей. В центральных зонах долей отмечалось появление резорбционных вакуолей в коллоиде. Эпителий фолликулов имел кубическую форму. Его высота была статистически значимо больше значений контрольной группы. Клетки имели круглые ядра и просветленную цитоплазму. В цитоплазме часто встречались включения коллоидных капель крупного размера. Изменений микроциркуляторного русла не наблюдалось.

Через три недели после начала эксперимента у мышей контрольной группы выраженных морфологических изменений не обнаружено. Отмечалась меньшая выраженность десквамации эпителия в полость фолликулов, а также появление в фолликулах клеток с повышенной базофилией ядер. На периферии долей в клетках встречались уплощенные гиперхромные ядра. Цитоплазма клеток была просветленной или слабо базофильной. Содержание коллоида в фолликулах было понижено. Коллоид имел фестончатые очертания, в нем встречались резорбционные вакуоли.

У мышей, потреблявших воду с содержанием дейтерия 10ppm, гистологическое строение щитовидной железы соответствовало контрольным параметрам. Также отмечалось уменьшение десквамации эпителия. Выявлены отличия в строении фолликулярного эпителия. Высота эпителиоцитов была меньше контрольных значений. Отмечалось усиление базофильных свойств цитоплазмы. Ядра, как и в контрольной группе, имели круглую форму и характеризовались полихромазией. Коллоид в просвете фолликулов был более плотным. Резорбционные вакуоли встречались реже.

Через 4 недели после начала эксперимента паренхима щитовидной железы мышей контрольной группы была представлена овальными и круглыми фолликулами, заполненными коллоидом. Высота фолликулярных эпителиоцитов уменьшилась по сравнению с предыдущим сроком исследования. Ядра клеток имели круглую форму. Цитоплазма клеток была слабо базофильной.

У мышей, потреблявших воду с содержанием дейтерия 10ppm в течение 4 недель, в щитовидной железе отмечены изменения в строении паренхимы. Размеры фолликулов не отличались от таковых в контрольной группе, но их форма была иной. И в центральных, и особенно в периферических зонах долей фолликулы приобрели вытянутую форму, нередко с заостренными краями. Высота фолликулярных тироцитов была меньше, чем у контрольных животных. Наряду с клетками со слабо и умеренно базофильной цитоплазмой в фолликулах встречались клетки с резко оксифильной цитоплазмой. Изменилась также и структура ядер. Часто встречались уплощенной формы

гиперхромные ядра. Коллоид в полости фолликулов был компактным с ровным краем. Резорбционные вакуоли встречались реже.

Таким образом, во всех сроках исследования структура железы была типичной [2]. Процессы обновления фолликулярного эпителия протекали синхронно. Выраженных изменений со стороны микроциркуляторного русла не было выявлено. Но полученные результаты свидетельствуют, что потребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводит к изменениям гистофизиологии щитовидной железы мышей. Нами были обнаружены признаки, свидетельствующие об изменении функциональной активности щитовидной железы. Изменения, выявленные через 2 недели, свидетельствуют об усилении процессов резорбции тироглобулина из полости фолликулов. По данным нашего исследования скорость резорбции тироглобулина не только превышала скорость его выделения в полость фолликулов, но и расщепления лизосомами, о чем свидетельствуют признаки неэффективной резорбции [4]. Усиление резорбции – это ТТГ-зависимый процесс, свидетельствующий о необходимости усиления продукции тиреоидных гормонов [3]. Изменения, выявленные через три недели, показывают, что интенсивность резорбтивных процессов была снижена. Через четыре недели появились изменения, указывающие на снижение не только процессов резорбции, но и синтеза тироглобулина. Морфологическая картина, наблюдаемая на данном сроке, свидетельствовала о значительном снижении функциональной активности щитовидной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Потребление воды с пониженным содержанием дейтерия вызывает структурные изменения в паренхиме щитовидной железы, свидетельствующие об активации секреторной деятельности, а в дальнейшем ее снижении, что указывает на чувствительность щитовидной железы к изменению баланса изотопов водорода.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–015–00236 А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джимак С.С., Барышев М.Г., Басов А.А., Тимаков А.А. Влияние воды со сниженным содержанием дейтерия на изотопный состав лиофилизированных тканей и морфофункциональные показатели организма у крыс из разных поколений. Биофизика. 2014. Т.59. вып. 4. С. 749–756.
2. Яглов В.В., Яглова Н.В. Основы частной гистологии. М., изд. «КолосС», 2011, 431 с.
3. Яглова Н.В. Нарушения секреторного цикла фолликулярных тироцитов и их коррекция тиреотропным гормоном при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т.152. № 8. С. 215–219.
4. Яглова Н.В. Синдром нетиреоидных заболеваний при остром бактериальном эндотоксикозе. Вестник Российской академии медицинских наук. 2013. Т.68. №.3. С. 24–32.
5. Boros L.G., D'Agostino D.P., Katz H.E., Roth J.P., Meuillet E.J., Somlyai G. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle. Med Hypotheses. 2016. Vol. 87. P. 69–74.
6. Soleyman-Jahi S., Zendehdel K., Akbarzadeh K., Haddadi M., Amanpour S., Muhammadnejad S. in vitro Assessment of Antineoplastic Effects of Deuterium Depleted Water. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2014. Vol. 15. P. 2179–2183.
7. Wang H., Zhu B., He Z., Fu H., Dai Z., Huang G., Li B., Qin D., Zhang Y., Tian L., Fang W., Yang H. Deuterium-depleted water (DDW) inhibits the proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells in vitro. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2013. Vol. 67. P.489–496.

УДК 573.6.086.83 +577.21

БИОПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Р.Д. Якупова, И.Р. Гильмутдинова, П.С. Еремин, Е.Ю. Костромина

Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при разработке биопластических материалов, применяемых в качестве раневых покрытий, отдают предпочтение биополимерам (компонентам природного происхождения) и их производным. Так как раневое покрытие служит для восстановления, поддержания и улучшения функций тканей, ведется все больше работ по разработке материалов, максимально приближенных к коже по свойствам, структуре и функциональным характеристикам [1, 2]. Исходя из этого, особое внимание заслуживают такие продукты, как коллаген и гиалуроновая кислота – компоненты внеклеточного матрикса, принимающие активное участие в восстановлении поврежденных структур дермы [3]. Они обеспечивают механическую прочность, способствуют восстановлению исходных размеров, эластичность и регенерацию тканей [4]. Преимуществом таких компонентов является их способность расщепляться в живых средах на более простые соединения, которые не являются токсичными для клеток [2].

Имеется несколько основных требований, предъявляемых к раневым покрытиям [5,6]. Покрытия должны быть биосовместимыми и не должны вызывать токсичных, аллергических, канцерогенных реакций окружающих тканей. При контакте раневой поверхности с иммуногенным материалом развивается воспалительный процесс в окружающих тканях, приводящий к пролиферации фибробластов, которые продуцируют коллагеновые волокна и другие компоненты внеклеточного матрикса. Формируется соединительнотканная непроницаемая капсула, изолирующая рану от раневого покрытия и от окружающей среды [7,8].

Также биопластические материалы, используемые для разработки раневых покрытий, должны обладать определенной скоростью биодеградацией, требуемой для клинических случаев, с образованием биологически безопасных продуктов распада и постепенным замещением их естественными тканями. Очевидно, что необходимой предпосылкой реализации такого подхода является использование изначально нетоксичных компонентов. При этом скорость разрушения биоматериала не должна превышать скорость восстановления (регенерации) замещающих его тканей. При нарушении этого условия будут создаваться предпосылки замедления (прекращения) регенерации, или преждевременной потери функции покрытия [9].

Для создания оптимальной микросреды в зоне поражения раневое покрытие должно обладать рядом характеристик. Материал должен пропускать излишнюю влагу, но в то же время сохранять оптимальную влажность, чтобы предотвратить пересушивание поврежденной поверхности, так как при скапливании раневого экссудата происходит мацерация кожи и разрыхление эпидермиса. Если до краевой и островковой эпителизации будет достаточна умеренная гипоксия раневой среды, то для полного заживления необходима насыщенная кислородом среда, поэтому раневое покрытие должно обеспечить проницаемость для кислорода [10].

Плотно прилегающая поверхность может напрямую воздействовать на клеточный ответ и, как следствие, на регенерацию тканей. Идеальное раневое покрытие должно быть эластичным и полностью моделировать даже сложные раневые поверхности для равномерного распределения кислорода, влаги и активных веществ [11].

Цель работы – исследовать новый биопластический материал на основе растворимой формы компонентов внеклеточного матрикса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали биопластический материал, состоящий из 70 % коллагена, 29 % гиалуроновой кислоты и 1 % эластина. Материал был стабилизирован с помощью фотохимической сшивки (ультрафиолетовое излучение, $\lambda < 230$ нм, расстояние от источника до биоматериала – 30 см).

Для подготовки биоматериала к исследованиям отмеряли равные по размеру образцы (1х1 $см^2$) и оставляли их в растворе хлоргексидина биглюконата 0,05 % на 1 сут при температуре 4 °С.

Для равномерного распределения жидкости внутри пор материал дегазировали с помощью вакуумного насоса. Для предотвращения закисления ростовой среды в экспериментах образцы перемещали в культуральную среду DMEM на 2 – 3 ч, затем взвешивали.

При исследованиях стабильности биопластического материала образцы промокали сухой бумажной стерильной салфеткой для удаления излишней жидкости, помещали в чашки Петри известной массы и взвешивали на аналитических весах. Далее образцы помещали в чистую ростовую культуральную среду и оставляли в термостате при температуре 37 °С до 15 сут. Каждые 24 ч образцы взвешивали и рассчитывали потерю массы в процентах.

Для оценки цитотоксичности раневого покрытия клетки на 3 пассаже пассировали на чашки Петри из расчета $15х10^3$ клеток на 1 $см^2$ и культивировали клетки до образования 50 % монослоя. Далее на дно чашки Петри помещали подготовленные образцы материала размером 1х1 $см^2$ и переносили обратно в CO_2 инкубатор. С помощью инвертированного микроскопа (Leica DM IL LED) в течение 10 сут ежедневно визуально оценивали целостность монослоя, форму, размеры клеток и структуру клеток.

Исследование биосовместимости осуществляли методом прямого контакта в культуральных чашках Петри диаметром 3,5 см. На дно чашек помещали подготовленные образцы материала размера 1×1 $см^2$, а затем на него высевали суспензию клеток фибробластов в 0,5 мл культуральной среды, формируя на поверхности биоматериала каплю. Через 30 мин доливали 1,5 мл культуральной среды. Посевная доза составляла $25х10^3$ клеток/$см^2$. Чашки Петри с образцами оставляли в CO_2 инкубаторе (5 % CO_2, 37 °С). С помощью инвертированного фазово – контрастного микроскопа ежедневно визуально оценивали целостность монослоя, форму, размеры клеток и структуру клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физические свойства биоматериала характеризуются стабильностью в течение более чем 10 сут. Находясь в культуральной среде в CO_2 термостате при 37 °С материал деградирует постепенно, без фрагментарного распада образца (Рис. 1). В течение 5 сут масса раневого покрытия уменьшается на 15–20 %, а полная деградация происходит через 2 – 2,5 недели. В жидкости материал набухает и становится пластичным и эластичным, что позволит использовать раневое покрытие на поверхностях со сложным рельефом и подвижных участках кожи.

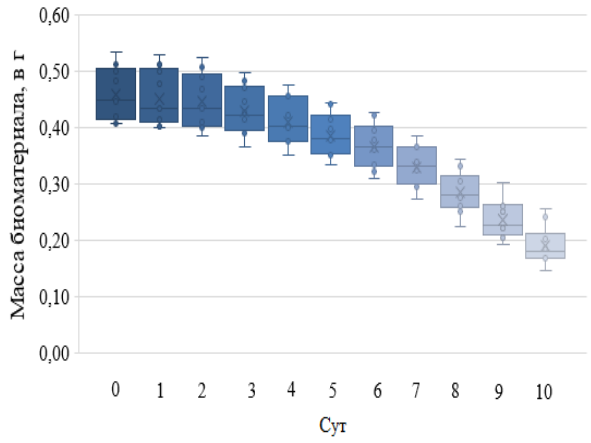


Рис. 1. График деградации биопластического материала

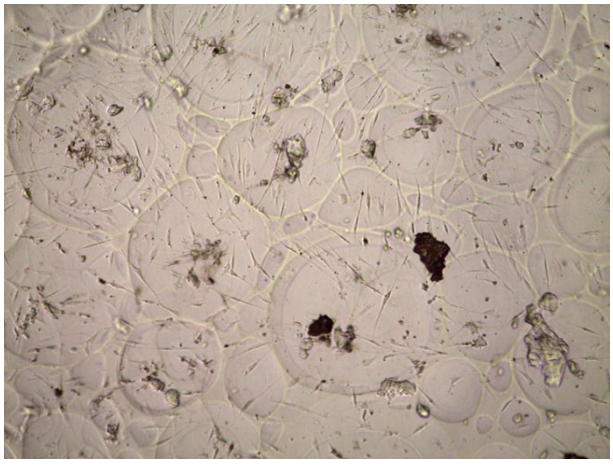


Рис. 2. Исследование раневого покрытия на цитотоксичность. 10 сутки культивирования. Световая микроскопия. Ув. × 50

Совместное культивирование биопластического материала с культурой клеток фибробластов человека показало отсутствие какого-либо цитотоксического действия на культуру клеток. В чашку Петри с 50-ти % монослоем вносили подготовленный образец биоматериала. Через 24 ч совместного культивирования отмечалось отсутствие слущенных клеток. Фибробласты равномерно были распределены по дну культуральной чашки. Морфофункциональные свойства клеток были сохранены:

фибробласты имели веретеновидную форму, цитоплазма была гомогенная и прозрачная без каких-либо включений, границы определялись, отмечалось наличие 2–4 длинных отростков.

Ядра располагались в цитоплазме ближе к периферии (эксцентрично) с равномерным распределением хроматина. Соединение клеток осуществлялось с помощью отростков, что приводило к формированию равномерного монослоя. После 72 ч инкубации, в культуральной жидкости отсутствовали десквамированные клетки, кроме того, отмечалось, что в присутствии образцов материала, пролиферативная активность клеток была выше, чем в группе контроля (Рис. 2).

Для изучения биосовместимости материала культуру клеток фибробластов человека культивировали на матриксе в течение 14 сут. После переноса клеток на матрикс прикрепленные фибробласты были замечены уже через 4 – 6 ч, а через 24 ч после прикрепления были обнаружены делящиеся клетки. Подсчет количества клеток осуществляли на изображениях горизонтальных проекций серии оптических срезов матрикса известной толщины. В первые сутки количество прикрепленных клеток составляло 440±84 клеток на мм^3. На 5 сут культивирования количество клеток возросло до 776±134 на мм^3, а на 10 сут наблюдалось максимальное количество клеток – 2155±335 на мм^3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный материал обладает биосовместимостью и отсутствием цитотоксического влияния. Исходные компоненты, а именно коллаген, эластин и гиалуроновая кислота, являются продуктами природного происхождения, и при разложении материала не оказывают токсического влияния на клетки организма. Раневое покрытие деградирует равномерно и может быть использовано без перевязок в течение 1 недели. Стоит отметить, что при изменении ряда параметров при получении материала, скорость деградации можно контролировать.

Работа выполнена при финансовой поддержке фонда «УМНИК – 18 (в)» (договор № 14612ГУ/2019 от 23.07.2019)

ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Н.А., Гулай Ю.С., Шагидулин М.Ю. Разработка имплантируемых клеточно- и тканеинженерных конструкций вспомогательной печени для лечения печёночной недостаточности // Гены и Клетки. 2015. Т. 10. № 1. С. 6–17;
2. Калюжная Л.И., Земляной Д.А., Товпеко Д.В. Анализ мирового опыта использования биоматериалов пуповины в тканевой инженерии и 3d-биопечати // Медицина и организация здравоохранения. 2019. Т. 4. № 1. С. 40–55;
3. Лившиц В.С. Полимерные покрытия на раны и ожоги (обзор) // Хим-фарм. Журнал. – 1998. – Т. 22, № 7. – С. 790–798;
4. Мелконян К.И., Бирюкова А.О., Улитина Н.Н. Компоненты внеклеточного матрикса в восстановлении поврежденных тканей: биохимические взаимодействия и протективный эффект // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2019. Т. 9. № 4. С. 55–62;
5. Мартюкова А.В., Куртукова М.О., Попрыга Д.В. Актуальные вопросы разработки матрицы для тканевой инженерии // Фундаментальные и научные исследования: теоретические и научные аспекты. 2017. Т. 2. № 1. С. 158–160;
6. Shtilman M.I., Mezhuev Y.O. Implanted and unimplanted medical and biological polymers // Fibre Chemistry. 2016. Т. 48. № 3. P. 249–252;
7. Севастьянов В.И. Сборник методических рекомендаций по оценке биосовместимых свойств искусственных материалов, контактирующих с кровью (под ред. Носковой Т.И., Новиковой С.П., Севастьянова В. И). Москва. 1990;
8. Щеблыкина А.В., Мищенко П.В., Кумейко В.В. Биосовместимые деградируемые материалы на основе пектинов для тканевой инженерии: местная реакция тканей при подкожной имплантации // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 2(52). С. 13–17;
9. Волкова И.М., Коровина Д.Г. Трехмерные матриксы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии // Биотехнология. 2015. Т. 31. № 2. С. 8–26;
10. Хотимченко Ю.С., Щеблыкина А.В., Кумейко В.В. Биосовместимые матриксные имплантаты на основе природных и синтетических полимеров как перспективные средства для терапии дегенеративных и посттравматических заболеваний центральной нервной системы // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. № 2(48). С. 54–60;
11. Штильман М.И. Биоматериалы – важное направление биомедицинских технологий // Вестник РГМУ. 2016. № 5. С. 4–15;

УДК 576.3

3D КО-КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И НОРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КАК МОДЕЛЬ РЕКРУТИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ В ОПУХОЛЬ

О.А. Ракитина[1], Д.А. Дидыч[1], Н.И. Игнатова[2], Г.В. Шаронов[2], А.И. Кузьмич[1]

[1] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

[2] НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий ПИМУ, Нижний Новгород, Россия

Опухолевая строма играет важную роль в формировании и развитии опухолей, а также может определять ответ опухоли на терапию. Одним из важных компонентов опухолевой стромы являются опухоль-ассоциированные фибробласты, или ОАФ. Эти клетки представляют собой рекрутированные в строму опухоли фибробласты, которые активируются раковыми клетками. В результате такой активации, фибробласты приобретают фенотип, характеризующийся пролиферацией, продукцией компонентов внеклеточного матрикса и его ремоделированием, а также выделением цитокинов и факторов роста, способствующих метастазированию опухоли. В связи с этим, взаимодействия раковых и стромальных клеток, в частности, ОАФ, сейчас активно изучаются, т. к. они могут стать перспективными прогностическими маркерами, а также мишенями противоопухолевой терапии [1,2]. Изучение взаимодействий раковых клеток и ОАФ in vivo может быть ограничено некоторыми факторами (низкое содержание ОАФ в опухоли; сложность выделения ОАФ из опухолей в связи с отсутствием генов-маркеров, однозначно определяющих ОАФ; расходы на содержание лабораторных животных и т. д.). В связи с этими ограничениями, разработка in vitro систем, моделирующих взаимодействие раковых клеток и ОАФ, является актуальной задачей. В данной работе было изучено, могут ли ко-культуры клеток колоректального рака и нормальных фибробластов кожи человека в трехмерном коллагеновом геле моделировать процесс рекрутирования фибробластов в опухоль, и зависят ли каким-то образом наблюдаемые фенотипические изменения от эпителиально-мезенхимальных свойств раковых клеток.

Для ко-культивации были выбраны две клеточные линии колоректального рака человека, с различным фенотипом – линия HT29 (эпителиальная [3]) и SW480 (мезенхимальная [3]). Фибробласты кожи (NF) метили флуоресцентным красителем CMFDA, после чего раковые клетки ко-культивировали с фибробластами кожи в трехмерном коллагеновом геле в течение 5 суток. Затем клетки извлекали из геля при помощи трипсина, окрашивали йодидом пропидия для дискриминации мертвых клеток, и разделяли раковые клетки и фибробласты с помощью FACS. В качестве контролей использовали культивированные в тех же условиях монокультуры раковых клеток и фибробластов. Из собранных популяций клеток выделяли РНК, которую подвергали RNA-seq анализу.

Анализ данных RNA-seq выявил, что при ко-культивации раковые клетки и фибробласты оказывают значительное влияние друг на друга. В раковых клетках HT29 в результате ко-культивации увеличивалась (более чем в 2 раза) экспрессия 2444 генов и уменьшалась (более чем в 2 раза) экспрессия 2702 генов. В раковых клетках SW480 в результате ко-культивации увеличивалась экспрессия 2652 генов и уменьшалась экспрессия 2171 генов. В NF из ко-культуры с HT29 в результате ко-культивации увеличивалась экспрессия 334 генов и уменьшалась экспрессия 135 генов. В NF из ко-культуры с SW480 в результате ко-культивации увеличивалась экспрессия 478 генов и уменьшалась экспрессия 219 генов. Функциональная аннотация ап-регулируемых генов на основе Gene Ontology Biological Processes позволила выявить, что в раковых клетках из обеих ко-культур существенно активируются процессы пролиферации и репарации ДНК, в то время как в фибробластах из обеих ко-культур активируются гены, связанные с ремоделированием внеклеточного матрикса, дифференцировкой мезенхимальных клеток, ответом на гипоксию и ранообразованием.

Дополнительно мы оценили уровень экспрессии генов, определяющих эпетелиально-мезенхимальные свойства клеток, с помощью EMT phenotype scoring, описанного в статье [4]. В качестве взвешивающих коэффициентов использовали коэффициенты, рассчитанные авторами [4] для колоректального рака. EMT phenotype scoring подтвердил существенно более эпителиальный фенотип HT29 по сравнению с SW480. При этом линия SW480 находится в промежуточном состоянии между HT29 и фибробластами кожи, т. е. она не до конца потеряла свои эпителиальные свойства. В результате ко-культивации существенных изменений экспрессии генов, определяющих эпетелиально-мезенхимальные свойства клеток, обнаружено не было.

Кроме того, был оценен уровень экспрессии известных генов-маркеров ОАФ. Из 24 найденных в литературе маркеров [5–12], экспрессия 4 (ACTA2, DES, POSTN и TNC) активировалась в фибробластах при ко-культивации с раковыми клетками. При этом более эпителиальная линия HT29 активировала экспрессию маркеров ОАФ в фибробластах сильнее, чем более мезенхимальная линия SW480.

В ходе анализа изменений уровня экспрессии генов, связанных с синтезом и ремоделированием внеклеточного матрикса (ВМ), было обнаружено, что при ко-культивации в раковых клетках подавлялась экспрессия генов, связанных с катаболизмом ВМ, в то время как в фибробластах активировались гены, связанные с биосинтезом и ремоделированием ВМ.

Наблюдаемые изменения экспрессии генов в фибробластах, согласно [13], соответствуют процессам, происходящим при рекрутировании новых фибробластов в опухоль. К этим процессам относятся активация экспрессии некоторых генов-маркеров ОАФ и образование плотного ВМ.

Таким образом, при ко-культивации в такой модели раковые клетки и фибробласты оказывают значительное влияние друг на друга. Такая модель может использоваться для изучения молекулярных механизмов, опосредующих взаимодействие раковых клеток и рекрутированных фибробластов в опухолевом микроокружении. Кроме того, на таких моделях можно тестировать различные терапевтические подходы, нацеленные на разрушение взаимодействия раковых клеток и ОАФ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17–00–00194 (17–00–00190).

ЛИТЕРАТУРА

1. Sverdlov, E. Missed Druggable Cancer Hallmark: Cancer–Stroma Symbiotic Crosstalk as Paradigm and Hypothesis for Cancer Therapy. BioEssays 2018, 40.
2. Alekseenko, I.V.; Chernov, I.P.; Kostrov, S.V.; Sverdlov, E.D. Are synapse-like structures a possible way for crosstalk of cancer with its microenvironment? Cancers (Basel). **2020**, 12, 1–16, doi:10.3390/cancers12040806.
3. Liu, Y.; Li, Y.; Hou, R.; Shu, Z. Knockdown GREM1 suppresses cell growth, angiogenesis, and epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. J. Cell. Biochem. **2019**, 120, 5583–5596, doi:10.1002/jcb.27842.
4. Mak, M.P.; Tong, P.; Diao, L.; Cardnell, R.J.; Gibbons, D.L.; William, W.N.; Skoulidis, F.; Parra, E.R.; Rodriguez-Canales, J.; Wistuba, I.I.; et al. A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Clin. Cancer Res. **2016**, 22, 609–620, doi:10.1158/1078–0432.CCR-15–0876.
5. Orr, B.; Riddick, A.C.P.; Stewart, G.D.; Anderson, R.A.; Franco, O.E.; Hayward, S.W.; Thomson, A.A. Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. Oncogene **2012**, 31, 1130–1142, doi:10.1038/onc.2011.312.
6. Shiga, K.; Hara, M.; Nagasaki, T.; Sato, T.; Takahashi, H.; Takeyama, H. Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. Cancers (Basel). 2015, 7, 2443–2458.
7. Christodoulou, I.; Goulielmaki, M.; Devetzi, M.; Panagiotidis, M.; Koliakos, G.; Zoumpourlis, V. Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytotherapy: A systematic review. Stem Cell Res. Ther. 2018, 9, 1–38.
8. Fukagawa, D.; Sugai, T.; Osakabe, M.; Suga, Y.; Nagasawa, T.; Itamochi, H.; Sugiyama, T. Protein expression patterns in cancer-associated fibroblasts and cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancers. Oncotarget **2018**, 9, 27514–27524, doi:10.18632/oncotarget.25518.
9. Su, S.; Chen, J.; Yao, H.; Liu, J.; Yu, S.; Lao, L.; Wang, M.; Luo, M.; Xing, Y.; Chen, F.; et al. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. Cell **2018**, 172, 841–856.e16, doi:10.1016/j.cell.2018.01.009.
10. Yeo, S.Y.; Lee, K.W.; Shin, D.; An, S.; Cho, K.H.; Kim, S.H. A positive feedback loop bi-stably activates fibroblasts. Nat. Commun. **2018**, 9, doi:10.1038/s41467–018–05274–6.
11. Wong, P.F.; Wei, W.; Gupta, S.; Smithy, J.W.; Zelterman, D.; Kluger, H.M.; Rimm, D.L. Multiplex quantitative analysis of cancer-associated fibroblasts and immunotherapy outcome in metastatic melanoma. J. Immunother. Cancer **2019**, 7, 194, doi:10.1186/s40425–019–0675–0.
12. Curtis, M.; Kenny, H.A.; Ashcroft, B.; Mukherjee, A.; Johnson, A.; Zhang, Y.; Helou, Y.; Batlle, R.; Liu, X.; Gutierrez, N.; et al. Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. Cell Metab. **2019**, 29, 141–155.e9, doi:10.1016/j.cmet.2018.08.007.
13. Emon, B.; Bauer, J.; Jain, Y.; Jung, B.; Saif, T. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis – A Mini Review. Comput. Struct. Biotechnol. J. 2018, 16, 279–287.

УДК 577.19

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С КАРНОЗИНОМ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

О.В. Космачевская, К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов

Институт биохимии им. А.Н. Баха,, Москва, Россия

Сердечно-сосудистые заболевания по распространенности занимают первое место. Для их лечения существует целый класс фармакологических препаратов, действие которых основано на выделении газа – оксида азота (NO). Это такие широко используемые препараты как нитроглицерин, нитропруссид и нитрит, образующие NO при восстановлении. К сожалению, эти вещества нестабильны, неспецифичны и токсичны. В настоящее время активно разрабатываются вещества, несущие «готовую к употреблению» молекулу NO – динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) [1]. Эти комплексы включают [Fe-$(NO)_2$] – фрагмент, связанный с различными лигандами, в качестве которых могут быть природные вещества (глутатион и цистеин) и синтетические. ДНКЖ с глутатионом и цистеином хорошо себя зарекомендовали в лечении таких сердечно-сосудистых заболеваний как гипертония, ишемия, инсульт [1]. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами являются основной рабочей формой оксида азота (NO) в организме, позволяющей депонировать NO и переносить его от места образования к биологическим мишеням [1]. Образование этих комплексов зарегистрировано в организме человека, животных, растений и бактерий. За 30-ти летнюю историю изучения ДНКЖ было показано, что они обладают широким спектром биологических активностей, которые обусловлены высвобождающимся при их распаде NO.

Помимо остатков цистеина лигандами ДНКЖ может быть имидазольная группа гистидина [2]. В литературе имеются данные о ДНКЖ, в состав которых входит имидазол и его производные [3, 4]. В организме низкомолекулярным гистидинсодержащим соединением является дипептид карнозин (бета-аланил-L-гистидин), который в высоких концентрациях (более 20 мМ) содержится в нервных и мышечных тканях [5]. Карнозин функционирует как нейротрансмитер, иммуномостимулятор, ранозаживляющий агент и может замедлять старение в культивированных клетках человеческих фибробластов [5, 6]. Кроме того, карнозин является внутриклеточным pH-буфером и обладает антиоксидантными свойствами [7, 8]. В связи с этим была поставлена задача изучить возможность образования связанных с карнозином ДНКЖ.

В формировании ДНКЖ участвует пул хелатируемого железа [9]. Однако по данным работы [10] карнозин не связывает ионы железа. Поэтому для получения комплексов использовали ДНКЖ с фосфатными лигандами (ДНКЖ-PO_4^-), которые нестабильны и служат донором Fe-(NO) – группы [11]. В этом случае был зарегистрирован синглетный сигнал ЭПР с g-фактором, равным 2,034, характерный для динитрозильных комплексов железа. Аналогичный сигнал возникал в реакционной смеси, содержащей карнозин и двухвалентное железо и донор нитроксила (HNO/NO–). При использовании в качестве донора NO PAPA/NONOate ДНКЖ образовывались в следовых количествах. Гистидин и имидазол в присутствии PAPA/NONOate также не формировали ЭПР-детектируемые ДНКЖ. Тем не менее, PAPA/NONOate является эффективным источником NO для других динитрозильных комплексов железа, например для ДНКЖ-PO_4^-. Это значит, что карнозиновые ДНКЖ образуются только при участии Fe-$(NO)_2$ группы или HNO/NO-Скорость формирования комплексов дозозависимо стимулировал метилглиоксаль (MG) – активное карбонильное соединение. Однако MG не влиял на образование комплексов при взаимодействии карнозина с ДНКЖ-PO_4^-. Было показано, что метилглиоксаль не реагирует с имидазолом, но взаимодействует с гистидином и карнозином. Поскольку в этом эксперименте характер спектра ЭПР карнозиновых ДНКЖ не меняется можно предположить, что MG либо не вызывает ковалентную модификацию карнозиновых лигандов, либо реагирует с химической группой удаленной от сайта связывания железа.

Одним из продуктов реакции карнозина с MG являются перекрестно-сшитые основания Шиффа, образующиеся в результате взаимодействия аминогрупп двух молекул карнозина с карбонильными группами MG. Образование последних было зарегистрировано в экспериментальной системе по максимуму поглощения при 334 нм, который характерен для азометиновой группы [12]. На основании полученных данных был сделан вывод, что перекрестно-сшитые основания Шиффа являются более эффективным лигандом при формировании ДНКЖ, чем индивидуальный карнозин (рис. 1).

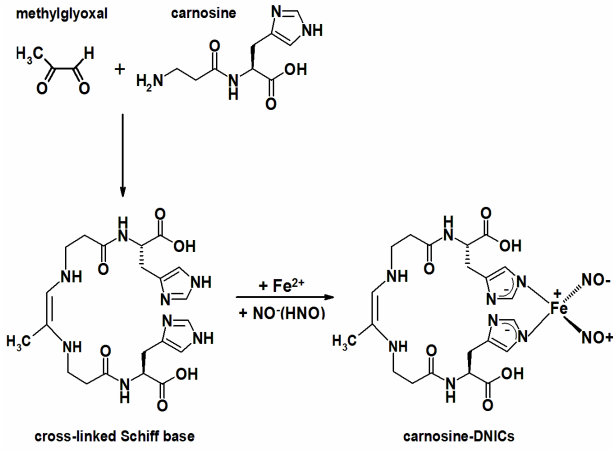


Рис. 1. Схема образования ДНКЖ, связанных с продуктами взаимодействия карнозина и метилглиоксаля (перекрестно-сшитые основания Шиффа)

Ранее нами было показано кооперативное антиоксидантное действие компонентов тиолсодержащих ДНКЖ [13–15]. Аналогичных свойств можно ожидать и от карнозиновых ДНКЖ, так как и карнозин и оксид азота могут перехватывать свободные радикалы. Действительно, карнозиновые ДНКЖ проявляли антиоксидантную активность, которая превышала активность входящих в их состав компонентов. Оценку антиоксидантных свойств производили в модельной системе по скорости восстановления оксоферрильной формы миоглобина (Mb^{IV}=O).

Мы предполагаем, что формирование карнозиновых ДНКЖ может быть одним из путей влияния карнозина на метаболизм и сигнальную функцию оксида азота и его производного – нитроксила.

Полученные динитрозильные комплексы железа с карнозином можно рассматривать как новый класс фармакологических препаратов с синергетическим терапевтическим действием, которые позволяют корректировать метаболизм оксида азота и защищать клетки при окислительном и нитрозативном стрессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19–29–12052).

ЛИТЕРАТУРА

1. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a «working form» of endogenous nitric oxide. // Nitric Oxide. 2016. 54. 15–29.
2. Boese M., Mordvintcev P.I., Vanin A.F., Busse R., Мьlsch A.J. S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex. // J. Biol. Chem. 1995. 270. 29244–29249.
3. Wang X., Sunderberg E.B., Li L., Kantardjieff K.A., Herron S.R., Lim M., Ford P.C. A cyclic tetra-nuclear dinitrosyl iron complex [Fe(NO)2(imidazolate)]4: synthesis, structure and stability. // Chem. Commun. 2005. 4. 477–479.
4. Tsai M.C., Tsai F.T., Lu T.T., Tsai M.L., Wei Y.C., Hsu I.J., Lee J.F., Liaw W.F. Relative binding affinity of thiolate, imidazolate, phenoxide, and nitrite toward the {Fe(NO)2} motif of dinitrosyl iron complexes (DNICs): The characteristic pre-edge energy of {Fe(NO)2}9 DNICs. // Inorg. Chem. 2009. 48. 9579–9591.
5. Reddy V.P., Garrett M.R., Perry G., Smith M.A. Carnosine: A versatile antioxidant and antiglycating agent. // Sci. Aging Knowl. Environ. 2005. 2005(18). 12.
6. Hipkiss A.R., Brownson C. Carnosine reacts with protein carbonyl groups: another possible role for the anti-ageing peptide? // Biogerontology. 2000. 1. 217–223.
7. Decker E.A., Livisay S.A., Zhou S.A. Re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine. // Biochemistry (Moscow). 2000. 65. 766–770.
8. Boldyrev A., Bulygina E., Leinsoo T., Petrushanko I., Tsubone S., Abe H. Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2004. 137. 81–88.
9. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: Physico-chemistry, biochemistry and physiology. // Nitric Oxide. 2009. 21. 1–13.
10. Decker E.A., Crum A.D., Calvert J.T. Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. // J. Agric. Food Chem. 1992. 40. 756–759.
11. Vanin A.F., van Faassen E. // Radicals for life: The various forms of nitric oxide. (van Faassen E., Vanin A.F., eds.) / Amsterdam: Elsevier, 2007. P. 19–74.
12. Yim H-S., Kang S-O., Hah Y-Ch., Chock P.B., Yim M.B. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. // J. Biol. Chem. 1995. 270. 28228□28233
13. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. // Methods in Enzymology. 2008. 436. 445–461.
14. Shumaev K.B., Dudylina A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria // Biofactors. 2018. 44. 3. 237–244.
15. Shumaev K.B., et al. Protective effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione in red blood cell lysis induced by hypochlorous acid. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019. 2019, Article ID 2798154, 12 pages.

УДК 581.134.4

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА КАК ИНСТРУМЕНТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

А.Ф. Топунов[1], О.В. Космачевская[1], Э.И. Насыбуллина[1], Н.Н. Новикова[2]

[1] Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН, Москва, Россия

[2] Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Для диагностики очень информативными являются данные о состоянии гемоглобина (Hb) и эритроцитов. Выделяют гемоглобинопатии – состояния, связанные с нарушением структуры и функционирования Hb. Наследственные гемоглобинопатии обусловлены мутациями в генах, кодирующих Hb, например, серповидно-клеточная анемия [1, 2]. Известно несколько сот аномальных Hb, но не все приводят к клиническим проявлениям [3]. Приобретенные связаны с действием различных соединений на Hb, в том числе при заболеваниях и действии токсикантов. Изменения структуры Hb могут приводить к нарушению кислородпереносящей функции и стабильности эритроцитов, а также затрудняют их прохождение по микрососудам. Патогенез гемоглобинопатий обусловлен связью между структурой Hb и свойствами эритроцита (форма, деформируемость, агрегация), что сказывается на гемолитической устойчивости и реологических свойствах крови. Опишем некоторые модифицированные формы Hb и процессы, приводящие к этим изменениям.

Восстановление и окисление гемоглобина и метгемоглобинемия. Гемоглобины поддерживаются в физиологически активном восстановленном состоянии (с 2-валентным железом гема) благодаря NADH- и NADPH-зависимыми редуктазам [4–6]. При недостаточной активности редуктаз проявляется такое заболевание, как метгемоглобинемия, когда заметная доля Hb находится в окисленном состоянии. Заболевание может быть наследственным, или вызываться некоторыми соединениями [5–7]. Второй вид в англоязычной литературе традиционно называется «drug» (лекарственным), поскольку к нему может привести применение многих лекарственных препаратов.

Еще в 1959 г. было показано, что в эритроцитах больных наследственной метгемоглобинемией недостаточно активен фермент, восстанавливающий окисленный MetHb с NADH в качестве донора электронов [8] – метгемоглобинредуктаза (мет-Hb-редуктазы). Она восстанавливает MetHb при участии цитохрома b_5 как промежуточного переносчика электронов. Показана идентичность мет-Hb-редуктазы эритроцитов и цитохром b_5-редуктазы других тканей [9], и они внесены в номенклатуру ферментов под одним названием – NADH: феррицитохром b_5-оксидоредуктаза (К.Ф. 1.6.2.2.).

Большое распространение метгемоглобинемии обнаружено у эскимосов и индейцев-атабасков Аляски, и у индейцев навахо. В России она отмечена в виде эндемических очагов в Якутии в бассейне реки Вилюй [7]. У коренных жителей (якутов-саха) очень высокое распространение этого заболевания: 1:5700 человек. Накопление заболевания могло произойти благодаря «эффекту основателя» – ограниченной репродуктивной численности у предковых изолированных популяций.

Существует два типа недостаточности мет-Hb-редуктазы: «эритроцитарный» – только в эритроцитах, и «основной», когда она наблюдается и в других тканях. Еще одна энзимопатия – дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (фабизм) является фактором риска для приобретенной метгемоглобинемии, поэтому популяции, для которых она характерна (средиземноморского и африканского происхождения), обладают повышенным риском для проявления заболевания.

Взаимодействие с оксидом азота и его производными. Гемоглобины способны взаимодействовать с активными формами кислорода (АФК) и азота (АФА), то есть функционировать в условиях окислительного и нитрозативного стрессов. Считается, что первоначальной функцией Hb ыла защита клеток от нитрозативного стресса и модулировании сигнальной функции NO, поэтому общей для большинства известных Hb является реакция превращения NO в NO_3. У животных NO образуется благодаря NO-синтазной реакции, при окислении L-аргинина в L-цитруллин. Поскольку для окисления L-аргинина нужен O_2, реакция ингибируется при гипоксии. В то же время дефицит O_2 активизирует работу нитритредуктазных систем, в том числе связанных с Hb и миоглобином (Mb). При гипоксии восстановление ионов NO_2 – до NO в крови и тканях идет с помощью деоксигенированных Hb (deoxyHb) и Mb (deoxyMb). Mb проявляет NO-диоксигеназную активность и защищает митохондриальную цитохром с-оксидазу от инактивации оксидом азота как в скелетных и сердечных мышцах, где Mb много, так и в гладких, где его намного меньше [10–13]. То есть Mb не только генерирует NO при гипоксии [14], но и окисляет до NO_3 – при обычной концентрации O_2.

Hb-SNO (у которого NO присоединен к цистеину) оказывает сосудорасширяющее действие и усиливает кровоток в сосудах [15]. Доля образующихся нитрозогемоглобина (HbNO) и Hb-SNO зависит от насыщения Hb кислородом. Предполагается, что deoxyHb может работать как S-нитрозотиол-синтаза, используя в качестве субстрата нитрит [16]. Есть еще один путь связывания NO с Hb, помимо железа гема и цистеина β93. На тиольной группе этого цистеина могут формироваться динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) [17, 18]. Мы показали, что Hb-ДНКЖ действуют как сайт-специфические антиоксиданты, защищающие белок от окислительной модификации [19, 20]. Таким образом, HbNO, Hb-SNO и ДНКЖ образуют пул депонированного NO в организме.

Взаимодействие с активными формами кислорода. Важным является и взаимодействие Hb с пероксидом водорода (H_2O_2) и другими АФК, поскольку Hb проявляет пероксидазную активность и может инициировать свободнорадикальное окисление биомолекул под действием H_2O_2 [21]. При реакции оксиHb с избытком H_2O_2 происходит быстрое образование metHb. Он может образовываться и в результате автоокисления Hb. Взаимодействие оксигенированного Hb (HbO_2) и metHb с H_2O_2 может протекать через образование феррил-формы Hb {Гем+• (FeIV) – OH} со свободным радикалом на порфириновом кольце. Эта форма нестабильна, характеризуется высокой окисляющей активностью и индуцирует реакции свободнорадикального окисления липидов. При этом образуются алкоксильные (RO•) и алкилпероксильные (ROO•) радикалы и гидроперекиси липидов (ROOH), которые также могут окислять metHb с образованием новых порций феррил Hb. Нами совместно с Институтом физико-химической медицины, Белорусским госуниверситетом и НПЦ «Кардиология» (Минск) разработан удобный спектрофотометрический метод определения пероксидазной активности Hb [22].

При автоокислении oxyHb образуется супероксид-анион-радикал O_2•–, который при взаимодействии с NO образует сильный окислитель пероксинитрит (ONOO–), для которого гемопротеиды являются основными мишенями. Его взаимодействие с oxyHb и oxyMb приводит к образованию мет-форм, повреждению порфиринового кольца, нитрованию тирозина, выходу гема из гидрофобного кармана, его высвобождению и разрушению [23].

Гликозилирование гемоглобина – связывание с активными карбонильными соединениями, в том числе с сахарами. Hb был первым белком, для которого был описан этот процесс [24], и была показана его взаимосвязь с диабетом [25]. Гликозилированный Hb человека типа А обозначается как HbA1. Эта фракция естьи у здоровых людей (5–7 %) [26]. В зависимости от природы сахара, связанного с Hb, различают субфракции HbA1. HbA1a1 образуется в результате взаимодействия с фруктозо – 1,6 – дифосфатом, HA1a2 – глюкозо-6-фосфатом, HbA1c – глюкозой [27].

Неферментативное гликозилирование, это химическая конденсация белка с моносахаридом и дальнейшее превращение этого соединения. Альдегидная группа глюкозы соединяется с аминогруппой аминокислот, образуется альдимин или Шиффово основание, которое подвергается перегруппировке Амадори с образованием стабильной кетоаминной формы – конечного продукта гликозилирования, остающегося в эритроцитах до конца их жизни. Как правило, местом гликозилирования Hb является аминная группа N-концевой аминокислоты (валин) обеих β-цепей гемоглобина А (HbA1c). Есть данные, что углеводы способны присоединяться и к ε-аминогруппе остатков лизина как α-, так и β-цепей [28]. Доля гликозилированных белков повышается при таких заболеваниях, как сахарный диабет, галактоземия, мелитурия (повышенная экскреция углеводов с мочой), атеросклероз и др. [27], при этом содержание HbA1c является маркером нарушений углеводного обмена [29]. При окислении сахаров пероксидом водорода или пероксинитритом могут образовываться и продукты «пост-Амадори» с желто-коричневой окраской, что приводит к конформационным перестройкам и фрагментации белка [30]. К этим продуктам относятся глиоксаль, метилглиоксаль и 3-дезоксиглюкозоны, их накопление приводит к карбонильному стрессу. Функционирование одного из самых активных АКС – метилглиоксаля описано в обзоре [31].

Особый интерес представляет модификация Hb при одновременном действии АФА и активных карбонильных соединений (АКС), т. е. при карбонильном стрессе. Мы показали, что при этом возможно образование и нитрозо-, и нитриHb, причем появление той или иной модификации зависит и от соотношения действующих агентов, и от условий реакции [32, 33].

Взаимодействие с сульфидами. При поступлении H_2S и сульфидов в организм они могут связываться с гемом Hb с образованием сульфгемоглобина (sulfHb) [34]. Сульфгемоглобинемия может быть и следствием приема некоторых лекарств (сульфонамидов, фенасетина, ацетанилида) [35]. В нормальной крови sulfHb отсутствует, при патологиях его концентрация – в диапазоне 1–10 % [36]. Hb человека может связывать сульфиды и по остатку Цис-93 β-цепей.

Взаимодействие с «необычными» лигандами. Гемоглобины могут формировать прочные комплексы и с другими молекулами, например, с гетероциклическими соединениями с атомом азота в гетероцикле, в частности, с изохинолином и никотиновой кислотой, а также с алкилизоцианидами и нитрозоароматическими соединениями: нитрозобензолом [37] и нитрозотолуолом, при этом нитрозобензол связывается как с железом гема, так и с белком [38]. Комплексы с Hb могут образовывать и алкильные радикалы: метильный, этильный, п-пропильный, трет-бутильный, изобутильный [39]. Группой веществ, связывающихся с глобином, являются производные пиридоксаля и имидазол [40, 41]. Комплексы образуются в случае присутствия соответствующих соединений в среде и при связывании некоторых лекарственных препаратов. Они были обнаружены в крови людей, работавших на химических заводах, как результат хронического отравления [38].

Мембраносвязанный гемоглобин (MBHb), является одним из индикаторов состояния эритроцитов, который несмотря на это мало используется в диагностике. Связывания эритроцитарного Hb с мембранами было описано при получении теней эритроцитов гипотоническим лизисом [42]. Доля MBHb, определенная разными авторами, обычно составляла от 3 до 5 %, хотя разброс мог быть и 1–10 %. [43, 44], что можно объяснить использованием разных методов.

Главным путем взаимодействия Hb с мембранами является обратимое электростатическое связывание deoxyHb по цитоплазматическому домену анионтранспортного белка полосы 3 (CDB3) [45–48]. Также возможна адсорбцию к мембранным липидам с помощью гидрофобных взаимодействий. Необратимым является ковалентное связывание Hb с компонентами мембраны из-за действия окислительных агентов, вызывающих образование свободных радикалов и оксоферрильной формы Hb, инициирующих перекисное окисление липидов [49, 50]. Доля необратимо связанного Hb возрастает при серповидно-клеточной анемии и талассемии. Связывание Hb с мембранами имеет множественное биологическое значение. Это регуляция метаболизма глюкозы и свойств цитоскелета в зависимости от концентрации O_2, формирование сигнала о повреждении или старении эритроцита, и участие в сигнальном пути гипоксической вазодилатации. Перечисленные функции Hb реализует при участии CDB3. Обратимое связывание Hb с мембранами может быть адаптивной реакцией, направленной на стабилизацию липидного бислоя мембран и регуляцию его упруго-механических свойств. Эритроциты участвуют в регуляции капиллярного кровотока и локального внутрисосудистого давления. MBHb влияет на эритрокринную функцию эритроцитов – участие в метаболизме сигнальных метаболитов. DeoxyHb, связанный с CDB3, восстанавливает нитрит-ионы и является источником NO [51]. MBHb имеет более высокое сродство к O_2, низкий коэффициент Хилла и более высокую пероксидазную активность [52].

Нами разработана спектрофотометрическая методика определения MBHb, при которой определяется Hb, связанный с тенями эритроцитов после гемолиза клеток. Hb определяется в щелочном растворе пиридина [53, 54], с переводом Hb в пиридингемохромоген – удобную для детекции форму. Методика позволяет определять < 0,1 % MBHb в пробе [55]. Она испытана на эритроцитах и цельной крови пациентов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Показано повышение доли MBHb у онкобольных после хемотерапии, Установлен диапазон нормальных значений MBHb: 3,3 % – 4,9 %, соответствующий гемолитической устойчивости эритроцитов. Мы предлагаем использовать MBHb как дополнительный показателя при диагностике.

Взаимодействие с металлами. Известно, что белки при нарушении структуры образуют неспецифические комплексы с переходными металлами со сниженной функциональной активностью. Прогрессирующее образование таких комплексов наблюдается при хроническом окислительном стрессе, старении и эндогенных интоксикациях, в том числе при многих заболеваниях [56, 57]. Нами было показано, что в условиях, моделирующих интоксикацию мочевиной, значительно возрастает связывание гемоглобином ионов Zn и Fe. Окислительный стресс ускоряет этот процесс [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно 12 генов, кодирующих различные Hb человека, некоторые действуют постоянно, другие сменяются в процессе развития. В организме можно обнаружить и продукты посттрансляционных модификаций Hb. Мы предложили термин «ГемоглобинОм», объединяющий все формы Hb, присутствующие в организме [59]. Эритроциты являются датчиками метаболического состояния крови, способными аккумулировать повреждения, поскольку время их жизни ~120 дней. Наиболее удобными являются показатели, связанные с Hb, которые могут быть использованы и в компьютерной диагностике. Нами совместно с кафедрой компьютерных медицинских систем НИЯУ «МИФИ» и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина ведется работа над компьютерной экспертной системой «BLOOD» для диагностики анемий и гемоглобинопатий [60], предложена пилотная версия системы, подтверждено, что она реализует заявленные функции. Система является инструментом поддержки принятия решений при диагностике, возможна ее реализация как автоматизированного программно-информационного комплекса и для обучения медицинского персонала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19–29–12052).

ЛИТЕРАТУРА

1. Perutz M.F., Liquori A.M., Eirich F. // Nature. 1951. V. 167(4258). P. 929–931.
2. Ingram V. // Nature. 1956. V. 178(4537). P. 792–794.
3. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т.45(6). С. 627–653.
4. Топунов А.Ф., Голубева Л.И. // Успехи биологической химии. 1989. Т. 30. С. 239–252.
5. Топунов А.Ф., Петрова Н.Э. // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 199–228.
6. Топунов А.Ф., Космачевская О.В. // Биомика. 2018. Т.10(3). С. ф251–267.
7. Наследственные анемии и гемоглобинопатии. М.: Медицина. 1983. 336 с.
8. Scott E.M., Griffith I.V. // Biochim. Biophys. Acta. 1959. V. 34. P. 584–586.
9. Kuma F., Prough R.A., Masters B.S.S. // Arch. Biochem. Biophys. 1976. V. 172(2). P. 600–607.
10. Qiu Y., Sutton L., Riggs A.F. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273(36). P. 23426–23432.
11. Ascenzi P., Brunori M. // Biochem. Mol. Biol. Edu. 2001. V. 29(5). P. 183–185.
12. Kreutzer U., Jue T. // J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004. V. 286(3). P. H985 H991.
13. Rassaf T., Flogel U., Drexhage C., Hendgen-Cotta U., Kelm M., Schrader J. // Circ. Res. 2007. V. 100(12). P. 1749–1754.
14. Rifkind J., Nagababu E., Ramasamy S. // Antioxid. Redox Signal. 2006. V. 8(7–8). P. 1193–1203.
15. Stamler J.S., et al.. // Science. 1997. V. 276(5321). P. 2034–2037.
16. Angelo M., Singel D., Stamler J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103(22). P. 8366–8371.
17. Vanin A.F., Serezhenkov V.A., Mikoyan V.D., Genkin M.V. // Nitric Oxide. 1998. V. 2(4). P. 224–234.
18. Gow A.J., et al.. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96(16). P. 9027–9032.
19. Shumaev K.B., et al. // Nitric Oxide. 2008. V. 18(1). P. 37–46.
20. Shumaev K.B., et al. // Methods in Enzymology. 2008. V. 436. P. 445–461.
21. Reeder B., Wilson M. // Curr. Med. Chem. 2005. V. 12(23). P. 2741–2751.
22. Григорьева Д.В., et al. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2013. Т. 155(1). С. 129–132.
23. Alayash A.I., Ryan B.A., Cashon R.E. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 349(1). P. 65–73.
24. Kunkel H.G., Wallenius G. // Science. 1955. V. 122(3163). P. 288.
25. Rahbar S. // Clin. Chim. Acta. 1968. V. 22(2). P. 296–298.
26. Dolhofer R., Renner R., Wieland O.H. // Diabetologia. 1981. V. 21(3). P. 211–215.
27. Галенок В.А., et al.Гликозилированные протеины. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. 1989. 258 с.
28. Shapiro R., Mc Manus M.J., Zalut C., Bunn H.F.J. Biol. Chem. 1980. V. 255(7). P. 3120–3127.
29. Fluckiger R., Berger W., Winterhalter K.H. Diabetologia. 1977. V. 13. P. 393–396.
30. Yim H. – S., Kang S. – O., Hah Y-C., Chock P.B., Yim M.B. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270(47). P. 28228–28233.
31. Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53(3). С. 253–270.
32. Kosmachevskaya O.V., et al.. // Hemoglobin. 2013. V. 37(3). P. 205–218.
33. Kosmachevskaya O.V., et al.// Clin. Chem. Lab. Med. 2014. V. 52(1). P. 161–168.
34. McCutcheon A.D., Melb M.D., Flack E.H. // Lancet. 1960. V. 276(7144). P. 240–242.
35. Park C.M., Nagel R.L. // N. Engl. J. Med. 1984. V. 310(24). P. 1579–1584.
36. Discombe G. // Lancet. 1960. V. 276(7146). P. 371–372.
37. Murayama M. // J. Biol. Chem. 1960. V. 235(4). P. 1024–1028.
38. Scheler W. // Acta Biol. Med. Germ. 1960. V. 5. P. 382–397.
39. Talbot B., Brunori M., Antonini E., Wyman J. // J. Mol. Biol. 1971. V. 58(1). P. 261–276.
40. Benesch B.R., Benesch R.E. // Methods Enzymol. 1981. V. 76. P. 147–159.
41. Андреюк Г.М., Кисель М.А. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23(4). С. 290–293.
42. Anderson H.M., Turner J.C. // J. Clin. Invest. 1960. V. 39(1). P. 1–7.
43. Nash G.B., Meiselman H.J. // Biophys. J. 1983. V. 43(1). P. 63–73.
44. Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х. // Биофизика. 1990. Т. 35(6). С. 1019–102012.
45. Shaklai N., Yguerabide J., Ranney H.M. // Biochemistry. 1977. V. 16(25). P. 5593–5597.
46. Fung L.W. // Biochemistry. 1981. V. 20(25). P. 7162–7166.
47. Eisinger J., Flores J., Salhany J.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79(2). P. 408–412.
48. Sega M.F., Chu H., Christian J., Low P.S. // Biochemistry. 2012. V. 51(15). P. 3264–3272.
49. Shaklai N., Ranney H.R. // Isr. J. Med. Sci. 1978. V. 14(11). P. 1152–1156.
50. Kriebardis A.G., et al.. // J. Cell. Mol. Med. 2007. V. 11(1). P. 148–155.
51. Salhany J.M. // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 6059–6072.
52. Tsuneshige A., Imai K., Tyuma I. // J. Biochem. 1987. V. 101(3). P. 695–704.
53. Riggs A. // Methods Enzymol. 1981. V. 76. P. 5–29.
54. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43(3). С. 347–353.
55. Насыбуллина Э.И., et al.// Труды Карельского научного центра РАН. 2018. № 4. С. 93–104.
56. Wang W., Kuzmenko I., Vaknin D. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2014. V. 16. P. 13517–13522.
57. Reeg S., Grune T. // Antioxid Redox Signal. 2015. V. 23. P. 239–255.
58. Новикова Н.Н., et al.// Кристаллография. 2019. Т. 64(6). С. 945–951.
59. Топунов А.Ф., et al.. // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2013. С. 150–152.
60. Насыбуллина Э.И., Ник et al.. // Краткие сообщения по физике. 2015. Т. 42(7). С. 22–27.

УДК 577.19

ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА ГЕМОГЛОБИН ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПЕРОКСИНИТРИТОМ

Э.И. Насыбуллина, О.В. Космачевская, К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов

Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются основной рабочей формой оксида азота (NO) в организме, осуществляющей депонирование NO и его перенос от места образования к биологическим мишеням [1–4]. Образование этих комплексов было зарегистрировано в организме человека, животных, растений и бактерий. За 30-ти летнюю историю активного изучения ДНКЖ было показано, что они обладают широким спектром биологических активностей, которые обусловлены высвобождающимся при их распаде NO.

Низкомолекулярные ДНКЖ в живых системах в качестве лигандов, как правило, содержа цистеин и глутатион [3, 4]. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ-GS) образуются в организме человека в качестве стабильных доноров NO. ДНКЖ-GS всегда существуют в равновесии с белок-связанными ДНКЖ, которые, как правило, формируются при участии белковых тиолов.

Ранее было показано, что помимо участия в метаболизме NO, ДНКЖ могут функционировать как антиоксиданты. В частности, антиоксидантное действие ДНКЖ-GS было продемонстрировано на гемоглобине (Hb) и миоглобине. ДНКЖ защищали входящие в их состав тиоловые группы от окисления [5, 6], восстанавливали оксоферрил-форму миоглобина до нетоксичной метформы [7]. Защитное действие ДНКЖ по отношению к SH-группам было продемонстрировано и на пептиде глутатионе при его окислении HOCl [8]. Также была показана способность ДНКЖ-GS защищать эритроциты от HOCl-индуцированного гемолиза [8].

Поскольку в эритроцитах есть пул лабильного железа и высока концентрация глутатиона, то вероятно образование ДНКЖ, связанных с SH-группой глутатиона и Cys-93β гемоглобина [5, 6]. Как известно, в крови основной мишенью действия пероксинитрита ($ONOO^-$) является гемоглобин [9]. Все эти факты послужили предпосылкой для планирования исследования по изучению влияния низкомолекулярных и связанных с белком ДНКЖ на окислительную модификацию гемоглобина пероксинитритом. Источником пероксинитрита в крови являются макрофаги. Также этот окислитель может образовываться в самих эритроцитах в условиях гипоксии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что ДНКЖ способны перехватывать тиильные радикалы с образованием нерадикальных интермедиатов. С другой стороны, эти комплексы могут связывать $ONOO^-$ с участием железа и катализировать реакцию нитрования аминокислотных остатков или липидов, таким образом останавливая реакции свободнорадикального окисления.

Принимая это во внимание, мы решили исследовать способность ДНКЖ ингибировать реакцию восстановления дигидродамина (DHR123) пероксинитритом, образуемым в ходе декомпозиции SIN-1. Были исследованы ДНКЖ, содержащие фосфатные ионы и глутатион в качестве лигандов. ДНКЖ-GS и ДНКЖ-PO_4 – в равной степени тормозили окисление DHR123.

Низкомолекулярные глутатионовые ДНКЖ и связанные с Hb оказывали выраженное ингибирующее действие на окислительную модификацию Hb пероксинитритом. Связанные с Hb ДНКЖ защищали белок в широком диапазоне концентраций $ONOO^-$ от 0,38 до 4,20 мМ, что соответствует молярному соотношению Hb : $ONOO^-$ – от 1 : 2,5 до 1 : 28 (для тетрамера). При концентрации $ONOO^-$ – 1 мМ (1 : 6,5) карбонильных производных Hb-ДНКЖ образовывалось на 80 % меньше по сравнению с контрольным образцом белка, содержащим свободные SH-группы. Еще более выраженное защитное действие на белок оказывали ДНКЖ-GS. Поскольку раствор ДНКЖ-GS содержит восстановленный глутатион был поставлен эксперимент по влиянию GSH на окислительную модификацию Hb. Защитный эффект GSH при концентрации $ONOO^-$ – 1 мМ (1 : 6,5 мМ) составлял 30 % по сравнению с контролем. Это указывает на то, что протекторное действие ДНКЖ-GS обусловлено не только входящим в их состав глутатионом. Кривые, отражающие зависимость образования карбонильных производных от концентрации окислителя, в присутствии ДНКЖ имели двухфазный характер: при низких концентрациях $ONOO^-$ образование карбонильных производных происходило медленно, начиная с концентрации 1,6 мМ – интенсивно. Вероятно, этот эффект связан с высвобождением железа из распавшихся ДНКЖ, которое участвует в генерации свободных радикалов в ходе реакции Фентона.

Как известно, основной мишенью действия ONOO – на гемопротеиды является гемовая группа. В наших экспериментах ДНКЖ как связанные с белком, так и низкомолекулярные, препятствовали разрушению гемовой группы. В контрольных образцах доля разрушенного гема находилась в прямой зависимости от концентрации окислителя. При концентрации ONOO – 4,2 мМ разрушалось 50 % гемов, в то время как в присутствии ДНКЖ – только 25 %.

Известно, что разрыву порфиринового кольца предшествует стадия образования оксоферрил-формы гемоглобина (Hb-Fe^{IV}=O). В образовании оксоферрилHb ключевую роль играет гемовое железо, которое катализирует гомолиз O-O связи в комплексе Hb-Fe^{III}-ONOO– [10]. В наших экспериментах мы наблюдали появление оксоферрил-формы во всех вариантах белка по снижению поглощения при 630 нм и возрастанию при 530 и 560 нм. Стоит отметить, что в оксоферрил-форму переходила только часть гемоглобина и при концентрациях ONOO – более 1 мМ, т. е. в условиях избытка окислителя.

Защитное действие ДНКЖ можно объяснить, исходя из нескольких возможностей. Во-первых, ДНКЖ выступают донорами NO, который может вступать в реакцию с Hb-Fe^{IV}=O с образованием комплекса Hb-Fe^{III}-ONO, распадающегося далее до нитрита и ферри-формы Hb [11]: Hb-Fe^{IV}=O + NO $\rightarrow$ Hb-Fe^{III}-ONO $\rightarrow$ Hb-Fe^{III} + NO_2. В работе [7] был предложен аналогичный механизм для взаимодействия ДНКЖ-GS с Hb-Fe^{IV}=O: Hb-Fe^{IV}=O + $(GS–)_2$–Fe±$(NO+)_2$ $\rightarrow$ Hb-Fe^{III} + $(GS–)_2$ – Fe^2±(NO+)ONO. Интермедиат Hb-Fe^{III}-ONO в присутствии низкомолекулярных тиолов вновь восстанавливается в динитрозильные комплексы железа. Таким образом, ДНКЖ выступают как катализаторы восстановления оксоферрилгема тиолами. Во-вторых, включение ионов железа, высвободившихся при распаде гема, в состав ДНКЖ, препятствует их участию в катализе гомолитического расщепления пероксинитрита с образованием свободнорадикальных продуктов. В-третьих, ДНКЖ могут непосредственно взаимодействовать с органическими свободными радикалами [7]. Это сопровождается необратимой деструкцией комплексов и образованию интермедиатов – нитроорганических соединений.

Оксоферильная форма гема является очень сильным окислителем, модифицирующим белковую цепь гемопротеидов [12]. При этом в результате одноэлектронного окисления остатков тирозина формируются феноксильные радикалы. В гемоглобине окислению подвергаются остатки тирозинов Tyr42 и Tyr24. Поэтому было проведено спектрофлуориметрическое исследование тирозиновых остатков под действием пероксинитрита. Судьба тирозинового радикала может быть различной. С одной стороны, в реакции двух тирозиновых радикалов образуется димер 3,3'-дитирозин, который можно детектировать по увеличению интенсивности флуоресценции при 400 нм. В контрольном варианте и в Hb-ДНКЖ флуоресценция возрастала с увеличением концентрации ONOO – Однако начиная с концентрации 1,6 мМ флуоресценция в Hb-ДНКЖ начала снижаться, что может быть связано с образованием 3-нитрозотирозина, который впоследствии трансформируется в 3-нитротирозин.

В экспериментах с GS-ДНКЖ результаты были иные. Флуоресценция возрастала только начиная с 1,6 мМ ONOO – Этот лаг-период в окислении тирозиновых остатков можно объяснить действием примесного глутатиона в образцах GS-ДНКЖ, который является эффективным перехватчиком NO_2• ($k = 5{,}3 \times 10^6$ $M^{-1}c^{-1}$) [13]. К тому же глутатион может непосредственно восстанавливать пероксинитрит по двухэлектроному механизму и радикалы тирозина.

В Hb помимо тирозинов мишенью атаки ONOO – является триптофан [14]. Поэтому на следующем этапе была изучена зависимость интенсивности испускания флуоресценции триптофана при 327 нм от концентрации ONOO – В контрольном варианте Hb интенсивность флуоресценции линейно уменьшалась, что свидетельствует об окислении / нитровании триптофановых остатков. В остальных вариантах при низких концентрациях окислителя флуоресценция возрастала и только начиная с концентрации 1,6 мМ начиналось уменьшение. Причем в вариантах с GS-ДНКЖ возрастание флуоресценции было более выражено, чем в варианте Hb-ДНКЖ. Этим фактам можно дать следующее объяснение. При определенных концентрациях окислителя белок претерпевает конформационные перестройки, затрагивающие окружение остатка триптофана, что сказывается на флуоресцентных характеристиках белка.

В реакции с пероксинитритом возможно также образование нитротриптофана по двум механизмом с участием пероксиазотистой кислоты и активированного промежуточного продукта ONOOH*, образующегося из транс-пероксиазотистой кислоты [15]. Эта реакция стимулируется присутствием металлов.

Восстановление феррильного интермедиата в результате реакции с близкорасположенными аминокислотами, такими как тирозин, цистеин или триптофан, может привести к образованию радикалов аминокислотных остатков, которые способствуют возникновению межмолекулярных поперечных связей и формированию агрегатов белка [10].

Образование агрегатов белка под действием $ONOO^-$ регистрировали с помощью денатурирующего SDS электрофореза в 12 % ПААГ в невосстановительных и восстановительных (с дитиотреитолом) условиях. Анализ электрофореграмм показал, что в случае контрольного варианта во всем диапазоне концентраций $ONOO^-$ происходило дозозависимое образование димеров Hb и высокомолекулярных агрегатов. При концентрациях $ONOO^-$ (2,6 мМ и 4,2 мМ) агрегация была настолько сильной, что белок даже не проникал в концентрирующий гель. В случае, если SH-группы были включены как лиганды в ДНКЖ, агрегация белка происходила только при концентрации $ONOO^-$ (2,6 мМ и 4,2 мМ) и в меньшей степени, чем в контрольном образце. В эксперименте с GS-ДНКЖ степень сшивания белка была практически такой же как в Hb-ДНКЖ. Следует отметить, что дитиотреитол не влиял на агрегацию молекул Hb. Это означает, что вклад дисульфидных связей в агрегацию белка незначителен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДНКЖ с фосфатными и глутатионовыми лигандами тормозят окисление дигидродамина пероксинитритом. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами и связанные с гемоглобином эффективно защищают белок от окислительной модификации: препятствуют образованию карбонильных производных, окислению триптофановых и тирозиновых остатков, деградации гемовой группы, а также образованию межбелковых сшивок.

На основе полученных результатов можно сделать Заключение, что ДНКЖ низкомолекулярные и связанные с белком являются акцептором пероксинитрита. Образование связанных с гемоглобином ДНКЖ можно рассматривать как защитную посттрансляционную модификацию, направленную на стабилизацию белковой молекулы в условиях окислительного и нитрозативного стресса.

Полученные результаты согласуются с ранее установленными фактами, демонстрирующими способность ДНКЖ, связанных с Cys-93β гемоглобина, защищать их от окислительной модификации, вызванной гидропероксидами [5, 6]. Мы предполагаем, что действие ДНКЖ антиоксидантное в реакциях окисления и каталитическое в реакции нитрования является сайт-специфическим. Иными словами, эти комплексы защищают и нитруют определенные аминокислотные остатки в белке. Поэтому формирование ДНКЖ на белках можно считать способом регуляции проведения редокс-сигнала в клетке.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 19–015–00444, №19–29–12052).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsai M. et al.. Dinitrosyl Iron Complexes (DNICs): From Biomimetic Synthesis and Spectroscopic Characterization toward Unveiling the Biological and Catalytic Roles of DNICs. // Acc. Chem. Res. 2015. 48. 4. 1184–1193.
2. Hsiao H.Y., et al.. Fe in biosynthesis, translocation, and signal transduction of NO: toward bioinorganic engineering of dinitrosyl iron complexes into NO-delivery scaffolds for tissue engineering. // Dalton Trans. 2019 Apr 16.
3. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a «working form» of endogenous nitric oxide. // Nitric Oxide. 2016. 54. 15–29.
4. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes as a “working form” of nitric oxide in living. / Cambridge Scholars Publishing. 2019. 265 P.
5. Shumaev K.B., et al. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes. // Nitric Oxide. 2008. 18. 37–46.
6. Shumaev K.B., et al. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. // Methods in Enzymology. 2008. 436. 445–461.
7. Шумаев К.Б., et al. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа. // Биохимия. 2004. 69. 5. 699–705.
8. Shumaev K.B., et al. Protective effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione in red blood cell lysis induced by hypochlorous acid. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019. V. 2019, Article ID 2798154, 12 pages.
9. Pietraforte D., et al.Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3 nitrotyrosine. // Amino Acids. 2003. 25. 3–4. 341–350.
10. Romero N., et al. Reaction of Human Hemoglobin with Peroxynitrite. // J. Biol. Chem. 2003. 278. 45. 44049–44057.
11. Herold S., et al. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. // Free Rad. Biol. Med. 2003. 34. 531–545.
12. Vlasova I.I. Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control. // Molecules. 2018. 23. 2561.
13. Ford E., et al. Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. // Free Radic. Biol. Med. 32. 2002. 1314–1323.
14. Pietraforte D., Minetti M. One-electron oxidation pathway of peroxynitrite decomposition in human blood plasma: evidence for the formation of protein tryptophan-centred radicals. // Biochem J. 1997. 321. 734–750.
15. Alvarez B., et al. Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. // Chem Res Toxicol. 1996. 9. 2. 390–396.

УДК 66.047

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА ОСНОВЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РИБОСОМНОГО БЕЛКА S1 ИЗ THERMUS THERMOPHILUS

С.Р. Курпе, С.Ю. Гришин, О.М. Селиванова, А.К. Сурин, О.В. Галзитская*

Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия

T. thermophilus является модельным организмом для изучения бактериальных рибосомных белков, в частности, самого крупного белка S1 рибосомной субчастицы 30S. В настоящее время трехмерная структура белка S1 недостаточно изучена из-за его высокой склонности к агрегации, а также относительной подвижности конструкции из пяти белковых S1-доменов и неупорядоченных участков. Вместе с тем, изучение агрегационных (амилоидогенных) и антибактериальных эффектов пептидов, разработанных на основе последовательности S1, представляет интерес, как для выяснения участков в структуре белка, ответственных за агрегацию, так и для разработки антимикробных препаратов. Цель работы состояла в теоретическом предсказании белковых участков, склонных к агрегации в аминокислотной последовательности белка S1 из T. thermophilus, синтезе пептидов на их основе и экспериментальной проверке их амилоидогенности и антибактериального действия (токсического эффекта пептидов на бактериальные клетки).

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой объекты пептидной природы с высоким содержанием положительно заряженных и гидрофобных аминокислот, с пространственным разобщением заряженных и гидрофобных частей молекулы, синтезирующихся in vivo на рибосомах или ферментативным путем, либо in vitro, обладающих широкой антимикробной активностью против бактерий, грибов, вирусов и простейших при физиологических условиях [1]. Антимикробные пептиды способны проявлять широкий спектр биологических функций. Помимо антимикробной, антибактериальной, антивирусной, противогрибковой, антипаразитарной функций, АМП могут проявлять более специфическое действие.

Под антимикробной активностью понимают проявление какой-то одной, либо нескольких, а в редких случаях всех видов активностей, направленных против вирусов, бактерий, грибов или паразитов [2]. Известно, что количество АМП уменьшается с увеличением типов активностей. Снижение числа типов активностей может быть связано с физико-химическими свойствами пептидов [2]. Действительно, некоторые из широко изученных АМП входят в короткий список, обладающих всеми четырьмя типами активностей. Такими пептидами являются магаинин 2, дермсептин С1 и дермсептин С4 амфибий; мелиттин насекомых; человеческий α-дефенсин HNP-1, кателицидин LL-37; бычий BMAP-27, BMAP-28 и растительный калата B2. Наиболее распространённой является антибактериальная активность АМП. Такая активность обнаруживается у 31 % пептидов, депонированных в dbAMP. Эта активность обычно объясняется действием катионных пептидов на мембрану [2]. Интересно, что активность против грамотрицательных и грамположительных бактерий распределяется примерно поровну (19 % и 22 %, соответственно). Противогрибковой активностью обладают 16 % пептидов dbAMP. Часто эта активность принадлежит представителям растительных АМП [3]. Вызывает интерес противовирусная активность АМП. Известно, что кателицидин LL-37 проявляет активность против ВИЧ-1, респираторно-синцитиального вируса (RSV) и вируса гриппа [4,5]. Причем подвергаются воздействию вирусные частицы как покрытые оболочкой, так и без нее. Предполагается, что амфипатическая природа АМП позволяет связываться с нуклеиновой кислотой вируса. Антипаразитарные пептиды представляют собой относительно меньшую группу по сравнению с другими группами АМП. Хотя паразитические организмы, как правило, многоклеточные, механизм действия антипаразитарных пептидов включает в себя гибель клеток путем нарушения целостности клеточной мембраны, подобно другим АМП [6]. Пептиды с этой активностью проявляют действие против различных паразитов, включая Leishmania и Trypanosoma brucei [7].

Исследования антибактериальной активности пептидов на основе рибосомального белка S1 проводили на культуре T. thermophilus. Родственное филогенетическое положение с археями и бактериями, высокая термическая устойчивость ферментативных систем, небольшой размер генома делает этот вид классической экспериментальной лабораторной моделью. T. thermophilus – грамотрицательная термофильная бактерия, относящаяся к облигатным аэробам.

Штамм HB27 T. thermophilus был любезно предоставлен С.В. Тищенко (ИБ РАН). Замороженную биомассу выращивали в небольшом объеме (500 мкл) среды LB в 1,5 мл пробирке в течение ночи при 70 °C и помешивании 230 об/мин. Для получения рабочей культуры 500 мкл ночной культуры пересевали в 300 мл колбу со 100 мл среды и культивировали в тех же условиях. Рост культуры контролировали с помощью СФ-102 при λ=600 нм в кювете 10 мм.

Аминокислотные последовательности пептидов, предсказанные биоинформатическими инструментами, были синтезированы в филиале ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Поиск последовательности аминокислот способных к агрегации показал, что все пять доменов S1 T. thermophilus содержат амилоидогенные участки по данным программ FoldAmyloid, Waltz, PASTA 2.0 и AGGRESCAN. Наиболее амилоидогенные консенсусные последовательности третьего и пятого доменов D9G$^{3\text{-домен}}$ (DFGVFVNLG), E10D$^{5\text{-домен}}$ (EMEVVVLNID), V10I$^{5\text{-домен}}$ (VTDFGVFVEI) и V10T$^{3\text{-домен}}$ (VVEGTVVEVT) были проанализированы на соответствие антимикробной активности. Оценка антимикробной активности проводилась с помощью четырех алгоритмов онлайн-сервера CAMPR3: метода опорных векторов (SVMs), метода случайных деревьев (Random Forests), искусственных нейронных сетей (ANN) и дискриминантного анализа (DA). Из четырех предсказанных амилоидогенных пептидов D9G и V10I являются потенциально антимикробными. Для увеличения антимикробной активности, способности проникать через мембрану, повышения жесткости и механической стойкости амилоидных комплексов к N-концу V10I и V10T была добавлена последовательность TAT-белка ВИЧ-1 (RKKRRQRRR и небольшой линкер GGSarG) [8], что подтверждается прогнозом для R23I и R23T по сравнению с не модифицированными пептидами.

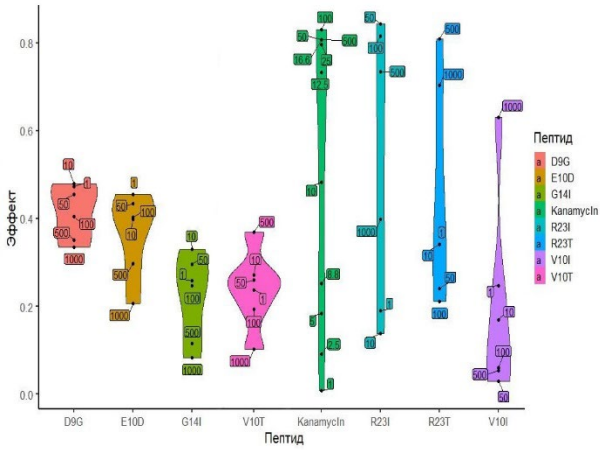


Рис. 1. Оценка антимикробной активности пептидов методом спектрофотометрии.

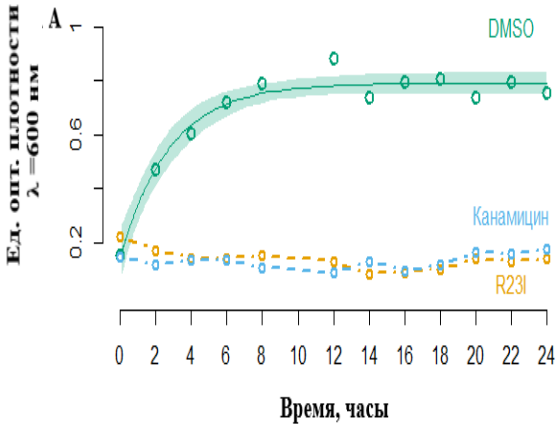


Рис. 2. Оценка антимикробной активности пептидов методом спектрофотометрии

Вытянутая палочкообразная форма фигуры указывает на проявление антимикробной активности, а широкая форма фигуры демонстрирует отсутствие эффекта. Расчет биологической активности пептида производился по формуле: Э = 1– $A\left(\text{Опыт}\right)/A\left(\text{Контроль1}\right)$, где Э – биологическая активность (эффект); А – поглощение оптической плотности после 24 ч. инкубации в опыте и контроле.

Основываясь на предсказанных данных, были синтезированы пептиды и проверена их биологическая активность на клеточной культуре T. thermophilus. Скрипичная диаграмма отражает первичную проверку (однократный повтор) исследуемых пептидов (рис. 1). По оси абсцисс расположены пептиды, по оси ординат эффект действия. Доверительный интервал показан верхней и нижней границей фигуры. Ширина фигуры показывает частоту наблюдения точек. Цифровые метки с черными точками в области построения графика отражают действующую концентрацию пептида (мкг/мл). Воздействие канамицином на рост клеточной культуры выступало в роли положительного контроля. Заметно, что пептиды, угнетающие рост T. thermophilus, как и канамицин, имеют вытянутую форму графика плотности. Стоит обратить внимание, что эффективность канамицина не превышает 0.8, что, вероятно, является ограничением метода измерения. Согласно предсказанию, пептиды, проявляющие антибактериальное действие, являются R23I (RKKRRQRRRGGSarGVTDFGVFVEI), R23T (RKKRRQRRRGGSarGVVEGTVVEVT) и V10I. Этот вывод был подтвержден повторами эксперимента (для R23I 5 повторов и по 2 для R23T и V10I).

Минимальная опытная ингибирующая концентрация (MIC) для R23I, R23T и V10I равна 50, 500 и 1000 мкг/мл, соответственно. Однако D9G не проявил биологической активности в диапазоне исследуемых концентраций. Интересно, что наблюдается взаимосвязь между эффективностью пептида (наименьший уровень MIC) и уровнем предсказания антимикробной активности методом DA CAMPR3. Уровень предсказания для наиболее эффективного пептида R23I равен 0.99, тогда как для R23T лежит на границе чувствительности 0,59. Таким образом, увеличение уровня предсказания соответствует уменьшению MIC и соответственно увеличению антимикробной эффективности пептида.

Другой не менее важной характеристикой антимикробной активности является время наступление эффекта. Для R23I (наиболее эффективного пептида) было показано, что пептид ингибирует рост клеточной культуры в первые часы воздействия (рис. 2). По оси абсцисс время, по оси ординат поглощение оптической плотности клеточной культуры. Кривая DMSO отражает рост культуры T. thermophilus без токсического воздействия в экспериментальных условиях. Активный прирост клеток наблюдается с начального момента инкубации. Переход в стационарную фазу роста происходит через 6–8 часов. Численность бактерий стабилизировалась на уровне 0.8 единиц оптической плотности. В среде с добавлением 50 мкг/мл канамицина и R23I не наблюдается прирост оптической плотности, что свидетельствует об отсутствии роста бактерий.

На ряду со спектрофотометрическим методом определения антимикробной активности пептидов состояние клеток оценивали методом электронной микроскопии. Было показано, что при добавлении в среду 50 мкг/мл R23I практически отсутствуют целые клетки, часто встречаются фрагменты клеток (представлено на ЭМ изображении) и большое количество агрегатов белков (см. рис. 3). При увеличении концентрации пептида до 100 мкг/мл, по сравнению с контролем, уменьшилось количество клеток. Часто клетки имеют неровную поверхность, встречаются фрагменты клеток, много белковых агрегатов. Действие 1000 мкг/мл R23I не привело к морфологическим изменениям по сравнению с контролем. При данной концентрации пептида часто встречаются клетки с типичной морфологией, с наличием жгутиков. Также наблюдается много агрегатов белка. Отсутствие антимикробного эффекта при увеличении концентрации пептида до 1000 мкг/мл, что соответствуют данным по оценке антимикробной активности пептидов методом спектрофотометрии (см. рис. 1).

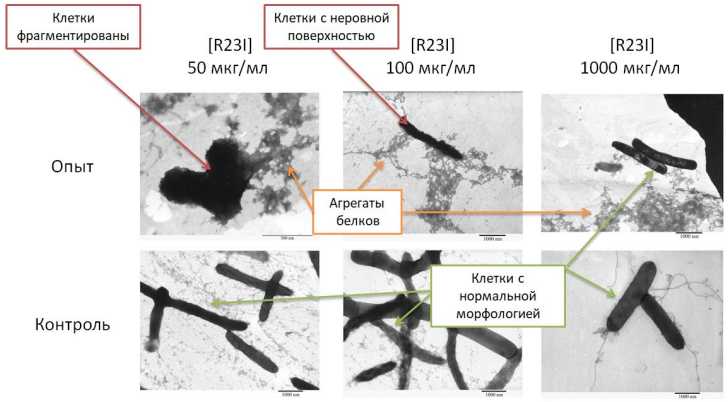


Рис. 3. Фотографии клеток T. thermophilus при действии R23I.

Образцы клеток T. thermophilus подвергали электрофоретическому разделению в ПААГ. Полосы разделяли на три равные части, измельченные кусочки геля обрабатывали протеазой. Масс-спектры, полученные в исследовании протеома интактных и обработанных R23I клеток T. thermophilus, были проанализированы с помощью веб-сервера IdentiPy [9]. Дальнейший анализ проводился в статистической среде R с помощью пактов UniProt.ws, tidyverse, ggplot2, splitstackshape, reshape, readr, RVenn. После исключения белков, число обнаруженных пептидов для которых было меньше трех, количество белков в группах было определено (Таблица 1).

Таблица 1. Количественное соотношение белков в исследуемых образцах.

Концентрация R23I, мкг/мл	Условия гомогенизации клеток T. thermophilus	Количество обнаруженных белков
0	Замораживание – оттаивание	386
20		232
50		201
100		395
0У*	Ультразвук	513
100У*		434

У* – гомогенизация методом ультразвука

В образцах обработанных 20 и 50 мкг/мл R23I выявлено меньше белков на 40 % и 48 % соответственно относительно контроля. Воздействие концентрации 100 мкг/мл R23I на клетки T. thermophilus не приводит к резкому увеличению или уменьшению количества белков.

Попарное сравнение групп с помощью точного критерия Фишера для малых выборок с поправкой на множественную проверку гипотез Benjamini показало (Таблица 2):

Образцы, гомогенизированные различными методами, статистически значимо различаются ($p<0.05$) и не могут быть использованы для сравнения.

Кроме того, действие 20 и 50 мкг/мл R23I значимо отличается от контроля.

Однако действие 100 мкг/мл R23I не приводит к значимому изменению количества белков в образцах, гомогенизированных циклами замораживание – оттаивание и ультразвуком.

Таблица 2. Уровень значимости с поправкой Benjamini, оцененный тестом Фишера

	0	20	50	100	0У*	100У*
0	1					
20	6.92E-15	1				
50	6.92E-15	0.058886	1			
100	1	2.20E-07	8.18E-11	1		
0У*	0.000131	1.38E-14	1.38E-14	0.640444	1	
100У*	0.000131	2.75E-10	1.67E-13	1.38E-14	0.003743	1

У* – гомогенизация методом ультразвука

Сравнение белков разных групп показало, что при добавлении в клеточную среду R23I в концентрации 20 и 50 мкг/мл происходит снижение уникальных, общих и общего количества обнаруженных белков (Таблица 1). В клетках, не обработанных пептидом, описано 100 уникальных белков. Для клеток, обработанных 20 мкг/мл R23I, характерно наличие 11, для 50 мкг/мл R23I –2, а для 100 мкг/мл R23I –176. Снижение количества уникальных белков в 50 раз относительно контроля в клетках, обработанных 50 мкг/мл R23I, может быть связано с отсутствием роста клеточной культуры при максимальном антибактериальном эффекте при действии этой концентрации. Кроме того, отмечается уменьшение количества белков в клетках обработанных 20 мкг/мл в 9 раз по сравнению с контролем. Рост клеточной культуры при действии 20 мкг/мл не изменялся относительно контроля (по спектрофотометрическим данным), однако снижение количества общих, уникальных и всего набора белков может говорить о проявлении антимикробного действия R23I. С другой стороны, увеличение уникальных и общего количества обнаруженных белков еще раз подтверждает тот факт, что концентрация R23I равная 100 мкг/мл и выше приводит к снижению антимикробного эффекта по отношению к клеткам T. thermophilus.

Аннотирование определённых белков, по ключевым словам (Keywords) базы данных Uniprot, позволяет оценить изменения белкового состава по 10 категориям: биологический процесс, клеточный компонент, разнообразия кодирующих последовательностей, молекулярная функция и другие. Сравнение клеточных белков, аннотированных как цитоплазматические и мембранные, показало, что при воздействии 20 и 50 мкг/мл R23I наблюдается снижение количества цитоплазматических и мембранных белков относительно контроля. Вероятно, это снижение связано с общим снижением количества белков в пробах.

При действии 20 и 50 мкг/мл R23I в клетках уменьшается количество аминоацил-тРНК-синтетаз и белков участвующих в биосинтезе аминокислот (биосинтез изолейцина, треонина, метионина, гистидина и ароматических аминокислот). Интересно, в образцах, подвергшихся воздействию 20, 50 и 100 мкг/мл R23I, снижается количество белков биогенеза рибосом. Снижение количества белков этой группы может указывать на снижение уровня биосинтеза белка. На снижение биосинтетической активности указывает уменьшение количества белков, участвующих в репликации ДНК, а также биосинтезе пуринов непрямым путем и de novo. Помимо уменьшения биосинтетической активности наблюдается снижение белков, имеющих протеолитическую и нуклеазную активность. Снижение анаболических и катаболических процессов может указывать на нахождение клеток, подвергшихся воздействию R23I, в стрессовых условиях. Возможно, снижение биосинтетической активности определяется снижением уровня энергетического метаболизма. Так, например, уменьшение ферментов глиоксилатного пути, белков участвующих в окислительно-восстановительных реакциях может приводить к снижению продукции ATP, NADF и других макроэргов. Таким образом, уменьшение анаболических процессов биосинтеза белков и нуклеиновых кислот может быть следствием энергетических потерь, вызванных нарушением функциональной целостности клеточной стенки и/или мембраны. Однако нельзя исключать внутриклеточные мишени действия R23I.

В числе этих «чувствительных» белков треть связана с окислительно-восстановительными процессами энергетического метаболизма. Помимо белков участвующих в транспорте электронов (cytochrome c oxidase subunit 2, isocitrate dehydrogenase (NADP), NADH-quinone oxidoreductase subunit 2), в этом наборе белков особенно выделяется redox-sensing transcriptional repressor Rex, являющийся регулятором анаэробного метаболизма [10]. Этот репрессор приводит к анаэробной регенерации NAD+, путем образования лактата, формиата и этанола, нитратное дыхание и синтез АТФ, что может подтверждать гипотезу о снижении продукции ATP, NADF и других макроэргов.

Нами проведена оценка антимикробной активности искусственно синтезированных пептидов. Исследованы основные зависимости наступления антибактериального эффекта от концентрации пептида и времени его действия. Среди исследуемых пептидов R23I обладает наибольшей антимикробной активностью. Минимальная ингибирующая опытная концентрация (MIC) R23I равна 50 мкг/мл. При увеличении концентрации более 500 мкг/мл наблюдается снижение антимикробного действия. MIC для R23T и V10I соответственно равны 500 и 1000 мкг/мл, что указывает на их меньшую эффективность по сравнению с R23I. Дозо-зависимый характер антимикробного действия пептидов был продемонстрирован кривыми отклика. Зависимость «доза-эффект» для канамицина и для R23I имеют различную природу, что указывает на различные механизмы действия. Время наступления эффекта для канамицина и для R23I наступает в первые часы воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 18–14–00321).

ЛИТЕРАТУРА

1. Азимова, В.Т., и др. (2015). Современные проблемы науки и образования, (1–1), 1337–1337.
2. Wang, G. (Ed.). (2017). Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies. Cabi.
3. Wang, G. (2016). Structural Analysis of Amphibian, Insect, and Plant Host Defense Peptides Inspires the Design of Novel Therapeutic Molecules. In Host Defense Peptides and Their Potential as Therapeutic Agents (pp. 229–252). Springer, Cham.
4. Barlow, P.G., et al. (2011). PloS one, 6(10).
5. Hsieh, I.N., & Hartshorn, K.L. (2016). Pharmaceuticals, 9(3), 53.
6. Ahmed, T.A., & Hammami, R. (2019). Journal of food biochemistry, 43(1), e12546.
7. Jenssen, H., et al. (2006). Clinical microbiology reviews, 19(3), 491–511.
8. Console, S., et al. (2003). Journal of Biological Chemistry, 278(37), 35109–35114.
9. Levitsky, L.I. et al. (2018) J. Proteome Res. 2018, 17, 2249–2255
10. Pagels, M., et al. (2010). Molecular microbiology, 76(5), 1142–1161.

УДК 577.214.39

SYNTHETIC INHIBITORS TARGETING KU/DNA INTERACTION AS A POSSIBLE TOOL TO STUDY DNA-MEDIATED REGULATION OF TRANSCRIPTION BY KU PROTEIN.

E. Pavlova, S. Korolev, O. Shadrina, A. Mantsyzov, M. Gottikh

Lomonosov Moscow State Universit, Moscow, Russia

Human Ku heterodimeric protein participates in DNA double strand break repair and effectively binds to free ends of double stranded DNA, but its ability to interact with internal DNA regions such as gene promoters has not yet been clearly shown. Nevertheless, Ku can contribute to the transcription regulation of cellular and viral genes including IIIV–I through interactions with proteins or DNA. We assumed that during IIIV–I transcription Ku could directly bind to the viral promoter. We investigated the effect of Ku intracellular concentrations on the transcription of the firefly luciferase gene under the control of the IIIV–I LTR promoter. It was found that the depletion of Ku subunits by both siRNAs and CRISPR/Cas9 monoallelic knockout significantly decreased the transcription efficiency, whereas overexpression of each Ku subunit equally activated luciferase expression from the LTR promoter. Also, we found that both recombinant Ku and Ku from the nuclear cell lysate were able to interact with DNA containing IIIV–I promoter in the absence of free DNA ends. Using the available crystallographic structure of Ku/DNA complex we built a pharmacophore model describing key contacts of a DNA duplex with Ku. The model was implemented to filter ChemDiv collection of compounds and select 232 molecules fitting the pharmacophore. The subset of compounds for initial screening was further fetched taking into account the results of virtual docking of the molecules to the putative binding site on the Ku heterodimer surface. We carried out three consecutive rounds of EMSA experimental screening on recombinant Ku and identified a new structural class of Ku/DNA interaction inhibitors with an IC_{50} within micromolar range.

The work was supported by RFBR grant 18–04–00542.

УДК 577.15

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ДЕСОРБЦИИ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ С МАТРИЦЫ ХИТОЗАНА

В.А. Королева[1], М.Г. Холявка[2], В.Г. Артюхов[2]

[1] Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко МЗ РФ, Воронеж, Россия

[2] Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Результаты современной биотехнологии активно используются в медицинской практике. Протеолитические ферменты являются достаточно перспективными в данном направлении. На их основе производятся препараты для заживления ран и пролежней, для лечения желудочно-кишечных заболеваний, в качестве альтернативы антибиотикам. Фицин (КФ 3.4.22.3), папаин (КФ 3.4.22.2) и бромелин (КФ 3.4.22.32) являются тиолсодержащими протеазами растительного происхождения. Известно, что нативные ферменты быстро инактивируются различными факторами, минимизации действия которых способствует иммобилизация энзимов на нерастворимых носителях. Хитозан является подходящей матрицей для адсорбции биокатализаторов и сам обладает различными клиническими свойствами. Иммобилизация может осуществляться различными способами, например, ковалентными или физическими методами. Адсорбция относится к физическим методам иммобилизации. При использовании данного способа возможна контролируемая десорбция энзима с матрицы полисахарида, что позволяет создавать препараты с пролонгированным действием.

Цель работы – исследование процессов десорбции фицина, папаина и бромелина с матрицы хитозана.

В качестве объектов исследования использовали фицин, папаин и бромелин (Sigma-Aldrich). В качестве носителя применяли кислоторастворимый среднемолекулярный хитозан (Mr = 200 кДа) (ЗАО «Биопрогресс). Иммобилизацию ферментов на хитозане осуществляли методом простой адсорбции. Десорбцию биокатализаторов проводили в течение 48 часов (в 0,05 М трис-HCl буфере с pH 7,5 и 0,9 % NaCl) с последующим измерением содержания белка в растворе методом Лоури.

Десорбция фицина с матрицы хитозана в 50 мМ трис-HCl буфере (pH 7,5) после 48 часов инкубации не превышала 21 %. Напротив, в физиологическом растворе (0,9 % NaCl) 78 % белка диссоциировало в раствор в течение 2 суток.

При экспозиции иммобилизованного на хитозане папаина в течение 2 суток в 50 мМ трис-HCl буфере (pH 7,5) в раствор высвобождается 50 % энзима, в то время как при использовании 0,9 % NaCl в среде детектируется 70 % папаина.

При исследовании десорбции бромелина с хитозана в 50 мМ трис-HCl буфере (pH 7,5) наблюдалась диссоциация 24 % белка после 48 часов инкубации, а в условиях физиологического раствора – 80 %.

Таким образом, иммобилизованные на матрице хитозана ферментные препараты можно использовать в качестве лекарственных средств с пролонгируемым действиям за счет контролируемой десорбции сорбата с поверхности сорбента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16–34–01141 конкурса РФФИ мол_а.

УДК 602.9 + 616–092.4 + 576.53

ДЕСНА КАК ИСТОЧНИК АУТОЛОГИЧНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Н.В. Кошелева[1,2,3], И.М. Зурина[1,3,4], А.А. Горкун[1,4], П.Ю. Бикмулина[4], А.А. Пулин[5], И.Н. Сабурина[1,3]

[1] НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия
[2] МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[3] Российская Медицинская Академия Непрерывного Профессионального Образования Минздрава РФ, Москва, Россия
[4] Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия
[5] НМЦХ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Стволовые и прогениторные клетки, прежде всего мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) из различных источников, интересны как для фундаментальных исследований, так и для клинического применения в регенеративной медицине для восстановления структуры и функции поврежденных тканей и органов. МСК, обладающие способностью дифференцироваться в такие производные мезодермы как жировая, костная и хрящевая ткани, а также в миогенном направлении, выделяют из тканей взрослого организма (костный мозг, подкожный жир) и из экстраэмбриональных тканей (плацента, пупочный канатик) [1]. Большой интерес представляет поиск новых доступных источников аутологичных МСК с хорошим миогенным потенциалом для заместительной терапии нарушений опорно-двигательного аппарата и миодистрофий. Одним из таких перспективных источников является ротовая полость – заживление большинства ран ротовой полости происходит без образования рубцов, а биоптаты слизистой оболочки легко получить практически неинвазивно под местной анастезией. Стромальные клетки из различных областей ротовой полости – из пульпы зуба, собственной пластинки слизистой ротовой полости и десны обладают широким дифференцировочным потенциалом и высокой пролиферативной активностью [2]. Это может быть связано с уникальным онтогенетическим происхождением производных ротовой полости из нескольких закладок – из эктодермы, головной мезенхимы и обладающих обширными дифференцировочным и регенеративным потенциалами клеток нервного гребня [3].

Известно, что при культивировании в трехмерных условиях дифференцировочный потенциал МСК проявляется быстрее и эффективнее [4]. Клетки при помещении в неадгезивные 3D самоорганизуются с формированием трехмерных многоклеточных структур – сфероидов, которые по своему строению за счет сети межклеточных контактов и вновь синтезированного внеклеточного матрикса ближе к нативным тканям, чем монослойные культуры [5]. В сфероидах, в отличие от монослойных культур, лучше и дольше поддерживаются тканеспецифичные свойства клеток и активнее экспрессируются функциональные гены [6, 7]. В сфероидах из МСК повышена секреция противовоспалительных и проангиогенных факторов, что усиливает регенеративный потенциал клеток в 3D культуре [8].

Цель исследования – выделить МСК из свободной десны человека и сравнить миогенный потенциал полученных клеток в 2D и 3D условиях культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

После подписания здоровыми донорами добровольного информированного согласия в хирургическом стоматологическом кабинете с соблюдением правил асептики под местным обезболиванием раствором Ультракаин (1.7 мл, 40 мг/мл) выполняли биопсию слизистой оболочки десны в ретромолярной области. Биоптаты промывали стерильным раствором Хенкса с антибиотиками и антимикотиком (пенициллин 5000 МЕ/мл, стрептомицин 5000 мкг/мл, гентамицин 50 мкг/мл, флуконазол 0.2 %), измельчали механически на кусочки объемом 1–2 мм^3, переносили в пробирку объемом 15 мл и заливали 2–4 мл рабочего раствора коллагеназы II типа 200 Ед./мл (Sigma, США). Инкубировали 2 часа на шейкере (37^o C, 5 % CO_2). Фермент инактивировали добавлением равного объема ростовой среды и центрифугировали (7 мин, 100g). Осадок ресуспендировали в ростовой среде и помещали на адгезивные чашки Петри. Ростовая среда состояла из смеси DMEM/F12 (1:1) с L-глутамином (0,3 мг/мл) с добавлением 60 мкг/мл гентамицина и 20 % FBS (HyClone, США).

Культивирование проводили в стандартных условиях – 37 °С, 5 % CO_2, 100 % H_2 O. Смену среды и визуальный контроль состояния культур проводили раз в 2–3 дня, при достижении 70–80 % конфлуентности культуры пассировали с двухкратным увеличением посевной площади. Иммунофенотипирование клеток 2D культуры 4-ого пассажа проводили по следующему профилю поверхностных маркеров: CD29, CD90, CD105, CD44, CD73, HLA-DR, CD45, CD34, CD14, CD19. Пробы инкубировали в темноте (15 мин, 25 °С) с антителами (10 мкл антител на 1 млн клеток), конъюгированными с флуоресцентным красителем фикоэритрин – PE (Miltenyi Biotec, Германия). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Sony SH800 (Sony Biotechnology, США). При достижении культурами клеток плотности выше 20 000 клеток на $см^2$ происходила спонтанная дифференцировка в миогенном направлении с образованием миотуб. Сфероиды получали из клеток 4-ого пассажа по отработанной технологии [5] на неадгезивных агарозных планшетах (Microtissue, США). Профили секреции клеток в 2D и 3D культурах анализировали по кондиционированным ими в течение 4 сут средам в двух повторах с применением набора HCYTMAG-60K-PX41 в соответствии с рекомендациями производителя на приборе Magpix (Merck, Германия). Для иммуноцитохимического анализа 2D культуры на покровных стеклах и сфероиды фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида (20 мин, 4ºС), отмывали от фиксатора в растворе фосфатного-солевого буфера и инкубировали ночь при 4ºС с первичными антителами к белкам MyoD, α-гладкомышечному актину и сакомерному α-актинину (Abcam), отмывали пробы в растворе фосфатного-солевого буфера и инкубировали час в темноте со вторичными антителами козла к мыши, конъюгированными с DyLight 488, и антителами козла к кролику, конъюгированными с DyLight 594. Ядра докрашивали красителем бис-бензимид (Hoechst 33258, Serva). Препараты анализировали под лазерным сканирующим конфокальным микроскопом Olympus Fluoview FV10I (Olympus, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культуры МСК десны формировали колонии через 5–7 сут после ферментативной обработки биоптатов. На 4 пассаже более 96 % клеток экспрессировали характерные поверхностные маркеры – CD29, CD90, CD105, CD44, CD73 и не экспрессировали HLA-DR, маркеры гемопоэтического и лимфоцитарного ряда – CD14, CD19, CD34, CD45. При достижении высокой плотности в 40 % выделенных культур МСК десны наблюдали спонтанную миогенную дифференцировку клеток с экспрессией характерного для миогенных прогениторных клеток транскрипционного фактора MyoD. Синтез характерного для дифференцированных клеток поперечно-полосатой мышечной ткани саркомерного α-актинина практически отсутствовал, отсутствовал синтез одного из ключевых факторов миграционной активности и маркера миофибробластов – α-гладкомышечного актина. Таким образом, в монослойной 2D культуре МСК десны спонтанно появлялись прогениторные мышечные клетки, образовывались миотубы, но миофибриллы не формировались.

За 7 дней культивирования в 3D условиях МСК десны формировали сфероиды, в которых проходила спонтанная миогенная дифференцировка клеток. Причем в клетках сфероидов не синтезировался MyoD, маркер начальных стадий миогенеза, регулирующий формирование миотуб из прогениторных клеток. В отличие от монослойных 2D культур, в сфероидах образовывались не миотубы, а более дифференцированные миофибриллы с характерным расположением ядер по периферии и поперечной исчерченностью, выявленной окрашиванием антителами к белку саркомерного α-актинина (рис. 1).

Сравнение профиля секретома в 2D и 3D культурах МСК десны выявило повышенный уровень (в 2–10 раз) проангиогенного фактора VEGF в кондиционированных сфероидами средах. Кроме того, в средах, кондиционированных сфероидами была повышена секреция провоспалительных цитокинов (IL1, IL6, IFNg) без изменений уровня секреции противовоспалительных цитокинов (IL8, IL10 и др.).

Культивирование соматических клеток в виде сфероидов обладает рядом преимуществ по сравнению с монослойными 2D культурами, особенно в случае низкодифференцированных клеток, так как в физиологических условиях трехмерной культуры клетки постепенно сами синтезируют необходимые для поддержания своего микроокружения компоненты внеклеточного матрикса и цитокины. В условиях 3D культуры активируется транскрипция таких факторов как Oct4, Nanog и Sox2 [9]. Известно, что экспрессия транскрипционного фактора Nanog способствует восстановлению пролиферации и миогенного потенциала МСК [10]. Вероятно, в нашей работе сходные механизмы стимулировали более эффективную миогенную дифференцировку МСК десны в сфероидах.

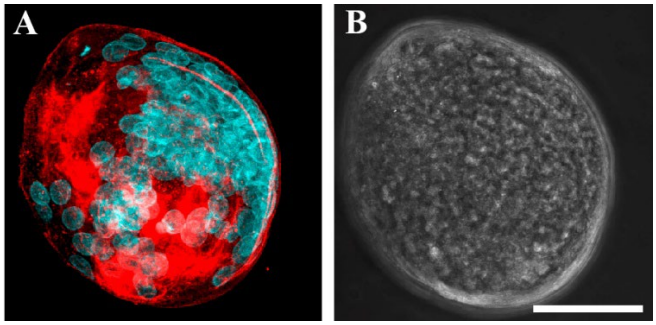


Рисунок 1. Миофибриллы в сфероидах из МСК десны. Характерное распределение саркомерного α-актинина (А, красный), ядра докрашены красителем бис-бензимид (А, синий), Б – видимый свет. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, масштабный отрезок 50 мкм

Мышечная ткань формируется за счет обособляющихся в эмбриогенезе миобластов, формирующих симпласты, и сохраняющих в постнатальный период пролиферативную активность миосателлитов, осуществляющих регенерацию мышц [11]. Предполагаемый гистогенетический ряд поперечнополосатой мускулатуры включает в себя пул стволовых клеток, пролиферирующие клетки-предшественники, сливающиеся и созревающие миотубы, в которых сохраняется экспрессия MyoD, и зрелые не экспрессирующие MyoD миофибриллы с характерным периферическим расположением ядер [12].

Условия 3D культивирования способствуют поддержанию как низкодифференцированных предшественников, так и сформированных миофибрилл. Сфероиды из МСК десны со спонтанной миогенной дифференцировкой представляют собой универсальные репаративные модули как для восстановления повреждений мышечной ткани in vivo, так и для изучения механизмов миогенеза in vitro.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлен высокий миогенный потенциал МСК из десны человека. Культивирование в 3D условиях с формированием сфероидов эффективнее стимулирует спонтанную миогенную дифференцировку с образованием характерных для организованной мышечной ткани миофибрилл и активирует секрецию VEGF, что может повысить выживаемость сфероидов в зонах повреждения. Сфероиды из МСК десны могут стать доступным источником миогенных клеточных продуктов для терапии нарушений опорно-двигательного аппарата и миодистрофий.

Исследование было поддержано НИР № 0520–2019–0026 (работа с культурами клеток и иммунофенотипирование), Российским фондом фундаментальных исследований грант № 20–04–60063 (анализ секретома), Российским научным фондом грант № 18–15–00407 (иммуноцитохимический анализ).

ЛИТЕРАТУРА

[1] Y. Han, X. Li, Y. Zhang, Y. Han, F. Chang, J. Ding, Mesenchymal stem cells for regenerative medicine, Cells 8(8) (2019) 886.
[2] Q. Zhang, A. Nguyen, W. Yu, A. Le, Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells, Journal of dental research 91(11) (2012) 1011–1018.
[3] J. Isaac, A. Nassif, A. Asselin, I. Taïhi, H. Fohrer-Ting, C. Klein, B. Gogly, A. Berdal, B. Robert, B.P. Fournier, Involvement of neural crest and paraxial mesoderm in oral mucosal development and healing, Biomaterials 172 (2018) 41–53.
[4] N. – E. Ryu, S. – H. Lee, H. Park, Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells, Cells 8(12) (2019) 1620.
[5] V. Repin, I. Saburina, N. Kosheleva, A. Gorkun, I. Zurina, A. Kubatiev, 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro, Bull. Exp. Biol. Med. 158(1) (2014) 137–144.
[6] A. Gorkun, A. Shpichka, I. Zurina, A. Koroleva, N. Kosheleva, D. Nikishin, D. Butnaru, P. Timashev, V. Repin, I. Saburina, Angiogenic potential of spheroids from umbilical cord and adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells within fibrin gel, Biomedical Materials 13(4) (2018) 044108.
[7] I. Zurina, A. Shpichka, I. Saburina, N.V. Kosheleva, A. Gorkun, E.A. Grebenik, D. Kuznetsova, D. Zhang, Y. Rochev, D. Butnaru, 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings in vitro, Biomedical Materials (2018).
[8] Z. Cesarz, K. Tamama, Spheroid culture of mesenchymal stem cells, Stem cells international 2016 (2016).
[9] Н.В. Кошелева, И.М. Сабурина, И.М. Зурина, А.А. Горкун, С.А. Борзенок, Д.А. Никишин, Т.Д. Колокольцова, Е.Е. Устинова, В.С. Репин, Технология создания мультипотентных сфероидов из мезенхимных стромальных клеток лимба для репарации поврежденных тканей глаза, Патологическая физиология и экспериментальная терапия 60(4) (2016) 160–167.
[10] J. Han, P. Mistriotis, P. Lei, D. Wang, S. Liu, S.T. Andreadis, Nanog reverses the effects of organismal aging on mesenchymal stem cell proliferation and myogenic differentiation potential, Stem Cells 30(12) (2012) 2746–2759.
[11] F. Relaix, P.S. Zammit, Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage, Development 139(16) (2012) 2845–2856.
[12] O. Sheveleva, O. Payushina, V. Starostin, Cellular and molecular basis of skeletal muscle hystogenesis, Biology Bulletin 39(6) (2012) 495–503.

УДК 571.27

ИЗУЧЕНИЕ СЫВОРОТОК ПАЦИЕНТОВ МОСКОВСКОГО РЕГИОНА С ПЫЛЬЦЕВОЙ АЛЛЕРГИЕЙ, ИМЕЮЩИХ СЕНСИБИЛИЗАЦИЮ К МАЖОРНЫМ АЛЛЕРГЕНАМ КЛАССОВ LTP И PR-10, С ПРИМЕНЕНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ПОДХОДА

И.В. Богданов, Д.Н. Мельникова, Е.И. Финкина, Т.В. Овчинникова

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В последние десятилетия отмечен значительный рост числа пациентов, страдающих аллергическими заболеваниями, в том числе характеризующимися тяжелой формой течения. По прогнозам всемирной организации здравоохранения, ситуация с каждым годом будет только ухудшаться. Липид-транспортирующие белки (LTP) и гомологи основного аллергена пыльцы берёзы Bet v 1 (PR-10) являются клинически значимыми пищевыми и пыльцевыми аллергенами, вызывающими реакции гиперчувствительности различной степени тяжести. В силу своего повсеместного распространения в царстве растений и широкой перекрёстной реактивности оба этих класса отнесены к паналлергенам. Структура LTP характеризуется высокой устойчивостью, благодаря которой аллергены этого класса проходят через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека и достигают толстой кишки в иммуногенной форме, вызывая сенсибилизацию организма. LTP выделены из ягод, овощей, фруктов, злаков, орехов и других растений и относятся к I типу истинных пищевых аллергенов. Основной аллерген персика – Pru p 3 – выступает, как правило, в качестве главной причины гиперчувствительности к белкам класса LTP и развития различных видов перекрёстных аллергических реакций. Гомологи Bet v 1, напротив, подвергаются деградации в ЖКТ и относятся ко II типу перекрёстных пищевых аллергенов. Реакции на аллергены данного класса связаны, преимущественно, с сенсибилизацией к пыльцевому аллергену берёзы Bet v 1. Таким образом, Pru p 3 персика и Bet v 1 берёзы являются мажорными аллергенами этих двух классов белков и основными сенсибилизаторами иммунной системы человека, вызывающими развитие реакций гиперчувствительности на растительные пищевые продукты и пыльцу.

В данной работе были исследованы сыворотки пациентов Московского региона с аллергией на пыльцу деревьев и сорных трав. Из их числа были отобраны сыворотки 15 пациентов, имеющих специфические антитела класса IgE к Bet v 1 и / или Pru p 3. Показана клинически значимая роль этих аллергенов в сенсибилизации пациентов Московского региона. Методом иммуноферментного анализа изучен также профиль перекрёстной реактивности с другими аллергенами классов LTP и PR-10, такими как Ara h 9 арахиса (LTP), Fra a 3 клубники (LTP), Pru p 1 персика (PR-10) и Cor a 1 фундука (PR-10). Показано, что рекомбинантные Pru p 3 и Bet v 1 могут быть использованы для компонентной аллергодиагностики и специфической иммуннотерапии у пациентов Московского региона. Следующим этапом работы стало определение в сыворотках пациентов, содержащих специфические антитела класса IgE к аллергенам Bet v 1 и Pru p 3, целого ряда цитокинов, ассоциированных с развитием и клинической манифестацией аллергических реакций: IFN-γ, TNF-α и TNF-β, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A. С использованием мультиплексного подхода установлено, что у пациентов с аллергией на пыльцу часто наблюдается Th2-тип иммунного ответа, хотя в некоторых случаях имеют место более редкие механизмы развития аллергических реакций, такие как Th17, смешанный Th1/Th2 или Treg. У одного пациента наблюдался смешанный Th1/Th17 иммунный ответ. Полученные данные указывают на необходимость анализа индивидуального механизма развития аллергической реакции у конкретного пациента для дальнейшего подбора персонализированной схемы лечения.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 20–45–05002).

УДК 615.012.6

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГИСТОНОВЫЙ НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОПРЕПАРАТОВ В ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ

А.И. Кузьмич, О.А. Ракитина, М.В. Зиновьева, Д.А. Дидыч, И.В. Алексеенко

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) являются перспективной мишенью противоопухолевой генной терапии, в связи с чем актуальной проблемой является разработка способов направленной доставки ДНК в эти клетки. Возможным решением этой проблемы могут быть носители ДНК, способные селективно связываться со специфическим молекулами на поверхности ОАФ. Таким характеристическим белком этих стромальных клеток является рецептор фактора роста тромбоцитов бета-типа, PDGFRb. Ранее был описан пептидный лиганд YG2, способный связываться с поверхностью PDGFRb-позитивных клеток и накапливаться внутри них. Также известно, что человеческий гистон H2A способен осуществлять доставку плазмидной ДНК в различные клетки млекопитающих. Мы предположили, что слияние гистона H2A с YG2 способно улучшить эффективность доставки ДНК в PDGFRb-позитивные ОАФ. Целью данной работы были биотехнологическое получение гистона H2A, слитого с лигандом к PDGFRb, и оценка его свойств, как носителя ДНК.

В ходе работы была получена генно-инженерная конструкция, кодирующая гибридный гистон H2A-YG2. В бактериальной системе этот белок был наработан, выделен и очищен в два этапа с помощью ионообменной и обращено-фазовой ВЭЖ хроматографий. Выход очищенного белка составлял около 8,5 мг на литр культуры, чистота составляла не менее 90 %. Путем измерения подвижности ДНК в агарозном геле показано, что H2A-YG2 способен связывать плазмидную ДНК с той же эффективностью, как и немодифицированный рекомбинантный гистон H2A. Методом динамического светорассеяния было показано, что в диапазоне зарядового соотношения N/P от 2,5 до 15 оба белка формируют с плазмидной ДНК комплексы с гидродинамическим радиусом порядка несколько сотен нанометров и слабоположительным поверхностным зарядом (z-потенциал около +20 мВ). На PDGFRb-позитивной и негативной линиях клеток млекопитающих была оценена интернализация комплексов гистонов H2A и H2A-YG2 с плазмидной ДНК, меченной флуорофором ТМ-родамином. В случае PDGFRb-позитивной линии клеток NIH/3T3, суммарное количество захваченных клетками комплексов увеличивалось в 1,5 раза при использовании модифицированного гистона, однако, доля захвативших комплексы клеток не увеличивалась. При этом модификация не влияла на интернализацию комплексов в случае PDGFRb-негативной линии HEK293T. При снижении температуры во время инкубации клеток с комплексами до +4 градусов Цельсия наблюдалось резкое снижения уровня интернализации комплексов ДНК с гистонами в клетки, что свидетельствует об участии энерго-зависимого эндоцитоза в этом процессе. При трансфекции клеток линии NIH/3T3 комплексами гистонов с плазмидой pCMV-EGFP-P2A-luc2, кодирующей два репортерных белка, наблюдалось увеличение активности люциферазы luc2 в лизатах клеток в 5 раз при модификации гистона лигандом к PDGFRb, в то время как для HEK293T значимые изменения не детектировались. Также с помощью проточной цитометрии было выяснено, что доля трансфицированных клеток в случае NIH/3T3 увеличивалась в 3,1 раза при внесении в H2A пептидной модификации, а суммарная флуоресценция EGFP увеличивалась в 7 раз. В то же время, для HEK 293T наблюдалось увеличение доли и суммарной флуоресценции при использовании H2A-YG2, однако, это увеличение было менее выражено, чем для NIH/3T3 (доля увеличивалась в 2,5 раза, а флуоресценция – в 2,6 раз).

Таким образом, нам удалось получить новый рекомбинантный гистон H2A-YG2 и показать, что введенная пептидная модификация приводит к улучшению трансфицирующих свойств гистона H2A в случае как PDGFRb-позитивных, так и PDGFRb-негативных клеток, однако, такое улучшение было существенно более выражено для PDGFRb-позитивной линии. Это позволяет нам рассматривать созданный носитель в качестве потенциально пригодного для индустриального биотехнологического производства, а также обладающего повышенной тропностью к стромальным клеткам опухолей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17–00–00194 (17–00–00190).

УДК 579

ВЛИЯНИЕ ПОЛИДИСПЕРСНЫХ ФУКОИДАНОВ ИЗ FUCUS VESICULOSUS НА КЛЕТКИ HEP G2 И CHANG LIVER

И.М. Лапина

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт, Гатчина, Россия

Фукоиданы, сульфатированные полисахариды, содержащиеся в клеточных стенках бурых морских водорослей, часто называют «интригующим классом» биополимеров из-за проявления ими феноменально широкого спектра биологических активностей: антибактериальной, антивирусной, антикоагулянтной, противовоспалительной, иммуномодулирующей и противоопухолевой. Перспектива применения фукоиданов в противоопухолевой терапии обусловлена их селективной цитотоксичностью по отношению к раковым клеткам по сравнению со здоровыми клетками.

Ранее нами была исследована биологическая активность сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей Laminaria digitata и Fucus vesiculosus в отношении трех клеточных линий: клеток карциномы человека HeLa G-63, линии эндотелиоцитов человека ECV 304 и клеток нейроэндокринной опухоли крысы PC 12 [1]. Было показано, что опухолевые клетки проявляют к фукоидану заметно большую чувствительность, чем немалигнизированные.

Далее, в дополнение к клеткам HeLa G-63, в качестве объектов исследования были взяты клетки печени человека Hep G2 и Chang liver, был проведен сравнительный анализ влияния грубого фукоидана из Fucus vesiculosus и фракций, полученных при помощи анионообменной хроматографии. Было показано, что эффективность воздействия фукоидана на клетки, результатом которого является индукция апоптоза и нарушение клеточного цикла, зависит от многих факторов: дозы, времени обработки клеток фукополисахаридами, типа клеток, а также характеристик самого фукоидана: его источника, способа получения и состава [2].

Неоднородность состава и большой размер молекул фукоидана мешают выяснению зависимости «структура фукополисахаридов – биологическая активность», вследствие чего и тормозится их применение в медицине. Целью нашей следующей работы стало исследование воздействия двух образцов полидисперсных фукоиданов с различными соотношениями высокомолекулярных и низкомолекулярных фракций в составе на клетки печени Hep G2 и Chang liver.

Был выбран метод экстракции полисахаридов из водорослей *F. vesiculosus* без использования кислот, при котором полисахариды сохраняют свою исходную молекулярную массу. В нативном фукоидане, по данным ВЭЖХ, содержание высокомолекулярных и низкомолекулярных фракций было примерно поровну. При помощи мягкого кислотного гидролиза в течение 5 минут и последующего диализа был получен частично деполимеризованный образец, в котором, по данным ВЭЖХ, содержание низкомолекулярных фракций уменьшилось примерно в 3 раза, тогда как данные, полученные методом гель-фильтрации, показывают, что частичный гидролиз состоялся. Средняя молекулярная масса нативного и частично деполимеризованного фукополисахаридов, определенная вискозиметрическим методом, составила 1730 кДа и 2502 кДа, соответственно. Сдвиг массового распределения в гидролизованном образце в более высокомолекулярную область по сравнению с нативным фукоиданом объясняется уменьшившимся вкладом низкомолекулярных фракций вследствие диализа. Также были сделаны ИК-спектры полисахаридов и определены моносахаридные составы их низко- и высокомолекулярных фракций.

Анализ кривых скорости роста клеток Hep G2 и Chang liver показал, что оба образца фукоиданов в дозе 180 мкг/мл ингибируют пролиферацию обеих клеточных линий после 48 ч культивирования. Клетки Hep G2 проявляют большую чувствительность к обоим фукоиданам по сравнению с клетками Chang liver.

По данным проточной цитометрии, обработка клеток Hep G2 и Chang liver сульфатированными фукополисахаридами в концентрации 180 мкг/мл в течение 24 и 48 ч приводила к увеличению доли погибших клеток по сравнению с контролем. Действие частично деполимеризованного фукоидана на клетки выражено сильнее, чем нативного, однако в большинстве случаев ниже статистически значимых различий. На клетки Hep G2 оба образца оказывают более сильное влияние после 48 ч обработки.

Для того, чтобы иметь возможность наблюдать непосредственное взаимодействие клеток и сульфатированных полисахаридов, исследуемые образцы были помечены флюоресцеинамином, степень замещения гидроксильных групп составила приблизительно 2 молекулы флюоресцеинамина на 100 мономеров фукозы. После добавления меченых фукоиданов в культуральную среду клеток Hep G2 и Chang liver, на конфокальном микроскопе велось наблюдение в течение 22 ч, изображение фиксировалось каждый час. Таким образом было выяснено, что фукоиданы интернализируются клетками обеих клеточных линий.

При этом количество везикулярных структур, содержащих флюоресцентно меченый фукоидан, существенно больше наблюдается у клеток Chang liver. При визуальном сравнении меченых сульфатированных полисахаридов внутри клеток в течение 22 ч видно, что не подвергавшийся кислотному гидролизу фукоидан в значительно большей степени поглощается клетками обоих типов, чем частично деполимеризованный, что можно, видимо, объяснить тем, что при одинаковой дозировке (180 мкг/мл) добавляемых в среду фукоиданов процентное соотношение низкомолекулярной фракции полисахаридов в составе нативного фукоидана больше, чем в составе частично деполимеризованного образца. Однако, тогда как оба образца фукоидана вызывают время-зависимую гибель клеток Hep G2, гибель клеток Chang liver через 22 часа практически не наблюдается.

Чтобы количественно оценить динамику накопления фукоиданов, клетки Hep G2 и Chang liver, обработанные мечеными фукоиданами в течение 4, 22 и 43 ч, были проанализированы на проточном цитометре. Детектировалась зеленая флюоресценция клеток, усвоивших меченые фукоиданы. Было показано время-зависимое возрастание флюоресценции для клеток обеих клеточных линий. Причём если через 22 ч преимущественно наблюдается поглощение нативного фукоидана клетками обеих линий, то через 43 ч накопление только в клетках Chang liver обоих образцов фукоиданов превышает таковое в клетках Hep G2.

Для выяснения, вызывают ли исследуемые образцы фукоиданов апоптотическую гибель клеток Hep G2 и Chang liver, было проведено двойное окрашивание красителями Yo-Pro и иодидом пропидия. Результаты показали, что число клеток в стадии раннего апоптоза при 24-часовом культивировании с обоими образцами фукоиданов превышает контрольные значения у Chang liver на 8.7 и 2.5 %, а у HepG2 на 6.9 и 4.7 %, соответственно. Через 48 ч культивирования с фукоиданами заметно возрастает число клеток в стадии позднего апоптоза (окрашенных как Yo-Pro, так и PI): у клеток Chang liver – более чем на 20 % по сравнению с контролем, у клеток Hep G2 – более чем на 50 %, тогда как процентное содержание клеток Chang liver в стадии раннего апоптоза практически не увеличивается, а клеток Hep G2 даже снижается. Как при 24-х, так и при 48-часовом культивировании не наблюдается заметных отличий в воздействии на клетки между нативным и частично деполимеризованным фукоиданами.

Для того чтобы выяснить, вызывает ли обработка сульфатированными фукополисахаридами увеличение числа везикул с кислым содержанием в клетках, было проведено их прижизненное окрашивание акридиновым оранжевым, который, являясь лизосомотропным агентом, свободно проникает через мембраны в незаряженном виде и аккумулируется в кислотных компартментах, где при кислых значениях pH образует агрегаты с красной флюоресценцией, интенсивность которой прямо пропорциональна степени кислотности или объема клеточных компартментов. Результаты показали, что оба образца фукоидана индуцируют рост числа везикул с кислым содержанием в клетках обеих линий.

По литературным данным, наличие везикул с кислотным содержанием, обнаруживаемыми окрашиванием акридиновым оранжевым, указывает на наличие аутофагии. Независимо от типа используемого фукоидана, количество везикулярных структур в клетках Chang liver превышает количество в клетках Hep G2, из чего можно сделать предположение, что, хотя в опухолевых клетках фукоидан в большей степени индуцирует апоптоз, у незлокачественных он в первую очередь вызывает аутофагию.

Таким образом, в результате было выяснено, что высокий молекулярный вес и полидисперсность фукоиданов не препятствуют их противоопухолевой активности. Различия в ингибирующем воздействии на клеточную пролиферацию нативного и частично гидролизованного образцов фукоидана не были статистически значимы. Фукоиданы интернализировались обоими типами клеток через эндоцитоз, причем немалигнизированные клетки Chang liver усваивали фукополисахариды быстрее, чем клетки гепатокарциномы Hep G2. Было показано, что обработка фукоиданами инициирует различные типы клеточной гибели: преимущественно аутофагию в немалигнизированных клетках, и апоптоз в опухолевых клетках [3].

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075–15–2019–1663.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журишкина Е.В., et al. 2015. Влияние фукоиданов, выделенных из водорослей Laminaria digitata и Fucus vesiculosus, на клетки HeLa G – 63, ECV 304 и PC 12. Цитология. 57 (10): 727–735
2. Журишкина Е.В., et al. 2017. Сравнительный анализ влияния фукоидана из водорослей Fucus vesiculosus и фракций, полученных из него с помощью анионообменной хроматографии, на клетки HeLa G-63, Hep G2 и Chang liver. Цитология. 59 (2): 148–155
3. Zhurishkina E.V., et al. The effect of polydisperse fucoidans from Fucus vesiculosus on Hep G2 and Chang liver cells // Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre – 2020, Vol. 21, pp. 100209

УДК 576.33

ВЛИЯНИЕ ДВУХ ТИПОВ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Н.Д. Федорова[1], Д.А. Сумбатян[1], М.А. Стукова[2], Е.Ю. Варфоломеева[1]

[1] НИЦ Курчатовский институт – ПИЯФ, Россия
[2] НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России

Нейтрофилы представляют собой первую линию защиты системы врождённого иммунитета. При столкновении с инфекционными частицами нейтрофил начинает осуществление процесса по их уничтожению [1–5]. Инфекционная частица поглощается нейтрофилом посредством фагоцитоза [6], а различные разрушающие агенты, включая активные формы кислорода (АФК), образованные в результате деятельности НАДФ-оксидазы в процессе развития реакции респираторного взрыва (РРВ), убивают и разрушают чужеродные микроорганизмы [7,8,9].

Для оценки интенсивности реакции респираторного взрыва (РРВ) в нейтрофилах периферической крови использовали проточноцитометрический метод, разработанный в лаборатории клеточной биологии НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ [10, 11]. В качестве красителя использовали гидроэтидин, окисляющийся только радикалами кислорода (продуктами первой стадии РРВ, запускающими дальнейший каскад реакций), обеспечивающий высокую точность исследования. Стимуляцию РРВ осуществляли при помощи форболового эфира. С использованием этого метода было установлено «стандартное распределение» нейтрофилов здоровых доноров по способности продуцировать АФК (Рис. 1) [11]. Разница в реакции между средними значениями составляла не более 8.4 %.

Ранее было проведено исследование изменения функциональной активности нейтрофилов, а именно, интенсивности РРВ, при ОРВИ (выборка – 14 человек), показавшее, что способность нейтрофилов к РРВ повышается в первые 48 часов после начала заболевания с последующим возвращением к норме в случае выздоровления, либо понижением в случае подключения бактериальной инфекции (Рис. 2).

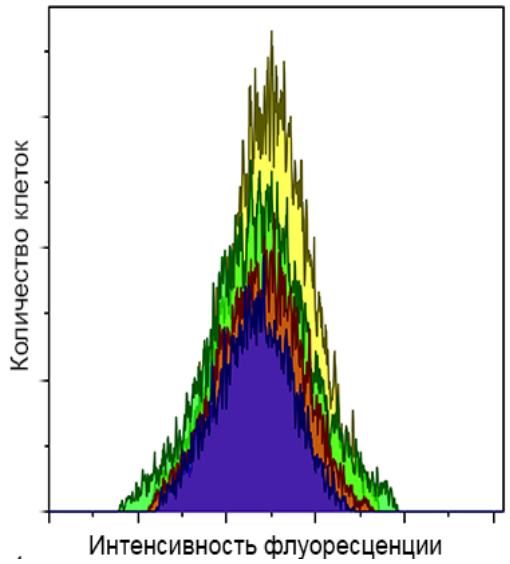


Рисунок 1. Гистограмма распределения нейтрофилов по способности к реакции респираторного взрыва у здоровых доноров. Каждый цвет соответствует одному донору

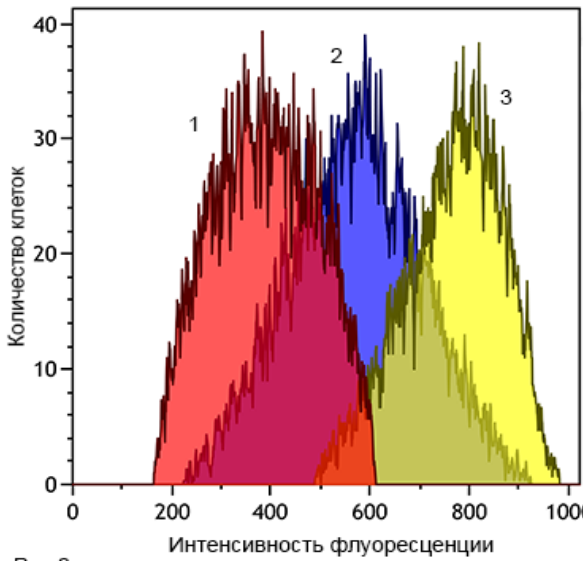


Рисунок 2. Гистограмма распределения нейтрофилов по способности к реакции респираторного взрыва для: 1 – пациентов с бактериальной инфекцией, 2 – здоровых доноров, 3 – пациентов с вирусной инфекцией

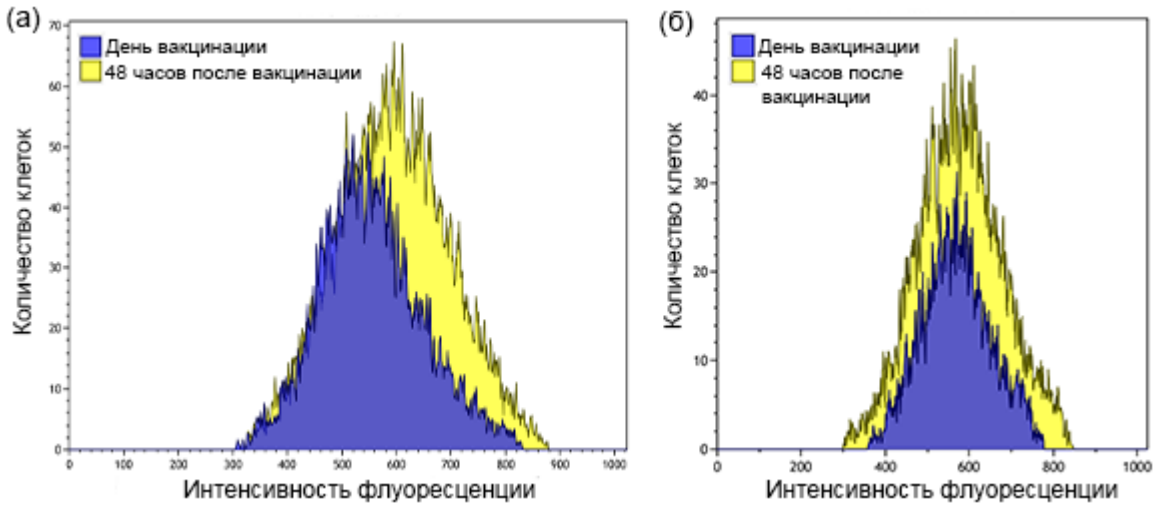


Рисунок 3. Оценка способности нейтрофилов к реакции респираторного взрыва в день вакцинации и через 48 часов после неё. (а) Гистограмма распределения нейтрофилов по способности к РРВ после вакцинации живой гриппозной вакциной (ЖГВ); (б) Гистограмма распределения нейтрофилов по способности к РРВ после вакцинации инактивированной гриппозной вакциной “Ультрикс”

С целью дальнейшего изучения наблюдаемого эффекта были проведены измерения функциональной активности нейтрофилов здоровых людей после вакцинации противогриппозными вакцинами. Основываясь на результатах вышеописанного эксперимента, измерения производили в день вакцинации и через 48 часов после неё. Исследование показало, что инактивированная гриппозная вакцина (ИГВ) не оказывает влияния на функциональную активность нейтрофилов (Рис. 3(а)), в то время как треть вакцинированных живой гриппозной вакциной (ЖГВ) продемонстрировали изменение данной активности, аналогичное первоначальному исследованию больных с ОРВИ (Рис. 3(б)). В обоих экспериментах выборка составила 6 человек.Полученные результаты могут быть свидетельством опосредованного влияния, оказываемого вирусами (вирусными инфекциями) на функциональную активность нейтрофилов, а именно на их способность к реакции респираторного взрыва. Вполне вероятно, что это влияние опосредовано и осуществляется через провоспалительные факторы плазмы крови, например, белки острой фазы воспаления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaufmann SH. Immunology's foundation: the 100 year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. Nat Immunol 2008; 9:705–12.
2. Witko-Sarsat et al. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. Trends Immunol. 2011. 32:117–124.
3. Pillay et al. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. Blood. 2010. 116:625–627.
4. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity. 2010. 33:657–670.
5. Bratton D.L. and P.M. Henson Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. Trends Immunol. 2011.32:350–357.
6. Nordenfelt P. and Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. J. Leukoc. Biol. 2011. 90:271–284.
7. Borregaard N. et al. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Trends Immunol. 2007. 28:340–345.
8. Leto T.L. and Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. Antioxid. Redox Signal. 2006. 8:1549–1561.
9. Soehnlein O. Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. J. Mol. Med. 2009. 87:1157–1164.
10. Filatov M., Varfolomeeva E., Ivanov E. Flow cytofluorometric detection of inflammatory processes by measuring respiratory burst reaction of peripheral blood neutrophils // Biochem. Mol. Med. 1995 Vol. 55, № 2. P. 116–121.
11. Е.Ю. Варфоломеева и др. Регистрация воспалительных процессов при различных заболеваниях методом проточной цитофлюорометрии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 149, № 4. С. 471–475.

УДК 57.084

КОЛЛАГЕНОВАЯ СЕТЧАТАЯ СТРУКТУРА КАК НАДЕЖНЫЙ КАРКАС ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

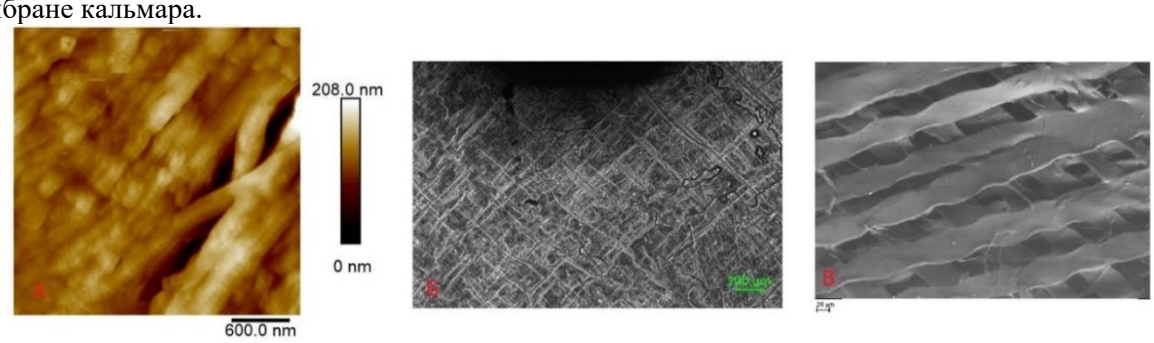
А.А Фролова[1], Ю.М. Ефремов[1], С.Л. Котова[1,2], П.С. Тимашев[1,2,3,4]

[1] МГМУ им. И.М. Сеченова, г. Москва, Россия
[2] Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН; г. Москва, Россия
[3] ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, г. Москва, г. Троицк, Россия
[4] МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

Задача тканевой инженерии состоит в том, чтобы при создании материала для использования в человеческом организме максимально приблизится к природному материалу по свойствам и качеству.

В данной работе исследована мембрана, полученная из гигантского кальмара вида Dosidicus Gigas из семейства Ommasrephinae. Этот вид кальмаров обитает в Тихом океане, вдоль побережья Перу на глубине от 200 до 700 метров. В длину кальмар может достигать почти двух метров, а продолжительность его жизни всего около двух лет. Обитая на глубинах, кальмары Dosidicus Gigas должны иметь очень надежную мускулатуру всего тела и органов. Мембрана, извлеченная из головоногого моллюска, имеет очень прочную структуру, чем и заинтересовала нас.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) обнаружила, что мембрана имеет многослойную сетчатую структуру, с уложенными под разными углами «лоскутами» (лентами), похожую на армирующую сетку (рис. 1-В). Анализ микрорельефа поверхности мембраны с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) показал, что сами «лоскуты», из которых состоит сетка мембраны, в свою очередь сложены из коллагеновых волокон и фибрилл (рис. 1-А). Фибриллы имеют d-период ≈65нм, характерный для коллагеновых структур. Для идентификации коллагена в исследуемом материале применяли аминокислотный анализ, ИК-анализ, определяли температуру сваривания материала, регистрировали сигнал генерации второй гармоники (ГВГ) с помощью двухфотонного микроскопа с Ti-La лазером. Полученные этими методами данные подтвердили наличие коллагена в исследуемой мембране кальмара.



А Б В

Рисунок 1: А – топография поверхности мембраны с помощью АСМ, размер изображения 3х3мкм; Б – поверхность мембраны под оптическим микроскопом, 10х увеличение; В – поверхность мембраны с помощью СЭМ

Были также исследованы механические характеристики коллагеновой мембраны кальмара в опытах на растяжение. Кривые на растяжение показали высокую прочность, как в сухом (80±20МПа), так и в гидратированном состоянии (20±8МПа), а также высокие значения модуля Юнга материала. Клеточные эксперименты с клетками МСК из десны и тестами AlamarBlue assay, Live/Dead и PicoGreen показали, что мембрана не проявляет цитотоксических свойств. Также проведена подкожная имплантация материала животным с целью исследования потенциальных отрицательных реакций. На основании результатов исследования in vivo можно заключить, что мембрана недостаточно обработана (т. е. очищена, стерилизована и т. д.), так как вызывает очень высокий иммунный ответ.

По результатам структурных и механических исследований, данную мембрану можно предложить в качестве материала для замены коллагенсодержащих тканей, испытывающих высокую механическую нагрузку в организме, например, связок, после обработки, улучшающей ее биосовместимость.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 18–29–06059 мк.

УДК 531.4:57.088.3:621.892.3

МЕТОД УЛЬТРАЗВУКОВОГО ДИСПЕРГИРОВАНИЯ КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ ФУЛЛЕРЕНОВ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА

К.С. Эльбекьян [1], А.А. Комарова[1], О.А. Дюдюн [1], З.Х. Султыгова [2], Р.Д. Арчакова [2], О.А. Яндиев[2], А.В. Блинов [3]

[1] Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия
[2] Ингушский государственный университет, Магас, РИ, Россия
[3] Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Фуллерены – это особый класс химических соединений, уникальность которых определяется их строением. Биологические свойства представителей любого класса соединений определяются их физическими и химическими свойствами. Однако, в приложении к наноструктурам углерода вообще и фуллеренам в частности, мы переходим от «обычных» систем к системам наноразмеров. Хорошо известно, что в области наномира действуют иные законы, согласно которым свойства вещества зависят не только и не столько от его состава, сколько от геометрии, формы и размера наночастиц [1].

Основная проблема изучения биологических свойств фуллеренов связана с их нерастворимостью в воде и других полярных растворителях. По данным C.T. Jafvert и P.P. Kulkarni, растворимость фуллерена С60 в воде составляет 7,96 нг/л, поэтому приходится придумывать обходные пути [2].

Исследование растворимости в растительном масле связано, прежде всего, с изучением вопроса о совместимости лёгких фуллеренов с маслами. Модифицирующие добавки фуллеренов к маслам вызывают резкое уменьшение окисляемости, увеличение фотостабильности и бактерицидности жидкой фазы. В данной работе представлена технология получения композиции фуллеренов на основе растительного масла методом ультразвукового диспергирования.

Эксперимент по получению фуллеренсодержащей сажи (ФС) проведен с применением установки ДУГА-4М (в дуговом разряде на графитовых электродах) [3]. Использовались графитовые стержни диаметром 12 мм между электродами в диапазоне 120–180 Вт/мм^2. В качестве рабочего инертного газа использовался гелий группы «А» при давлении от 20 кПа до 93 кПа при прохождении тока с напряжением 60 В и силой тока от 300 – 400 А. Расстояние между электродами варьировалось в интервале от 3,0 мм до 7,0 мм. При таком способе получения фуллеренов (С60-С70) их содержание в ФС достигает 10 %.

С использованием системы спектроскопии Микро-Раман для исследования структуры образцов ФС методом комбинационного рассеяния на спектрометре InVia Raman microscope Renishaw были получены спектры комбинационного рассеяния света (КРС). Спектр представляет широкую полосу, на которой присутствуют характерные два максимума ~1340 см$^{-1}$ (полоса близкая к линии алмаза и колебаниям деформированных sp^3 связей) и ~1585 см$^{-1}$ (соответствует колебаниям гексагонов в молекуле С60) [4].

Композиция фуллеренов на основе растительного масла (кукурузного рафинированного) получена способом ультразвукового (УЗ) диспергирования ФС в ультразвуковой мойке Elmasonic S10H при температуре 50^0 С при частоте 37 кГц в диапазоне 15 – 60 мин. По результатам предварительного исследования (ЛОМО МСП-1) увеличение времени диспергирования приводит к эффективному разрушению кластеров и формированию устойчивых микрогетерогенных систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биологическая активность фуллеренов – реалии и перспективы / М.А. Думпис, Д.Н. Николаев, Е.В. Литасова, В.В. Ильин, М.А. Брусина, Л.Б. Пиотровский // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2018/16/1
2. Jafvert CT, Kulkarni PP. Buckminsterfullerene's C60 Octanol-Water Partition Coefficient Kow and Aqueous Solubility. Environ Sci Technol. 2008; 4216:5945–5950. doi: 10.1021/es702809a
3. Разработка методов выделения фуллеренов из сажи / Парчиева М.М., Цурова А.Т., Султыгова З.Х., Арчакова Р.Д. // Материалы региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодые исследователи в поиске». – Магас, 2012.
4. Спектры комбинационного рассеяния света карбинофуллереновых структур / Н.Н. Мельник, Д.Ю. Коробов, О.С. Пляшечник, В.В. Савранский // Краткие сообщения по физике ФИАН, 2013, № 7, С. 24–28.

УДК 577.113.4; 547.97; 54.057

НОВЫЙ ИНДОТРИКАРБОЦИАНИНОВЫЙ КРАСИТЕЛЬ ДЛЯ МАРКИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ

В.Е. Шершов, В.Е. Кузнецова, Р.А. Мифтахов, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

В современной медицинской диагностике важное место занимают методы оптической визуализации, основанные на использовании флуоресцентных красителей. Одними из видов флуоресцентных красителей являются цианиновые красители, которые широко используются для маркирования биомолекул, включая антитела, ДНК-зонды, авидин, стрептавидин, липиды, биохимические аналоги, пептиды и лекарства, а также для различных приложений, таких как секвенирование ДНК, ДНК- и белковые микрочипы, вестерн-блоттинг, анализ проточной цитометрии. Условиями использования данных красителей является высокая растворимость в водно-солевых растворах, т. к. биологические процессы протекают в водных средах, восприимчивость ДНК-полимеразами, если речь идет о процессах связанных с амплификацией флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК, термо- и фотостабильность и др. Помимо вышесказанного, использование красителей ближнего ИК-диапазона (700–900 нм) позволяют перейти в область с наименьшей собственной фоновой флуоресценцией биологического материала, что увеличивает чувствительность регистрации флуоресцентно-меченых биологических макромолекул.

Нами синтезирован новый водорастворимый нейтрально заряженный цвиттер-ионный индотрикарбоцианиновый краситель, активная форма которого представлена на рисунке 1. Синтезированный краситель обладает достаточной водорастворимостью за счет наличия сульфо и сульфамидоалкильных групп, что обеспечивает его использование в водных и водно-органических средах. Циклогексеновый фрагмент в полиметиновой цепи обеспечивает жесткость хромофора увеличивая его хемо- и термостабильность. За счет наличия активированной карбоксильной группы, в виде N-оксисукцинимидного эфира, краситель пригоден для последующей конденсации с модифицированными нуклеозидтрифосфатами, олигонуклеотидами и другими разнообразными биологически активными макромолекулами, которые содержат первичную алифатическую аминогруппу, для получения соответствующего флуоресцентно-меченного соединения. За счет того, что общий заряд хромофора скомпенсирован и является нейтральным, пиримидиновые нуклеотиды флуоресцентно-меченные данным красителем по 5-положению основания через 3-амино-1-пропеновый линкер встраиваются ДНК-полимеразами в растущую цепь ДНК в ходе ПЦР. Представленный краситель имеет максимумы поглощения и флуоресценции 774 нм и 794 нм (в PBS) соответственно. Квантовый выход флуоресценции равен 14 % и коэффициент молярной экстинкции – $2{,}8*10^5$ (л*моль$^{-1}$*см$^{-1}$).

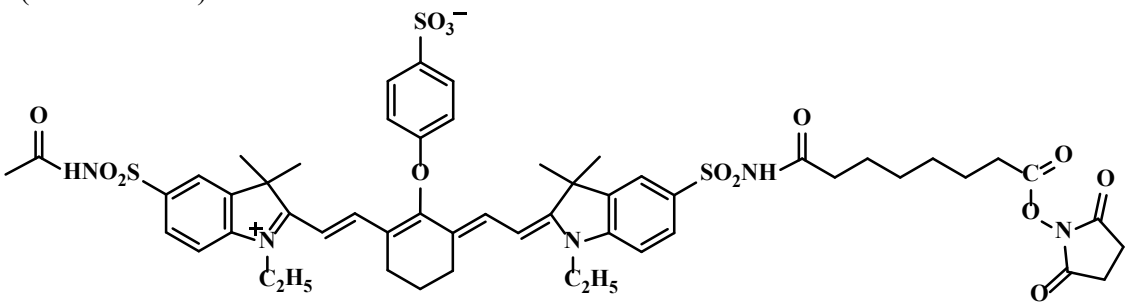


Рисунок 1 – Химическое строение N-оксисукцинимидного эфира индотрикарбоцианинового красителя.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2018–2020 гг. (СП-274.2018.4)»

УДК 66.047

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ЛАНТАНИДОВ В ИММУНОАНАЛИЗЕ

П.В. Храмцов

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Целью работы была разработка наночастиц для флуоресцентного иммуноанализа с временным разрешением на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА), а также комплексов катионов европия с 1,10 – фенантролином и п-толуилпировиноградной кислотой (ТПК)

Флуоресцентные наночастицы синтезировали методом репреципитации, добавляя смесь 1,10 – фенантролина, ТПК и европия в ДМСО к водному раствору БСА. Соотношение объемов растворов составляло 1:100 соответственно. Полученные наночастицы функционализировали стрептавидином при помощи глутарового альдегида. Функциональную активность наночастиц тестировали при помощи твердофазного флуоресцентного анализа с временным разрешением (λ_{ex} = 350 нм, λ_{em} = 620 нм, время задержки – 100 мс).

Средний размер наночастиц составлял от 100 до 300 нм зависимости от концентрации БСА. Фунционализированные стрептавидином наночастицы стабильны в нейтральном фосфатном буфере. Применение флуоресцентных наночастиц позволяет осуществлять детекцию биотинилированного БСА.

Синтезированные наночастицы обладают способностью к длительной флуоресценции с узким пиком эмиссии (максимум 620 нм), характерным для хелатов европия. Это свойство позволяет снижать влияние аутофлуоресценции образца. Использованная в работе технология функционализации наночастиц позволяет создавать флуоресцентные конъюгаты с другими распознающими молекулами, в частности моноклональными антителами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Калининградской области в рамках научного проекта № 19–415–393005

УДК 57.08: 616.9

МИФЫ И РЕАЛЬНОСТЬ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ: НОВЫЕ ВЫЗОВЫ В УСЛОВИЯХ ПАНДЕМИИ

П.С. Тимашев

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Тканевая инженерия является одним из бурно развивающихся мультидисциплинарных направлений и призвана изменить парадигму традиционной медицины путем предоставления возможности создания органов и тканей в лабораторных условиях. Как любое новое направление, тканевая инженерия окутана мифами, которые чрезвычайно устойчивы не только в обществе, но и профессиональном сообществе. Среди них можно отметить стойкое убеждение в абсолютной туморогенности формируемых конструктов, отсутствии доступа к таким технологиям для рядового пациента и невозможности применения у пожилых. Однако последние исследования, в том числе успешно проводимых в России, показывают нежизнеспособность таких утверждений. Одним из ярких примеров отечественной тканевой инженерии является формирование стенки уретры с многослойной эпителиальной выстилкой с помощью клеток, выделенных из буккального эпителия пациента, и гибридной матрицы, которая была успешно трансплантирована человеку.

Однако 2020 год стал годом вызовов, одним из которых является пандемия коронавирусной инфекции, которая наложила сильный отпечаток на все сферы деятельности человека, включая тканевую инженерию. Пути преодоления этого кризиса и непосредственная роль тканевой инженерии в этом процессе является предметом бурного обсуждения в научном сообществе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (18–15–00401) и Российского фонда фундаментальных исследований (20–02–00712).

УДК 60.604

БИОТЕХНОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РИБОНУКЛЕАЗ БАРНАЗЫ И БИНАЗЫ

А.А. Шульга[1], Е.В. Коновалова[1], Т.И. Лукьянова[1], В.А. Миткевич[2], А.А. Макаров[2], С.М. Деев[1]

[1]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

[2] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Бактериальные рибонуклеазы (РНКазы) вызывают значительный интерес в качестве потенциальных лекарственных средств. Судя по количеству научных публикаций, наиболее популярными являются РНКазы барназа и биназа, продуцируемые в природе бактериями *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus intermedius*, соответственно [1]. Барназа и биназа очень похожи по структуре – гомология аминокислотных последовательностей достигает 82 %, а третичные структуры практически совпадают. Ферментативные свойства также очень похожи. РНКазы не имеют дисульфидных связей и не нуждаются ни в посттрансляционных модификациях, ни в ионах двухвалентных металлов, ни в каких-либо других компонентах для проявления своей каталитической функции. Поэтому ферменты активны в любой клетке, в которую попадают. РНКазы обладают цитотоксическим действием на многие виды опухолевых клеток и, в связи с этим, представляет интерес для приготовления на их основе эффективных лекарственных средств, для лечения некоторых видов рака [2, 3]. Одним из наиболее перспективных направлений разработки противоопухолевых препаратов на основе РНКаз является конъюгация их с другими биологически активными молекулами с целью повысить избирательность действия на опухолевые клетки [4]. Бациллярные клетки синтезируют специальный белок барстар для защиты от токсичного действия барназы. Барстар образует очень крепкую связь с барназой, полностью блокируя ее активность (коэффициент ассоциации прим. 10^{14} M^{-1}) [5]. У обоих белков *N*- и *C*-концевые части локализованы на поверхности белковых глобул вне интерфейса их взаимодействия и доступны для соединения с другими белками в составе рекомбинантных конструкций. Способность барназы формировать высокоаффинный комплекс с барстаром позволяет использовать их в качестве метки (или вектора) для конъюгации с другими белками и пептидами по типу «молекулярного конструктора» для достижения различных целей, например, для самосборки гетеромерных надмолекулярных структур [6]. Бактериальные рибонуклеазы являются также эффективным противовирусным средством, что является особенно актуальным на настоящий момент. Барназа подавляла инфекцию вирусов герпеса и бешенства в экспериментах как in vitro, так и in vivo [7–9]. Биназа блокировала размножение вируса гриппа H1N в клеточной линии легких человека A549 [10]. Аналогичные эффекты наблюдали на линии клеток, зараженных коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) и коронавируса человека 229E (HCoV-229E) [11].

Сохраняющаяся популярность барназы и биназы диктует необходимость получения этих белков в больших количествах. Вместе с тем, имеющиеся в распоряжении исследователей экспрессионные системы для РНКаз барназы и биназы [12,13] характеризуются низким и нестабильным уровнем синтеза белка. Кроме того, препараты РНКаз, получаемые с их помощью, отличаются гетерогенностью из-за неправильного процессинга лидерного пептида щелочной фосфатазы *E. coli* phoA. В данной работе вышеупомянутые проблемы были решены за счет замены лидерной последовательности phoA на лидерную последовательность термостабильного токсина STII *E. coli* и постановки модифицированных генов под транскрипционный контроль T7 промотора. Сборку генов, кодирующих РНКазы барназу и биназу, имеющих на *N*-конце сигнальный пептид STII, осуществляли при помощи метода ПЦР. Плазмиды для экспрессии генов барназы и биназы получали путем клонирования фрагментов ДНК, содержащих модифицированные гены барназы / биназы и барстар, в вектор pET9a по сайтам рестрикции *NdeI* и *BamHI*. Для преодоления токсичности РНКаз в экспрессионные конструкции вставляли ген природного ингибитора барназы, барстар, под собственным промотором. Для лучшего контроля за активностью генов экспрессионные кассеты, направляющие синтез РНКаз, были интегрированы в хромосому бактериальных клеток с помощью метода рекомбиниринга, подробно описанного в работе [14]. Метод основан на использовании мутантных RED белков бактериофага λ Exo, Beta и Gam, чья роль состоит в защите линейного двуцепочечного фрагмента ДНК от деградации внутриклеточными нуклеазами, и его последующей интеграции в заранее выбранное место бактериальной хромосомы. При помощи метода ПЦР были наработаны фрагменты ДНК, содержащие экспрессионную кассету и ген устойчивости к антибиотику (канамицину), снабженные на концах обширными последовательностями ДНК, гомологичными хромосомному локусу, выбранному для встраивания экспрессионной кассеты.

Протяженность гомологичных последовательностей составляла примерно 600 н.п., что должно было способствовать увеличению эффективности рекомбиниринга. При помощи метода электропорации наработанные фрагменты ДНК были перенесены в клетки BL21(DE3), которые синтезировали белки RED системы. После регенерации клетки были высеяны на твердую питательную среду, содержащую антибиотик канамицин. Как правило, в каждом эксперименте получали от двух до шести клонов, устойчивых к канамицину. Факт встраивания экспрессионной кассеты в хромосому доказывали при помощи метода ПЦР со специально сконструированных праймеров, часть из которых имела место посадки вблизи хромосомного локуса, выбранного в качестве места встраивания экспрссионной кассеты, другая часть праймеров отжигалась в пределах экспрессионной кассеты. В результате были получены несколько бесплазмидных штаммов, содержавших в своей хромосоме единичную копию экспрессионной кассеты барназы или биназы

В случае бесплазмидного рекомбинантного штамма в клетке содержится всего лишь одна копия целевого гена. Тогда как в плазмидном штамме копийность такого гена доходит до 15–20. Общепринятым является представление, что увеличение копийности гена должно приводить к увеличению продуктивности штамма. В данном исследовании нами была проверена правильность такой концепции. Выращивание штаммов проводили в параллели и в одних и тех же условиях. Для упрощения эксперимента использовали автоиндукционную среду [15]. Бесплазмидные штаммы воспроизводимо давали либо сравнимый, либо значительно более высокий выход РНКаз, чем плазмидный штамм. Можно предположить, что причиной этого является более высокая стабильность таких штаммов, связанная с растянутым во времени синтезом целевого белкового продукта, не перегружающего синтетический аппарат клетки. Кроме того, известно, что процесс секреции в *E. coli* протекает более эффективно, если растянут во времени. Для такого токсичного продукта, каким является РНКаза, это имеет решающее значение. Взрывной синтез белка может приводить к его накоплению в цитоплазме в непроцессированном виде, что в случае с РНКазой является абсолютно недопустимым.

Сравнительный экспрессионный анализ бесплазмидных рекомбинантных штаммов, продуцирующих РНКазы барназу и биназу, и аналогичных штаммов, в которых синтез РНКаз обеспечивался плазмидами, выявил превосходные характеристики бесплазмидных штаммов. Суммарный выход белков при выращивании в небольших объемах культуры составлял примерно 400 мг/л для барназы и 150 мг/л для биназы. Как правило, значительная часть белка оставалась в периплазматическом клеточном пространстве – не менее половины. Автоиндукционная среда ZYM-5052 гарантировала высокие выходы белков и хорошую воспроизводимость результатов. Оптимальная температура для выращивания штаммов – 37ºС. Предпочтительная продолжительность культивирования в колбах – не более 24 часов.

Был разработан эффективный метод выделения и очистки РНКаз барназы и биназы, который включал (1) экстракцию белков из клеточной периплазмы при помощи метода осмотического шока, (2) осаждение белков из экстракта при помощи сульфата аммония, (3) диализ, (4) хроматографию на колонке, набитой катионообменником S-Sepharose, (5) гель фильтрацию на колонке, набитой Sephadex G50 SF.

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18–04–00365а и № 18–29–08024мк)

ЛИТЕРАТУРА

[1] – T.G. Balandin, et al. (2011) FEBS J. 278(19): 3633–3643.
[2] – E. Edelweiss et al. (2008) PLoS ONE 3. e2434.
[3] – A.A. Makarov, A. Kolchinsky, O.N. Ilinskaya (2008) Bioessays 30(8):781–790.
[4] – S.M. Deyev (2011) Invest. New Drugs 29(1): 22–32.
[5] – R.W. Hartley (1989) Trends Biochem. Sci. 14: 450–454.
[6] – С.М. Деев, Е.Н. Лебеденко (2015) Биоорган. химия 41: 539–552.
[7] – I.I. Alekseeva et al. (1981) Antibiotiki 26(7): 527–532.
[8] – С.В. Грибенча и др. (2004) Вопр. вирус. 49: 38–41.
[9] – С.В. Грибенча и др. (2004) Вопр. вирус. 51: 41–44.
[10] – M.R. Shah, O.N. Ilinskaya (2013) Acta Naturae 5(4): 44–51.
[11] – C. Müller (2017) BioNanoSci. 7, 294–299.
[12] – R.W. Hartley (1988) J. Mol. Biol. 202: 913–915.
[13] – A.L. Okorokov, R.W. Hartley, K.I. Panov (1994) Protein Expr. Purif. 5: 547–552.
[14] – M. Nakayama, O. Ohara (2005) Biotechniques 38: 917–924.
[15] – F.W. Studier (2005) Protein Expression Purif., 41(1): 207–234

УДК 66.047

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

З.И. Хайбуллин[1,2], А.С. Курьянова[3], Т.С. Демина[1,2,3], П.С. Тимашев[3], Т.А. Акопова[1]

[1] Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова, Москва, Россия
[2] Московский авиационный институт, Москва, Россия
[3] Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из ключевых факторов, сдерживающих широкое применение полимерных материалов для тканевой инженерии в клинической практике, является сложность создания биодеградируемых матриксов, которые могли бы не только выступать в качестве временных подложек для адгезии и роста клеток, но и способствовать регенерации ткани / органа, сохраняющего свой функционал [1, 2]. Такой материал должен удовлетворять целому ряду требований как с точки зрения морфологии и свойств, так и технологичности переработки полимера в материал, который во многих случаях должен быть индивидуальным для каждого конкретного пациента. При создании биорезорбируемых полимерных материалов с заданными свойствами необходимо комбинировать полимеры разной природы, т. к. при использовании только одного типа практически невозможно получить материал, который был бы биосовместимым, биоактивным, обладал заданной скоростью биорезорбции, деформационно-прочностными характеристиками, четко заданной архитектоникой и т. д. Но в случае комбинирования разных полимеров в процессе создания на их основе композиционного материала возникает ряд технологических трудностей, что лимитирует как возможность регулирования их структуры / морфологии для каждого конкретного пациента, так и затрудняет их промышленное производства и, соответственно, трансляцию принципов тканевой инженерии в широкую клиническую практику. Альтернативным подходом к комбинированию разных полимеров является синтез сополимеров на их основе, т. е. комбинирование на макромолекулярном уровне, что может быть достаточно сложным с синтетической точки зрения, но открывает широкие перспективы в технологии создания различных форм материалов и регулирования их структуры/свойств.

Биоразлагаемые сложные полиэфиры (полилактид, полилактид-со-гликолид, поликапролактон и т. д.) зарекомендовали себя как надежные полимеры для создания широко спектра биорезорбируемых и биосовместимых материалов. [3,4]. Синтетические олиго-/полиэфиры обладают хорошими механическими свойствами и обеспечивают возможность получения сложных трехмерных структур с помощью ряда технологических подходов. В среде организма процесс гидролиза сложноэфирных связей этих полимеров протекает при наличии воды и содержащихся в биологических жидкостях ионов и ферментов, которые могут влиять на кинетику процесса биорезорбции. Продукты гидролиза выводятся, включаясь в метаболизм, а скорость гидролиза можно легко регулировать, изменяя химический состав и структуру полимера. Наиболее важными областями применения сложных полиэфиров являются: рассасывающиеся хирургические шовные нити, системы доставки лекарственных веществ, сердечно-сосудистые и ортопедические временные крепежные элементы, матриксы для тканевой инженерии и искусственных органов. Однако существенным недостатком полиэфиров является отсутствие специфических функциональных групп для прикрепления и роста клеток, что ограничивает эффективность материалов на их основе в качестве матриксов для тканевой инженерии. Полимеры природного происхождения, в т. ч. полисахариды и белки, обладают целым рядом биологических свойств и обеспечивают необходимую биосовместимость материалов [5–7]. К сожалению, природные полимеры достаточно трудно перерабатывать, и материалы на их основе характеризуются относительно низкими механическими характеристиками. Поскольку свойства синтетических и природных полимеров дополняют друг друга, их сочетание является одной из популярных тем биоматериаловедения, в т. ч. в области синтеза сополимеров на их основе [8,9]. Получение сополимеров с использованием традиционных растворных подходов требует применения нескольких стадий синтеза и различных дополнительных реагентов. В настоящей работе синтез сополимерной системы на основе природных и синтетических полимеров проводили методом твердофазного реакционного смешения, что позволило избежать использования растворителей и катализаторов, которые могут быть цитотоксичными, что небезопасно при создании материалов медицинского назначения [10, 11].

Цель работы – синтез сополимеров различных биодеградируемых полимеров природного (хитозан, желатин) и синтетического (поликапролактон, олиго / полиэфир) происхождения, а также исследование возможности получения различных биодеградируемых материалов на их основе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали полилактид (ПЛА) с молекулярной массой (ММ) 100 кДа, поликапролактон (ПКЛ) с ММ 67 кДа, олиго(L-лактид) с ММ 5 кДа, желатин, хитозан с ММ 80 кДа и степенью деацетилирования (СД) 0.89. Многокомпонентную систему на их основе получали с помощью механохимического подхода с использованием двухшнекового экструдера Berstorff, обладающего силовыми наборными элементами шнеков для сжатия и сдвигового деформирования компонентов ниже температуры плавления полиэфиров и без использования растворителей. Полученная система состояла из поликапролактона / полилактида / хитозана / олиголактида / желатина в соотношении 18/37/20/5/20 мас.% и была промаркирована как ППХОЖ [12]. Продукты реакции исследовали с помощью фракционного анализа в различных средах, ИК-спектрометрии, дифференциальной сканирующей калориметрии и динамического лазерного светорассеяния (ДЛС).

Микрочастицы из ППХОЖ и его смесей с ПЛА получали методом испарения растворителя из эмульсии масло / вода по методике, описанной в [13,14]. Раствор сополимера ППХОЖ или его смеси с ПЛА в смеси растворителей дихлорметан / ацетон (9/1 об./об.) использовали в качестве дисперсной фазы, а в качестве дисперсионной среды выступала дистиллированная вода. Дисперсную фазу эмульгировали в дисперсионной среде при 700 об/мин до полного испарения растворителей из дисперсной фазы. Образовавшиеся твердые микрочастицы промывали, фракционировали по размерам и сушили под вакуумом из замороженного состояния. Общий выход изготовленных микрочастиц рассчитывали как отношение массы полученных микрочастиц к общему количеству смеси сополимера с полилактидом, растворенного в дисперсной фазе для каждой системы.

Пленочные материалы получали из 1 мас.% раствора ППХОЖ в хлороформе методом полива на стеклянную чашку Петри и сушили в беспылевом шкафу при комнатной температуре. Нетканые материалы из ППХОЖ получали методом электроформования (ЭФ) на установке ESR100D NanoNC (Корея) из стабильных фракций сополимера ППХОЖ в хлороформе. Все параметры обработки были предварительно оптимизированы для получения бездефектных волокнистых материалов толщиной 100–120 мкм [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные ИК-спектроскопии указывают на образование привитых сополимеров в процессе механохимической обработки реакционной смеси. Наиболее вероятным каналом реакции является аминолиз сложноэфирных связей олиго/полиэфиров аминогруппами хитозана. Фракционный анализ ППХОЖ показал, что прививка на хитозан / желатин фрагментов сложных олиго / полиэфиров приводит к снижению их растворимости в водных средах, что, однако, компенсируется их способностью образовывать ультратонкие дисперсии в хлорсодержащих растворителях, что для исходных полисахаридов/белков нехарактерно. Согласно данным ДЛС анализу ППХОЖ в хлороформе образует стабильные растворы со средним размером макромолекулярных ассоциатов приблизительно 550 нм, а также фракцию ассоциатов с субмикронным размером (рис. 1).

Амфифильные свойства ППХОЖ обеспечивают возможность использовать их для получения «самостабилизирующихся» микрочастиц методом испарения растворителя из эмульсий масло / вода. В зависимости от соотношения сополимер ППХОЖ/гомополимер ПЛА в дисперсной фазе выход микрочастиц варьировался от 36 до 46 мас.%, что ниже значений, полученных при использовании других привитых сополимеров хитозана с олиго / полиэфирами [13,14]. Способность сополимера стабилизировать границу раздела фаз в процессе получения микрочастиц зависит от миграции гидрофильных фрагментов на границу раздела фаз и, вероятно, затруднено достаточно длинными привитыми фрагментами ПКЛ и ПЛА в случае сополимера ППХОЖ. Набольший выход микрочастиц был характерен для системы, состоящей из 70 мас.% ПЛА и 30 мас.% ППХОЖ в дисперсной фазе. Полученные микрочастицы имели средний размер ~ 400 мкм и сферическую форму (рис. 2). Полимерные биодеградируемые микрочастицы, в т. ч. из ППХОЖ, а также его смеси с ПЛА, могут использоваться в качестве биодеградируемых клеточных многофункциональных микроносителей, а также в качестве исходного материала для создания трехмерных материалов на их основе с помощью различных методов, в т. ч. аддитивных технологий [15–18].

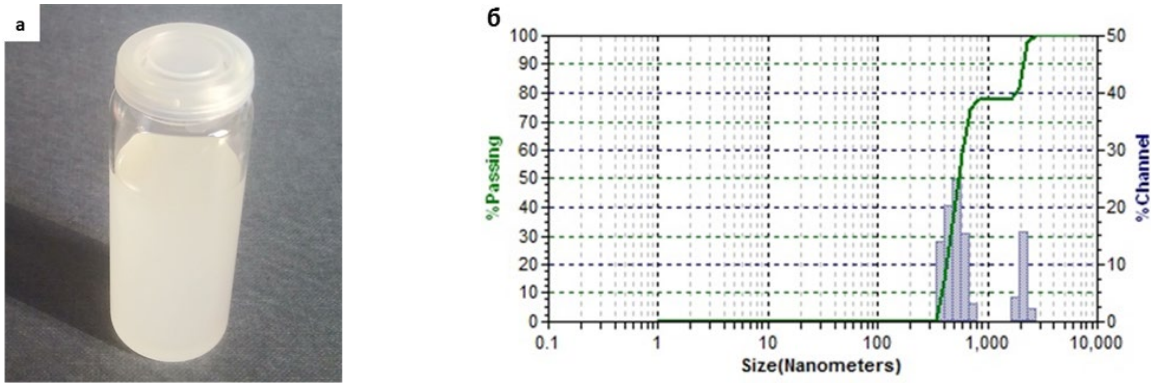


Рис. 1. Фото стабильной дисперсии ППХОЖ в $CHCl_3$ (а); гистограмма распределения макромолекулярных ассоциатов в 0.2 мас.% растворе ППХОЖ в $CHCl_3$ по данным ДЛС (б)

Возможность получать микрочастицы из амфифильных сополимеров позволяет избежать использования дополнительных эмульгаторов в дисперсионной среде в процессе их формования, а также обогатить их поверхность биоактивными природными полимерами, что важно для прикрепления/роста клеток как на поверхности микрочастиц, так и материалов на их основе.

Сниженная растворимость в водных средах и способность образовывать дисперсии в апротонных органических растворителях позволяет получать обогащенные природными компонентами и стабильные в воде материалы из ППХОЖ с помощью и других методов. На рисунке 3 приведены микрофотографии пленки и микроволокнистого нетканого материала из ППХОЖ, полученные из его дисперсий в хлороформе с помощью метода полива и электроформования, соответственно. Метод электроформования в настоящее время является одним из наиболее эффективных технологий создания нетканых материалов из микро- и нановолокон и позволяет получать высокопористые материалы, которые имитируют оригинальный внеклеточный матрикс. Сходство физической структуры волокна с внеклеточным матриксом обеспечивается за счет нанометрового диаметра волокон и их пористой поверхности. Полученные из ППХОЖ нетканые микроволокнистые материалы показали цитосовместимость по отношению к мезенхимальным стромальным клеткам человека и способность поддерживать их адгезию и рост в процессе культивирования *in vitro* [12].

Пленочные и нетканые материалы можно получить и из немодифицированного хитозана и желатина, но только из водных растворителей, что требует их дальнейшего перевода в нерастворимую форму с помощью, например, сшивающих агентов, что не всегда безопасно для дальнейшего применения в биомедицине. Способность ППХОЖ образовывать стабильные дисперсии в апротонных хлорсодержащих растворителях позволяет формовать материалы, которые не требует дальнейшей пост-обработки.

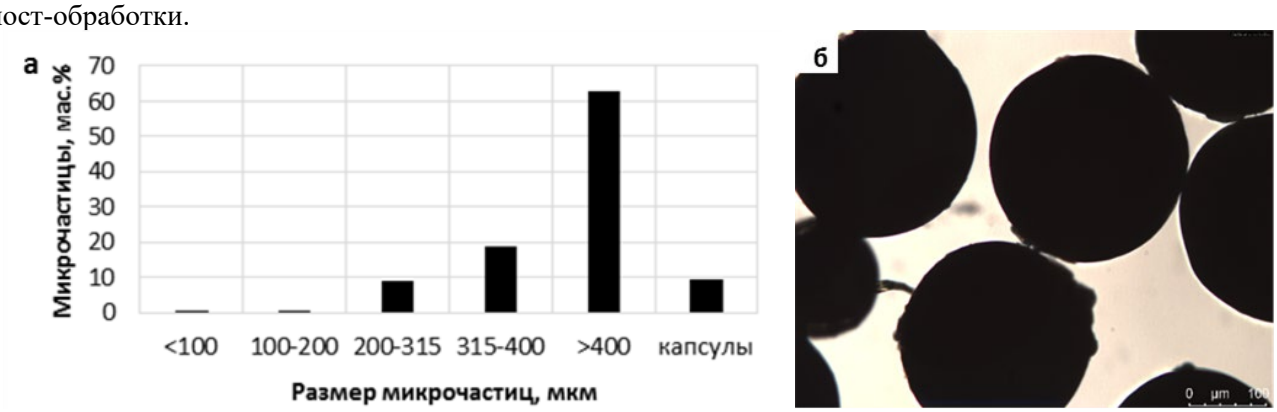


Рис. 2 Гистограмма распределения микрочастиц ПЛА/ППХОЖ по размерам (а) и микрофотография полученных микрочастиц (б)

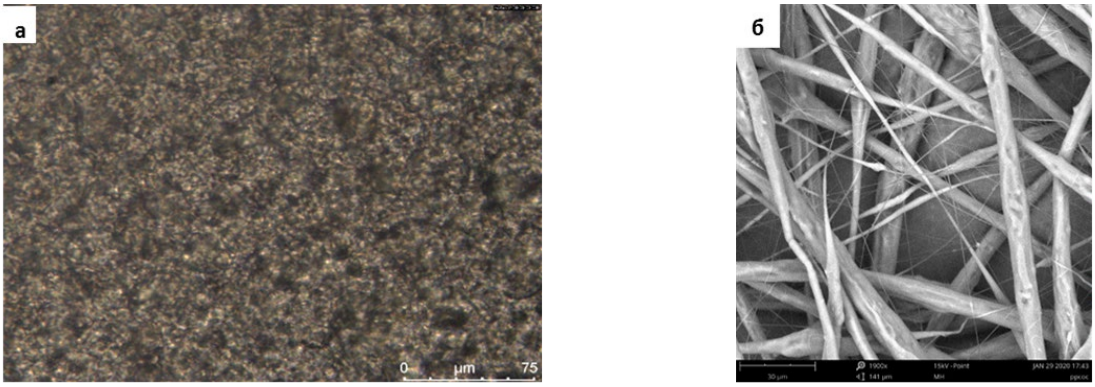


Рис. 3. Микрофотографии пленки (а) и нетканых микроволокнистых материалов (б), полученных, соответственно, методом полива и электроформования из дисперсии ППХОЖ в хлороформе

Таким образом, методом твердофазного синтеза была получена многокомпонентная сополимерная система на основе сложных олиго-/полиэфиров и полимеров природного происхождения. Результаты фракционного анализа показали, что полученный сополимер частично теряет растворимость в водных средах, но приобретает способность образовывать дисперсии в хлорсодержащих растворах. Сочетание гидрофильных и липофильных фрагментов обеспечивает амфифильные свойства ППХОЖ и возможность формировать из них микрочастицы, стабилизирующиеся без введения дополнительных эмульгаторов. Ультратонкие стаблильные дисперсии ППХОЖ можно также использовать для изготовления пленок или более сложных материалов в виде волокнистых нетканых материалов, полученных электроформованием. Наряду с технологичностью, материалы из ППХОЖ обладают цитосовместимостью к мезенхимальным стромальным клеткам человека и могут быть использованы в качестве матриксов для регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18–29–17050) в части получения и исследования нетканых материалов и гранта Президента (МК-1974.2019.3) в части формования и исследования сферических микрочастиц

ЛИТЕРАТУРА

1. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // Mater. Today. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 14, № 3. P. 88–95.
2. Hunsberger J.G., Shupe T., Atala A. An Industry-Driven Roadmap for Manufacturing in Regenerative Medicine // Stem Cells Transl. Med. 2018. Vol. 7, № 8. P. 564–568.
3. Gritsch L., et al. Polylactide-based materials science strategies to improve tissue-material interface without the use of growth factors or other biological molecules // Mater. Sci. Eng. C. Elsevier, 2019. Vol. 94, № August 2018. P. 1083–1101.
4. Poh P.S.P., et al. Polylactides in additive biomanufacturing // Adv. Drug Deliv. Rev. Elsevier B.V., 2016. Vol. 107. P. 228–246.
5. Anitha A., et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications // Prog. Polym. Sci. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 39, № 9. P. 1644–1667.
6. Ahsan S.M., Thomas M., Reddy K.K., Sooraparaju S.G., et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering // Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V., 2018. Vol. 110. P. 97–109.
7. Asghari F., Samiei M., Adibkia K., Akbarzadeh A., et al. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review // Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 2017. Vol. 45, № 2. P. 185–192.
8. Liu Y., Tian F., Hu K.A. Synthesis and characterization of a brush-like copolymer of polylactide grafted onto chitosan // Carbohydr. Res. 2004. Vol. 339, № 4. P. 845–851.
9. Li G., Zhuang Y., Mu Q., Wang M., et al. Preparation, characterization and aggregation behavior of amphiphilic chitosan derivative having poly (l-lactic acid) side chains // Carbohydr. Polym. 2008. Vol. 72, № 1. P. 60–66.
10. Akopova T.A., Zelenetskii A.N., Ozerin A.N. Solid state synthesis and modification of chitosan // Focus on Chitosan Research. 2011. 223–253 p.
11. James S.L., Adams C.J., Bolm C., Braga D., et al. Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis // Chem. Soc. Rev. 2012. Vol. 41, № 1. P. 413–447.
12. Demina T.S., Kuryanova A.S., Bikmulina P.Y., Aksenova N.A., et al. Multicomponent Non-Woven Fibrous Mats with Balanced Processing and Functional Properties // Polymers (Basel). 2020. Vol. 12, № 9. P. 1911.
13. Demina T.S., et al. Biodegradable cell microcarriers based on chitosan/polyester graft-copolymers // Molecules. 2020. Vol. 25, № 8.
14. Demina T.S., et al. Chitosan-g-Polyester Microspheres: Effect of Length and Composition of Grafted Chains // Macromol. Mater. Eng. 2019. Vol. 304, № 10. P. 1900203.
15. Li B., et al. Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering // J. Orthop. Transl. Elsevier Taiwan LLC and the, 2015. Vol. 3, № 2. P. 51–57.
16. Chen X.Y., et al. Recent advances in the use of microcarriers for cell cultures and their ex vivo and in vivo applications // Biotechnol. Lett. Springer Netherlands, 2019. Vol. 42, № 1. P. 1–10.
17. Jiang T., Abdel-Fattah W.I., Laurencin C.T. In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering // Biomaterials. 2006. Vol. 27, № 28. P. 4894–4903.
18. Zhou W.Y., et al. Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(l-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2008. Vol. 19, № 7. P. 2535–2540.

УДК 577.11

ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И КОЛЛАГЕНА ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН

Б.Ц. Шагдарова, А.В. Ильина, В.П. Варламов

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Гидрогели широко используются в биотехнологических целях, в качестве систем доставки лекарств, фармацевтике, сельском хозяйстве, биомедицине. Их физико-химические, механические и биосовместимые свойства зависят от типа, концентрации, соотношение полимеров и процесса изготовления. Гидрогели изготавливают как из натуральных полимеров, так и синтетических. Хитозан является покатионным, биоразлагаемым полисахаридом, проявляет адгезивность, биосовместимость с повреждёнными тканями и обладает антибактериальными свойствами [1]. Коллаген – фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма и обеспечивающий её прочность и эластичность, выполняет морфогенетическую функцию, влияя на рост, миграцию, дифференцировку различных клеток [2]. Таким образом, гидрогели на основе хитозана и коллагена могут быть использованы для заживления ран.

Для формирования гидрогелей использованы хитозан и коллаген. Образцы хитозанов с ММ 108 и 740 кДа получены из высокомолекулярного хитозана с ММ 1040 кДа (Биопрогресс, Московская область) методом химической деполимеризации с использованием азотной кислоты. Хитозан с ММ 200 кДа (Биопрогресс, Московская область). Коллаген I типа, полученный из хвостов крыс.

Была изучена антибактериальная активность и противогрибная активность хитозанов [3]. Минимальная ингибирующая концентрация для образцов относительно *S. epidermidis* и *C. albicans* составила 125 мкг/мл, наименьшая чувствительность образцов наблюдалась против *S. aureus* и *E. coli* (≈500 мкг/мл). Гидрогели приготовлены при соотношениях хитозана и коллагена (1:3, в:в) с использованием растворов сшивающих реагентов – генипина 5 мМ или 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида 25 мМ. Гели получены в 2 этапа: сначала растворы хитозана и коллагена смешивали, заливали в форму, замораживали и высушивали лиофильно, затем высушенные гели помещали в растворы с сшивающими реагентами, промывали, вновь замораживали и высушивали лиофильно. Для гидрогелей определен коэффициент набухаемости в 10 мМ фосфатном буфере при 37 °С в течении 24 ч, в качестве контроля использовали не сшитые гели [4]. Гели на основе хитозана с ММ 108 кДа обработанные разными сшивающими агентами набухали меньше остальных (210–280 %), тогда как контрольный гель без сшивки полностью разрушился через 6 ч. Гели, сформированные из хитозанов с ММ 200 и 740 кДа имели похожие значения коэффициента набухаемости (300–400 %). Все сшитые гели практически не изменились, контрольный гель из хитозана с ММ 700 кДа значительно увеличился в объемах и его коэффициент набухаемости достиг 2800 %. При изучении морфологии гелей с использованием макрофотографий, наблюдалась более пористая структура у гелей сшитых генипином, поры у гелей сшитых карбодиимидом были меньше и распределялись более равномерно.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 20–33–70168).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K. // *Int. J. Biol. Macromol*. 2017. V. 105. Part 2. P. 1358–1368.
2. Lee C.H., Singla A., Lee Y. // *Int. J. Pharm*. 2001. V. 221 P. 1–22
3. Шагдарова Б.Ц., Ильина А.В., Варламов В.П. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2016. Т. 52. № 2. С. 237–241.
4. Yang X, Bakaic E., Hoare T., Cranston E.D. // *Biomacromolecules*. 2013. V. 14. № 12. P. 4447–4455

УДК 577.25

БИОМАРКЕРЫ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

М.И. Шадрина, М.М. Руденок, А.Х. Алиева, П.А. Сломинский

Курчатовский институт, Москва, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) входит в число самых распространенных нейродегенеративных заболеваний. На данный момент этим недугом страдает более шести миллионов человек и в последние годы наблюдается увеличение числа пациентов с диагнозом БП и снижение возраста начала заболевания. Несмотря на многочисленные исследования, картина этиопатогенезаБП остается до конца невыясненной. Кроме того, известно, что процессы нейродегенерации при БП развиваются очень медленно. В настоящее время показано, что может пройти около двадцать лет с момента запуска нейродегенеративных процессов до проявления первых классических двигательных симптомов заболевания, по которым в настоящее время ставится диагноз. На данный момент не существует быстрых и недорогих методов диагностики БП на доклинической стадии.

В связи с этим нами ведется комплексный анализ молекулярно-генетических факторов, связанных с развитием данной патологии, который основан как на изучение моделей БП, так и выборок пациентов с БП.

Нами были отобраны *геныNSF, RAB5A, DRD2, ANXA2, VCP*, белки которых вовлечены в функционирование процессов транспорта, и гены *NRF1, PPARGC1A, PRKN, KIF1B, ZFP746, MYBBP1A*, белки которых связаны с функционированием митохондрий. Был проведен анализ изменения относительных уровней мРНК этих в тканях мозга, периферической крови мышей с МФТП-индуцированными моделями трех досимптомных и ранней симптомной стадий БП и в периферической крови пациентов с БП, находящихся на ранних стадиях развития заболевания. Для всех генов были выявлены статистически значимые изменения относительных уровней мРНК в тканях мышей с токсическими моделями БП. Наибольшее количество статистически значимых результатов было выявлено для генов *VCP, ANXA2, NRF1, MYBBP1A*. Эти данные указывают на важную роль данных генов в развитие патологического процесса при БП на самых ранних этапах развития нейродегенерации при БП. Кроме того, для гена *VCP* было показано специфичное для БП падение уровней мРНК в группе пациентов с БП, не подвергавшихся лечению, и в группе пациентов с вероятной БП. Эти данные позволяют рассматривать снижение относительных уровней мРНК *VCP* при БП как биомаркер развития патологии на ранних клинических и доклинических стадиях БП.

Выполнение работы частично поддержано Курчатовским геномнымцентром – ИМГ (соглашение № 075–15–2019–1664).

УДК 576.5

ВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ: КАК ДОБИТЬСЯ ФОРМИРОВАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КОНСТРУКТОВ

А.И. Шпичка, П.С. Тимашев

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

В настоящее время одним из ключевых вызовов в регенеративной медицине и тканевой инженерии является формирование микрососудистого русла, которое бы обеспечивало транспорт кислорода и питательных веществ внутри конструктов и предотвращало некроз при трансплантации. Одним из подходов для решения этой задачи является использование биоматериалов, индуцирующих васкуло- и ангиогенез, и среди них особый интерес представляет фибрин. Однако существенными недостатками фибрина являются быстрая биодеградация и мутность. В связи с этим целью нашей работы является синтез нетоксичной биодеградируемой модификации фибрина, которая может индуцировать васкулогенез. Нами были получены конъюгаты фибрина с ПЭГ в разных молярных соотношениях, были охарактеризованы их структурные (сканирующая электронная и атомно-силовая микроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия, малоугловое рассеяние рентгеновского излучения, спектроскопия и др.) и биологические (жизнеспособность клеток, индукция васкулогенеза) свойства. ПЭГилирование фибриногена позволило нам преодолеть указанные выше недостатки и достичь прозрачности геля и сохранения его биосовместимости. Использования кристаллографических структур фибриногена в высоком разрешении дало возможность провести моделирование формирования олигомеров и восстановить взаимную их ориентацию. Атомно-силовая и сканирующая электронная микроскопия вместе с другими методами позволила установить структуру конъюгатов и их свойства. Было выявлено, что ПЭГилированный 5:1 фибрин обеспечивал наиболее благоприятные условия микроокружения для распластывания, роста и пролиферации клеток. Внутри геля эндотелиальные и стромальные клетки формировали отростки и межклеточные контакты и экспрессировали специфичные белки экстрацеллюлярного матрикса и васкулогенеза. Морфологическое развитие совместной культуры внутри перфузируемой камеры вело к формированию взаимосвязанной сети из клеток. Кроме того, полученный гель поддерживал лучше развитие ветвящихся отростков по сравнению с чистым фибрином и другими его модификациями. Анализ скорости роста тубул, их длины и ветвления показал, что пред-дифференцированные стромальные клетки жировой ткани имеют более высокий ангиогенный потенциал, чем клетки из пупочного канатика. Полученные результаты дают возможность установить оптимальную модификацию фибрина, необходимую для контролируемого формирования геля с определенными свойствами для успешного инкапсулирования клеток и индукции васкуло- и ангиогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (18–15–00407) и Российского фонда фундаментальных исследований (18–29–06059).

УДК 577.113.4

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТНОЙ ПЛЕНКЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК

Р.А. Мифтахов, А.Ю. Иконникова, С.А. Суржиков, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта РАН, Россия, Москва

Применение ДНК биочипов в лабораторных исследованиях позволяет одновременно проводить многопараметрический микроанализ генетического материала, в том числе при диагностике соматических и инфекционных заболеваний.

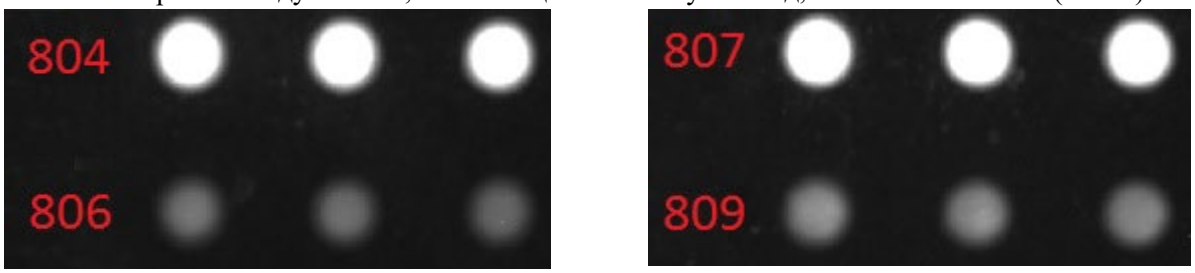
Нами разработан метод ковалентной иммобилизации олигонуклеотидных зондов на поверхности пленочной полиэтилентерефталатной (ПЭТ) подложки. Зонды иммобилизованы в виде матрицы двумерных ячеек. Иммобилизованные олигонуклеотиды сохраняют способность гибридизоваться с комплементарными фрагментами ДНК. Высокая специфичность связывания иммобилизованных зондов с анализируемой ДНК, а также низкое неспецифическое связывание анализируемой ДНК с подложкой позволяет уверенно дискриминировать анализируемые фрагменты ДНК, различающиеся одним нуклеотидом (Табл.1, Рис. 1).

На первом этапе получали активные карбоксильные группы на поверхности ПЭТ, обработав пленку раствором KOH в 96 %-ном EtOH. Для активации поверхностных карбоксильных групп использовали раствор N, N'-дисукцинимидилкарбоната в диметилсульфоксиде, получали соответствующие *N*-оксисукцинимидные эфиры. ДНК зонды с аминогруппой на 5`-конце и флуоресцентным красителем Cy3 на 3`-конце, а также анализируемые модельные фрагменты ДНК с красителем Cy5 на 3`-конце синтезировали твердофазным фосфорамидитным методом (Табл. 1). Анализируемые модельные фрагменты ДНК соответствуют участку последовательности 7 экзона гена ABO человека, который детерминирует серологический фенотип группы крови ABO.

Таблица 1.

№	Последовательность зонда 5'–3'	Последовательности модельных фрагментов ДНК 5'–3'	Дискриминационное отношение
804	NH_2-GCGACCA**C**GTGGGC-Cy3	(A) GCCCAC**G**TGGTCGCGGA-Cy5	2,1
806	NH_2-GCGACCA**T**GTGGGC-Cy3		
807	NH_2-CTGACTCC**G**CTGTTCG-Cy3	(B) CGAACAG**C**GGAGTCAGGAT-Cy5	1,9
809	NH_2-CTGACTCC**A**CTGTTCGG-Cy3		

Матрицу ячеек получали путем нанесения микрокапель растворов ДНК-зондов на активированную поверхность ПЭТ подложки иглой робота манипулятора. Регистрацию флуоресцентных сигналов проводили методом цифровой флуоресцентной микроскопии. Количество иммобилизованных зондов определяли по флуоресценции красителя Cy3. Гибридизационные сигналы определяли по флуоресценции красителя Cy5. Гибридизацию проводили при 37° C в камере, собираемой на поверхности ПЭТ подложки. Дискриминационное отношение сигналов совершенных дуплексов к сигналам несовершенных дуплексов, отличающимся на 1 нуклеотид, составило 2.1 и 1.9 (Рис. 1).



А Б

Рис. 1. Флуоресцентная картина гибридизации модельного фрагмента ДНК (А) с комплементарным зондом № 804 и некомплементарным № 806 – слева и фрагмента ДНК (В) с комплементарным зондом № 807 и некомплементарным № 809 – справа. В трех повторах, регистрация на канале Cy5

Разработанный метод ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности ПЭТ подложки может быть использован для разработки закрытой микросистемы для анализа ДНК (лаборатория на чипе).

Исследование поддержано грантом РНФ № 20–14–00287.

Секция 3. Экология, биоэнергетика и биогеотехнология

УДК 57.042

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РАСПРОСТРАНЕНИЕ ДИРОФИЛЯРИОЗА У СОБАК

[1] А.Н. Панкрушина, [2] М.А. Горшкова

[1] Тверской государственный университет, Тверь, Россия
[2] Тверской государственный медицинский университет, Тверь, Россия

Дирофилярио́з – заболевание, которое вызывается нематодами рода *Dirofilaria*. Основными хозяевами для дирофилярий чаще всего служат собаки; другие плотоядные, как правило, менее обследуются на данную инвазию. Актуальность исследуемой темы обусловлена тем, что дирофилярии – гельминты с трансмиссивным путем передачи, которые стали вызывать заболевания человека и животных в регионах умеренного климата (2013 года были известны только завозные случаи этого заболевания).

Цель работы – изучение влияния экологических факторов на распространение дирофиляриоза у собак (г. Тверь).

Экспериментальная часть работы выполнена на базе «Независимой ветеринарной лаборатории экспертного класса *VetLabTver*» (ИП Горшкова Н.О.). Методика проведения исследований включала в себя: сбор и анализ данных по случаям дирофиляриоза у собак в городе Тверь за последние пять лет; изготовление, окрашивание и изучение под микроскопом мазков крови зараженных животных, а так же статистическую обработку полученных данных.

Материалом для исследования служила стабилизированная ЭДТА К3 венозная кровь собак различных пород, поступивших с общего ветеринарного приема с клиническими признаками, характерными для кровопаразитарных заболеваний с января 2014 года по декабрь 2018 года.

Изучение условий формирования очага дирофиляриоза на территории Тверской области показало, что имеются все необходимые факторы, как в дикой природе, так и на урбанизированной территории, для его активного распространения на новые, ранее свободные от инвазии территории: наличие большого количества собак, в том числе бездомных, обилие мест выплода комаров, благоприятные температурные условия и др. Данные условия, вероятно, способствуют выявленной нами тенденции роста количества зараженных дирофиляриями собак за исследованный временной период.

Анализ многолетней динамики заболеваемости дирофиляриозом указывает на то, что максимальное количество зараженных собак приходиться на весну и осень, при этом осенний пик менее выражен по сравнению с весенним. Это говорит о том что в данные месяцы температура особо благоприятна для успешной жизнедеятельности и активности комаров-переносчиков заболевания. Но при этом осенью температура снижается, что приводит к постепенному ограничению распространения заболевания. В период низких и высоких температур, то есть зимой и летом, процент инвазированных дирофиляриями собак снижен.

На основе обработанных данных получено представление о половой и возрастной зависимости инвазирования дирофиляриями за период с начала 2014 и до конца 2018 года. За последние пять лет обнаружено суммарно 217 случаев заражения дирофиляриями. Из данного количества собак большую часть составили самцы (65 %) и оставшиеся (35 %) самки. Это предположительно говорит о том, что самцы более привлекательны для комаров переносчиков. Что касается возрастной динамики, с двух и до пяти лет наблюдается увеличение количества зараженных животных, пик достигается в возрасте пяти лет, далее идет на спад.

Таким образом, впервые проведено комплексное исследование влияния различных экологических факторов на распространение дирофиляриоза у домашних собак для определения уровня их зараженности *D. immitis* и *D. repens* в городе Твери. Полученные данные дают представление о влиянии различных экологических факторов на распространение дирофиляриоза у домашних собак в г. Тверь и могут быть использованы для прогнозирования тенденций развития данного заболевания и проведения профилактических мероприятий по снижению риска заражения, как собак, так и их владельцев, с учётом экологических факторов.

УДК 579.695; 546.85; 502.55; 661.63

ВОЗДЕЙСТВИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА БЕЛЫЙ ФОСФОР

А.З. Миндубаев[1], Э.В. Бабынин[3], Е.К. Бадеева[2], А.Д. Волошина[2], С.Т. Минзанова[2], Л.Г. Миронова[2], Й.А. Акосах[3]

[1] ООО «Инновационные технологии детоксикации», Россия
[2] Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия.
[3] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия.



Рисунок 1. Посев устойчивых грибов *Aspergillus niger*. Среда с 0.05 % белого фосфора: наблюдался рост 11 крупных спорообразующих колоний. Чашка сфотографирована через шесть суток после пересева

Белый фосфор является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Тем не менее, он применяется в промышленности и в военных целях, поэтому не исключается попадание данного вещества в окружающую среду [1].

В наших работах впервые получены культуры микроорганизмов, растущих в средах с содержанием белого фосфора до 1 % [2, 3]. Это превышение ПДК в сточных водах в 5000 раз. Впервые произведены посевы грибов в культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В данных средах микроорганизмы росли и не испытывали фосфорное голодание (рис. 1). То есть окисляли белый фосфор до фосфата, необходимого для жизнедеятельности [4, 5]. Это первый в мире пример включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 14–08–31091 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Duerksen-Hughes P., Richter P., Ingerman L., Ruoff W., Thampi S., Donkin S. Toxicological profile for white phosphorus // U.S. Department of health and human services. USA. 1997. 248 p.
2. 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.
3. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Волошина А.Д., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Бадеева Е.К. Факторы биодеградации белого фосфора // Актуальная биотехнология. 2019. № 3(30). С. 441–445.
4. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Saparmyradov K.A., Akosah Y.A., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G. The possibility of neutralizing white phosphorus using microbial cultures // News of NAS RK. Series of geology and technical sciences. 2019. Vol. 5. No.437. P.122–128.
5. Mindubaev A.Z., Kuznetsova S.V., Evtyugin V.G., Daminova A.G., Grigoryeva T.V., Romanova Y.D., Romanova V.A., Babaev V.M., Buzyurova D.N., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G. Effect of White Phosphorus on the Survival, Cellular Morphology, and Proteome of Aspergillus niger // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. Vol.56. No.2. P.194–201.

УДК 57.088.579.22

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ БИОСУРФАКТАНТОВ: СКРИНИНГ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЕГАЛОЛИПИДОВ

О.Н. Понаморева[1], Мо Лыонг[2], И.А. Нечаева[1]

[1] Тульский государственный университет», Тула, Россия
[2] Российско-Вьетнамский Тропический Центр, г. Хо Ши Мин, Вьетнам

Живые организмы способны продуцировать поверхностно-активные вещества (ПАВ), из-за их биологического происхождения такие соединения получили название биоПАВ. Самыми эффективными их продуцентами являются микроорганизмы. Эти вещества находят применение в различных отраслях промышленности благодаря преимуществам перед синтетическими ПАВ. Они обладают низкой токсичностью; биоразлагаемостью; высокой поверхностной активностью и могут быть получены биотехнологически из промышленных отходов и побочных продуктов нефтепереработки [1]. БиоПАВ разделяют на два основных класса [2]: низкомолекулярные соединения, называемые биосурфактантами (липопептиды, гликолипиды, пептиды), и высокомолекулярные полимеры (полисахариды, протеины, липополисахариды, липопротеины или комплекс этих биополимеров), которые называются биоэмульсанами [3] или биоэмульгаторами [4]. В первую группу входят молекулы, которые могут эффективно снижать поверхностное и межфазное натяжение, а ко второй относятся амфифильные и полифильные полимеры, обладающие высокой и стабильной эмульгирующей активностью в системе «масло-вода», но не высокой поверхностной активностью [5]. По своему строению биоПАВ классифицируются на гликолипиды (рамнолипиды, трегалолипиды, софоролипиды); липопептиды и липопротеины (сурфактин); жирные кислоты; фосфолипиды; полимерные сурфактанты; связанные биосурфактанты [1]. В настоящее время существуют ограниченное предложение коммерчески доступных биосурфактантов, таких как, сурфактины, софоролипиды и рамнолипиды. Трегалолипиды микроорганизмов менее изучены, но имеют значительный коммерческий потенциал [6]. Разнообразие новых биосурфактантов, в том числе трегалолипидов, и их микробных продуцентов является ключевым вопросом в преодолении экономических препятствий производства биосурфактантов с большой поверхностной / межфазной активностью, низкой критической концентрацией мицеллообразования (ККМ), высокой эмульгирующей способностью, хорошей растворимостью и стабильной активностью в экстремальных условиях (температура, pH, соленость). Помимо перечисляющих физико-химических свойств, коммерческие биосурфактанты должны быть экономически конкурентоспособными, поэтому второй целью скрининга является выделение штаммов бактерий, которые эффективно продуцируют биосурфактанты.

1. Скрининговые методы определения поверхностной и эмульгирующей активности

Биосурфактанты представляют собой структурно разнообразную группу молекул, поэтому большинство методов скрининга основано на их физико-химических свойствах (поверхностное натяжение, эмульгирующая активность, гидрофобная клеточной поверхности, содержание углеводов) [7, 8]. Основные методы скрининга микроорганизмов, продуцирующих биосурфактанты, основаны на характеристики межфазной или поверхностной активности.

Прямое измерение поверхностной / межфазной активности среды является наиболее простым методом исследования и подходит для предварительного скрининга микроорганизмов, которые способны продуцировать биосурфактанты. Этот метод дает четкое указание на способность микроорганизмов продуцировать биосурфактанты. Поверхностное натяжение снижается с увеличением концентрации биосурфактантов до достижения критической концентрации мицеллообразования (ККМ). Если концентрация биосурфактанта находится выше значения ККМ, то более высокие концентрации невозможно определить. Эта проблема может быть решена путем серийного разбавления до тех пор, пока не будет наблюдаться резкое увеличение поверхностного натяжения. Соответствующее разбавление бесклеточной среды называется *критическим мицеллярным разбавлением* (critical micelle dilution – CMD) и коррелирует с концентрацией биосурфактанта. Для скрининга применяются несколько методов, которые могут быть использованы для измерения поверхностного и межфазного натяжения жидкости. Наибольшее применение нашел простой *метод отрыва кольца* Дю Нуи (Du-Nouy Ring), основанный на измерении силы, необходимой для отсоединения кольца на границе двух жидких фаз или на поверхности раздела фаз «жидкость / воздух». Уменьшение поверхностного натяжения на границе «вода-воздух» до 40 мН/м и ниже, свидетельствует о присутствии биосурфактантов в культуральной среде [9].

Эффективными продуцентами биосурфактантов являются бактериями, которые способны снижать поверхностное натяжение среды больше чем на 20 мН/м, по сравнению с дистиллированной водой [10].

Определение эмульгирующей активности

Индекс эмульгирования. Метод, основанный на способности биосурфактантов эмульгировать две несмешивающиеся жидкости, разработан Купером и Голденбергом [9]. Для определения индекса эмульгирования к воде добавляют гидрофобный субстрат (керосин, гексадекан или др.), интенсивно встряхивают и измеряют высоту стабильного слоя эмульсии через 24 часа (индекс эмульгирования E24) рассчитывается как отношение высоты слоя эмульсии к общей высоте жидкости. биосурфактантов, но не коррелирует с их поверхностной активностью. С помощью такого простого метода легко проводить скрининг бактерий, способных продуцировать биоэмульгаторы трегалолипидной природы [11].

Гидрофобность клеточной поверхности.

В зависимости от механизма поглощения углеводородов микроорганизмы могут обладать высокой и / или низкой поверхностной гидрофобностью. Как правило, те микроорганизмы, которые способны поглощать углеводороды путем прямого контакта, демонстрируют высокую гидрофобность клеточной поверхности. Гидрофобность клеточной поверхности определяют по адгезии микроорганизмов к углеводородам или гидрофобной поверхности полистирола.

Бактериальная адгезия к углеводородам (BATH). является простым фотометрическим методом для определения гидрофобности клеточной поверхности, который основан на степени сцепления клеток с капельками жидких углеводородов [12]. После перемешивания биомассы микроорганизмов в водной среде с гидрофобным субстратом определяют изменение мутности водной среды. Снижение мутности водной фазы коррелирует с гидрофобностью клеток, которые взаимодействуют с гидрофобным субстратом и поднимаются в верхнюю фазу при расслаивании смеси.

Количественное определение реплик заключается в присоединении бактериальных штаммов к гидрофобному полистиролу, что коррелирует с гидрофобностью клеточной поверхности [26]. На плоский стерильный диск из полистирола вносят агар, содержащий колонии для исследования. Колонии, которые появились на поверхности полистирола, промывают проточной водой для удаления всех клеток, не связанных с гидрофобной поверхностью. Для визуализации прилипших колоний они фиксируются и окрашиваются. Для выделения гидрофобных штаммов реплика может быть перенесена на новую стерильную чашку с агаром [13]. Идентификация и выделение потенциальных штаммов могут быть объединены в один этап исследования.

2 Выделение, характеристика и очистка трегалолипидных биосурфактантов

Для выделения биосурфактантов из водных сред используют метод экстракции полярными органическими растворителями. Наиболее часто используют системы хлороформ–метанол [14-16]. Для выделения гликолипидных биосурфактантов используют также метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ), который менее токсичен по сравнению с хлороформом и метанолом [17]. Трегалолипиды из бесклеточной среды можно экстрагировать и другими системами полярных органических растворителей (этилацетата–метанола) [18]. Еще одним подходом для выделения биосурфактантов является кислотное осаждение, что продемонстрировано на примере рамнолипидов, сурфактина и моно- и дисукцинилтрегалолипидов [19]. Содержание гликолипидов в культуральной или бесклеточной среде можно определить косвенно через содержание сахаров с использованием антронного реагента [20]. Принцип колориметрического анализа заключается во взаимодействии антронного или нафтольного реагента с остатками сахаров с образованием окрашенного соединения. Для количественного определения также используют фенольный реагент [21]. Однако, этот метод не является специфичным, так как с этими реагентами взаимодействую любые сахара, находящиеся в культуральной среде, поэтому для специфического определения трегалолипидов следует применять методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Разделение трегалолипидов обычно проводят с использованием либо тонкослойной хроматографии (ТСХ), либо препаративной колоночной хроматографии. ТСХ – один из наиболее часто используемых методов для качественной характеристики биосурфактантов. В качестве стационарной фазы используют пластины с силикагелем. Для разделения компонентов в смеси гликолипидных биосурфактантов используют системы: хлороформ–метанол–вода (65:15:2), хлороформ–метанол–уксусная кислота–вода [22, 23] и другие полярные системы, в состав которых входит хлороформ как основной компонент, в котором хорошо растворимы гликолипиды.

ТСХ широко используется для обнаружения гликолипидов в липидном экстракте, а также для получения информации о типе биосурфактантов (гликолипиды, липопептиды, фосфолипиды и т. д.). Наиболее часто гликолипиды обнаруживают с использованием нафтольного регента в виде сине-фиолетовых полос.

Крупномасштабную очистку гликолипидов проводят с использованием колоночной хроматографии. Однако это является трудоемкой задачей, так как трегалолипиды, обычно, являются минорным компонентом в липидном экстракте. Присутствие в смеси различных структурных типов трегалолипидов, других соединений липидной природы и избытка *н*-алкана, используемого в качестве субстрата, еще усложняет процесс очистки. Для оптимизации метода очистки целевых трегалолипидов колоночной хроматографией была предложена предварительная стадия флэш-хроматографии для удаления избытка углеводородов гексаном перед колоночной хроматографией [22], что было успешно использовано при выделении трегалолипидов родоккоков, продуцируемых при пониженой температуре на гексадекане [16].

3 Определение структуры трегалолипидов

Идентификация структуры трегалолипидов может быть проведена с использованием комплекса методов, некоторые из которых основаны на изучении структуры самой молекулы, а в других необходимо разрушить молекулу на составные компоненты (углеводную часть, жирные кислоты и т. д.). Масс-спектрометрия и C^{13}-ЯМР является наилучшими методами для структурной характеристики интактных молекул. Анализ полного масс-спектра трегалолипидов позволяет определить молекулярную массу присутствующих гликолипидных биосурфактантов [23]. Для определения структуры используют метод тандемной масс-спектрометрии с различными методами ионизации: бомбардировка быстрыми атомами (FAB/MS) [24], метод электроспрея (ESI-MS) [14, 25–27] и ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы (МАЛДИ, MALDI) [28]. Наиболее часто используемый метод – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением. Однако в этом методе при изучении гликолипидов применяют режим положительной ионизации, который может осложнить интерпретацию результатов из-за наличия как протонированных ионов, так и натриевых или калиевых аддуктов. Поэтому ESI-MS в режиме отрицательных ионов может быть лучшей альтернативой, что было продемонстрировано в исследовании с использованием ВЭЖХ-МС [29].

ЯМР можно также использовать для характеристики трегалолипидов, либо после их гидролиза. ЯМР-анализ полной молекулы относительно трудно интерпретировать, поэтому анализ трегалозной части является более предпочтительным, предоставляя информацию, которая помогает охарактеризовать положение, в котором жирные кислоты присоединяются к углеводной структуре [14, 19, 25].

Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором (ГХ/МС) широко используется для характеристики остатков жирных кислот, входящих в состав трегалолипидов. После преэтерификации с метанолом липидная часть трегалолипидов превращается в метиловые эфиры жирных кислот, что обеспечивает возможности их идентификации методом ГХ или ГХ/МС. Жирнокислотный состав трегалолипидов важен для подтверждения структуры трегалолипидов [26, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для выявления способности бактерий продуцировать биосурфактанты наиболее простым в исполнении и достоверным является метод определения поверхностного натяжения на границе раздела «вода-воздух». Гликолипиды можно обнаружить качественными реакциями с фенолами. Для их выделения и очистки используют метод экстракции полярными растворителями и адсорбционную хроматографию на силикагеле. Для выделения индивидуальных компонентов используют методы высокоэффективной хроматографии. Химическую структуру гликолипидов определяют с помощью комплекса методов физико-химического анализа.

Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки России (проект FEWG-2020–008)

ЛИТЕРАТУРА

1. Desai J.D. and Banat I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol Mol Biol Rev. 1997. V. 61. № 1. P. 47–64.
2. Neu T.R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces // Microbiol Rev. 1996. V. 60. № 1. P. 151–166.
3. Ron E.Z. and Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants // Environ Microbiol. 2001. V. 3. № 4. P. 229–236.
4. Smyth T.J.P., et al. Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants in Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Timmis K.N. (ed). – Springer Berlin Heidelberg: Berlin. – 2010. P. 3687–3704.
5. Smyth T.J.P., et al.Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids in Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols / McGenity T.J. (ed.) – Springer Berlin Heidelberg: Berlin. 2014. P. 32.
6. Лыонг Т.М., et al. Бактерии-нефтедеструкторы рода Rhodococcus – потенциальные продуценты биосурфактантов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. № 1. С. 50–60.
7. Biosurfactants. Advances in experiamental medicine and biology / Sen R. (ed). – Springer Science. New York. 2010. – 361p
8. Лыонг Т.М., et al. Изучение эмульгирующих свойств бактерий-деструкторов углеводородов нефти // Актуальная биотехнология. 2014. № 3(10). С. 108–110.
9. Cooper D.G. et al. Surface-active agents from two Bacillus species // Appl Environ Microbiol. 1987. V. 53. № 2. P. 7.
10. Willumsen P.A. and Karlson U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers // Biodegradation. 1996. V. 7. № 5. P. 415–423.
11. Лыонг Т.М., et al. Влияние температуры на биодеградацию гексадекана бактериями-нефтедеструкторами Rhodococcus sp. X5 – эффективными продуцентами гликолипидных биосурфактантов // Биотехнология. 2017. Т.33. № 6. С. 49–56.
12. Rosenberg M. Bacterial adherence to polystyrene: a replica method of screening for bacterial hydrophobicity // Appl Environ Microbiol. 1981. V. 42. № 2. P. 375–377.
13. Pruthi V. and Cameotra S.S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique // Biotechnology Techniques. 1997. V. 11. № 9. P. 671–674.
14 Niescher S., et al. Identification and structural characterization of novel trehalose dinocardiomycolates from n – alkane – grown *Rhodococcus opacus* 1CP // Appl Microbiol Biotechnol. 2006. V. 70. P. 605–611.
15. Лыонг Т.М., et al. Структура и физико-химические свойства гликолипидных биосурфактантов, продуцируемых бактериями-нефтедеструкторами Rhodococcus sp. X5 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т.7. № 2. С. 72–79.
16. Luong T.M., et al.. Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium Rhodococcus erythropolis S67 at low temperature // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2018. V.34. P.20–29.
17. Kuyukina M.S., et al. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // J Microbiol Methods. 2001. V. 46. № 2. P. 149–56.
18. Marques A.M., et al.The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by Rhodococcus erythropolis 51T7 // Chem Phys Lipids. 2009. V. 158. № 2. P. 110–7.
19. Uchida Y., T.R., Chino M., Hirano J., Tabuchi T. Extracellular accumulation of mono-and di-succinoyl trehalose lipids by strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkans // Agric Biol Chem. 1989. V. 53. № 3. P. 6.
20. Hodge J.E. and Hofreiter B.T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler R.L. and Wolfrom, M.L. (ed). – Academic Press. New York. 1962. P. 380–394.
21. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determnation of sugers and related substances // Anal Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350–356.
22. Smyth T.J.P., Rudden M., Tsaousi K., Marchant R., Banat I.M. Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids in Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols / McGenity T.J. (ed.) – Springer Berlin Heidelberg: Berlin. 2014. P. 32.
23. White D.A., Hird L.C., Ali S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026 // J Appl Microbiol. – 2013. V. 115. № 3. P. 744–55.
24. Ueda S.F., Naka N., Sakaguchi T., Ozeki I., Yano Y., Kasama I., Kobayashi T. Structure-activity relationship of mycoloyl glycolipids derived from Rhodococcus sp. 4306 // Microb Pathog. 2001. V. 30. № 2. P. 91–9
25. Tuleva B., Cohen R., Stoev G., Stoineva I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanothrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain // J Appl Microbiol. 2008. V. 104. № 6. P.1703–10.
26. Rapp P. and Gabriel-Jurgens L.H. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase // Microbiology. 2003. V. 149. № 10. P. 2879–90.
27. Petrikov K., et al. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure. *Process Biochemistry*. 2013. V.48. P.931–935.
28. Kai M., et al.Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae* // FEBS Lett. 2007. V. 581. № 18. P. 3345–50.
29. Marques A.M., et al.The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 // Chem Phys Lipids. 2009. V. 158. № 2. P. 110–7.
30. Peng F., L.Z., Wang L., Shao Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants // J Appl Microbiol. 2007. V. 102. № 6. P.1603–11.

УДК 631.45

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОРМОВ ПО МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТНОМУ СОСТАВУ

Х.Х. Тагиров[1], Н.Ю. Николаева[2]

[1] Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия
[2] Томский сельскохозяйственный институт – филиал Новосибирский ГАУ, Томск, Россия

Микроэлементы содержатся в растительных и животных организмах в минимальных количествах, но играют важную роль в биохимических реакциях и физиологических процессах. Недостаток или избыток минеральных веществ в кормах приводит к нарушению нормальной жизнедеятельности организма: замедляется рост животного, снижается продуктивность, ухудшается общее состояние, возникают эндемические заболевания.

Для оценки безопасности растительных кормов в настоящее время используются нормативы показателей безопасности [3], максимально допустимые уровни (МДУ), максимально допустимые содержания (МДС) химических элементов в кормах для крупного рогатого скота [9]. Данные нормативы не имеют официального утверждения в России. Безопасность кормов оценивается в основном по концентрации тяжелых металлов (кадмий, ртуть, свинец, мышьяк), наличие других элементов не учитывается. За рубежом оценка качества травянистых кормов более разносторонняя и проводится по критериям безопасности (максимально допустимой концентрации железа, меди, цинка, марганца) и минеральной полноценности (соответствие норме содержания макро- и микроэлементов, наличие их дефицита) [21].

Перспективным направлением является применение эколого-биогеохимического подхода при оценке растительных кормов по содержанию биологически важных химических элементов [6, 7]. Основными критериями при таком подходе служат пороговые концентрации элементов в кормах.

Минеральный состав кормов колеблется в зависимости от климатических условий, типа почв, вида, генетических особенностей растений и фазы их вегетации, агрохимических мероприятий, условий уборки и хранения кормов и т. д. [9, 19].

Несмотря на то, что большинство почв сельскохозяйственных угодий и растительная продукция юга Западной Сибири не загрязнены тяжелыми металлами и являются экологически чистыми, оценка содержания макро- и микроэлементов в кормовых травах по минеральной полноценности и безопасности для животных неблагоприятная. Отмечается низкий уровень содержания в кормовых культурах кобальта, молибдена, меди, цинка, в бобовых – ниже нормы отношение между кальцием и фосфором, что может привести к их дефициту в рационе питания животных и возникновению у них разных заболеваний. Данное обстоятельство связано не с техногенным загрязнением территории, а с истощением плодородия почв [17].

В связи с этим проведение экологической оценки растительных кормов по их макро- и микроэлементному составу является очень актуальным направлением.

Цель работы – изучение макро- и микроэлементного состава и проведение экологической оценки растительных кормов, используемых в рационе крупного рогатого скота герефордской породы в условиях ООО «Березовская ферма» Первомайского района Томской области.

Были изучены образцы сенажа травяного (из разных ям), сенажа травяного из клевера и тимофеевки, сенажа из ржи, сена из тимофеевки. Зоотехнический анализ кормов проведен в ФГБУН СФНЦА РАН (р. п. Краснообск Новосибирской области).

Известно, что между микроэлементами в растениях возникает взаимодействие: то антагонистическое, то синергетическое [8]. Так, интенсивность поступления элементов в растительные корма может снижаться из-за антагонизма между Ca и K, K и Na и другими элементами. Дальнейшее взаимное влияние минеральных веществ продолжается в самом корме и в организме животного [5].

Наибольшее значение имеют кальций и фосфор [1, 2, 18], как активные участники процессов пищеварения, всасывания и усвоения питательных веществ. Нарушение фосфорно-кальциевого обмена вызывает отставание в росте и развитии, снижает продуктивность и может привести к гибели животного.

В рассматриваемых растительных кормах максимальное количество кальция и фосфора характерно для сена из тимофеевки, превышающее их содержание в других образцах в 4–5 раз (рисунок 1).

Минимальным количеством кальция характеризуется сенаж травяной, самое низкое содержание фосфора обнаружено в сенаже из ржи.

Большинство исследователей указывают на сопровождение дефицита фосфора избытком кальция, при этом нередко отмечают слишком высокий уровень калия и недостаток натрия в кормах [14].

Одним из биогеохимических критериев оценки экологического состояния территории является соотношение Ca : P в растительных кормах [13]. В рассматриваемых кормах данное соотношение считается относительно удовлетворительным и составляет 1,4–2,8. Максимальное значение характерно для сенажа из ржи, где самый низкий уровень фосфора.

Существует мнение, что бобовые культуры характеризуются большими значениями соотношения Ca : P, обусловленное максимальным накоплением кальция бобовыми растениями. Неблагоприятное отношение Ca : P в злаках объясняется не избытком фосфора в растениях, а недостатком в них кальция. Дефицит данного элемента характерен для большинства сельскохозяйственных культур [17].

Наиболее богато калием и натрием сено из тимофеевки (таблица 1). Считается, что злаковые корма богаче калием, чем бобовые [20]. Высокое содержание калия в кормовых растениях у крупного рогатого скота может привести к недостатку натрия. Идеальным соотношением K : Na в кормах считают 5 : 1, но иногда в сене это отношение колеблется между 40: 1 и 300 : 1. Есть предположение, что излишне широкое отношение K : Na неблагоприятно сказывается на воспроизводстве скота в случае, если в корме совсем отсутствует натрий. При достаточной обеспеченности натрием излишек калия в корме не причинит вреда [4]. В наших исследованиях максимальное соотношение K : Na обнаружено в сене из тимофеевки (48 : 1).

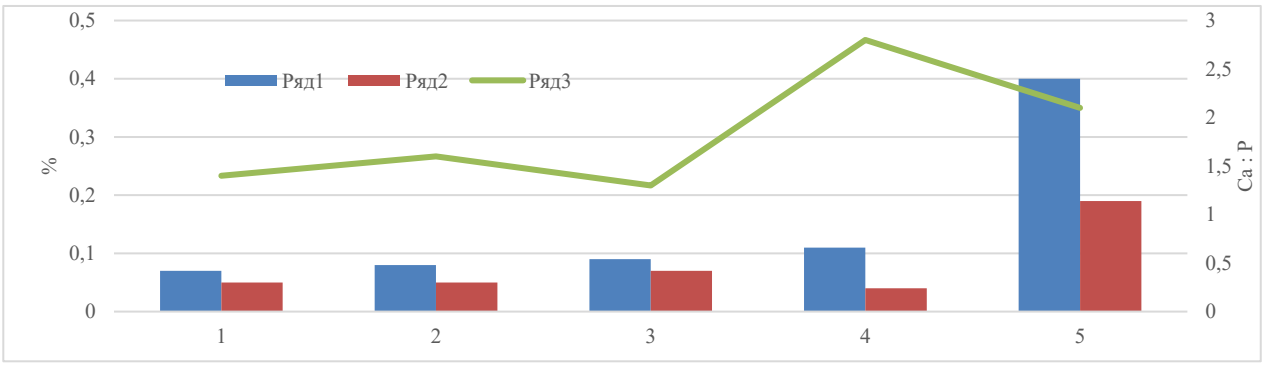


Рисунок 1 – Содержание кальция, фосфора и их соотношение в кормах

Таблица 1 – Содержание макро- и микроэлементов в кормах

Наименование кормовых средств	K	Na	Fe	Mn	Cu	Zn
	г/кг		мг/кг			
Сенаж травяной (клевер + тимофеевка)	5,55	0,11	97,9	10,9	1,2	7,3
Сенаж травяной 1	2,30	0,10	122,4	7,7	1,4	3,6
Сенаж травяной 2	4,27	0,13	91,1	16,2	1,6	7,3
Сенаж из ржи	5,02	0,10	96,0	7,8	2	6,6
Сено (тимофеевка)	11,08	0,23	360,1	35,1	3,2	15,2
Параметры сравнения						
Уровень содержания микроэлементов в укосах растений и растительных кормах, мг/кг [13]:						
бедствие	–	–	<20или>500	–	<3или>100	<10или>500
чрезвычайная ситуация	–	–	<50или>200	–	<5или>80	<30или>100
относительно удовлетворительная ситуация	–	–	50–100	–	10–20	30–60
Пороговые концентрации элементов для с/х животных, мг/кг [11]:						
недостаток (нижняя пороговая концентрация)	–	–	<25	<20	<3–5	<20–30
норма (пределы)	–	–	≥24–30	≥20–60	≥3–12	≥20–60
избыток (верхняя пороговая концентрация)	–	–	–	60–70	20–40	60–100

Оценивая уровень содержания микроэлементов в кормах, было установлено относительно удовлетворительное состояние всех видов сенажа по содержанию железа, но бедственное состояние по наличию меди и цинка. Сено из тимофеевки характеризуется чрезвычайным уровнем железа и цинка. По сравнению с пороговыми концентрациями элементов для сельскохозяйственных животных выявлено, что все кормовые средства содержат недостаточное количество меди и цинка, сенаж травяной и ржаной также бедны марганцем. Концентрация железа во всех исследуемых образцах выше нормы.

Полученные результаты во многом подтверждают литературные данные. Для растительной продукции, выращенной на почвах сельскохозяйственных угодий юга Западной Сибири, характерно повышенное содержание железа и марганца, но пониженное количество цинка, меди, кобальта, йода, обусловленные, вероятно, изменением состава и свойств почвы в связи с агрогенным усилением кислотности, снижением насыщенности основаниями и концентрации доступных для растений форм микроэлементов из-за малого применения удобрений и мелиорантов [17]. При оценке микроэлементного состава сена и сенажа разных областей Западной Сибири отмечается пониженное содержание меди в злаковом сене и сенаже Томской, Тюменской, Алтайского края, южной лесостепи Новосибирской и Омской областей по сравнению с сеном из бобовых культур [16].

Дефицит меди также выявлен в сельскохозяйственных растениях, возделываемых на торфяных почвах в Ленинградской, Новгородской, Московской и других областях [12]. Отмечается, что наиболее подвержены медному голоданию злаковые культуры, особенно острый недостаток меди сказывается на растениях при экстремально высоком количестве железа и марганца в пересушенных почвах.

Большинство кормов пастбищных и сенокосных угодий таежной зоны юга Западной Сибири содержат мало меди, много марганца, но достаточное количество цинка и других элементов [15]. Однако имеются данные о значительном накоплении меди в сенаже [10].

Таким образом, изучение макро- и микроэлементного состава растительных кормов позволяет провести более полноценную их экологическую оценку и выявить возможный дисбаланс в химическом составе для предотвращения негативного влияния на организм сельскохозяйственных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабичева И.А. и др. Рациональные технологии производства говядины с использованием белково-витаминной добавки при откорме молодняка крупного рогатого скота // Состояние и пути развития производства и переработки продукции животноводства, охотничьего и рыбного хозяйства: Мат. межд. н.-п. конф., 2018. – С. 8–15.
2. Бабичева И.А. и др. Эффективность производства говядины при использовании кормовой белковой добавки // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. 2018. – № 3 (52). – С. 39–46.
3. Ветеринарные правила и нормы по безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства кормов ВетПиН 13–5–01/010 (Проект). – М., 2003. – 28 с.
4. Визнер Э. Кормление и плодовитость сельскохозяйственных животных / Пер. с нем. и предисл. О.Н. Преображенского. – М.: Колос, 1976. – 160 с.
5. Георгиевский В.И. и др. Минеральное питание животных – М.: Колос, 1979. 471 с.
6. Ермаков В.В. Геохимическая экология и биогеохимические критерии оценки экологического состояния таксонов биосферы / В.В. Ермаков // Геохимия. – 2015. – № 3. – С. 203–221.
7. Ермаков В.В. Геохимическая экология животных / В.В. Ермаков, С.Ф. Тютиков. – М.: Наука, 2008. – 315 с.
8. Кабата-Пендиас А. Микроэлементы в почвах и растениях – М. : Мир, 1989. – 439 с.
9. Кальницкий Б.Д. Минеральные вещества в кормлении животных / Б.Д. Кальницкий. – Л.: Агропромиздат, 1985. 207 с.
10. Карнаухов Ю.А. и др. Тяжелые металлы в системе «почва-корма-говядина» при откорме молодняка крупного рогатого скота // Вестник мясного скотоводства. – 2010. – Т. 1. – № 63. – С. 133–137.
11. Ковальский В.В. Проблемы биогеохимии микроэлементов и геохимической экологии – М.: Россельхозакадемия, 2009 357 с.
12. Косолапова В.Г. и др. Проблемы минерального питания животных в биогеохимических зонах России // Многофункциональное адаптивное кормопроизводство: Сборник научных трудов. Вып. 9 (57). М.:, 2016. – С. 102–110.
13. Критерии оценки экологической обстановки территорий для выявления зон чрезвычайной экологической ситуации и зон экологического бедствия – М.: Мин-во охраны окружающей среды и природных ресурсов РФ. РД ГНТУ, 1992. 58 с.
14. Лушников Н.А. Минеральные вещества и природные добавки в питании животных / Н.А. Лушников. – Курган: КГСХА, 2003. – 192 с.
15. Скуковский Б.А. Экологические аспекты минерального состава кормов и продуктов животноводства Западной Сибири: учеб. пособие / Б.А. Скуковский, А.Г. Незавитин, Н.Б. Захаров, В.С. Токарев, Л.И. Лисунова. – Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Изд. 2 е, перераб. и доп. – Новосибирск, 2007. – 82 с.
16. Сысо А.И. Оценка макро- и микроэлементного состава почв и растений на сельхозугодиях Западной Сибири // Прогноз состояния и научное обеспечение плодородия почв земель сельскохозяйственного назначения: Материалы XI Международного симпозиума НП «Содружество ученых агрохимиков и агроэкологов». – 2017. – С. 88–98.
17. Сысо А.И. Российские нормативы оценки качества почв и кормов: проблемы их использования // Экологический мониторинг окружающей среды: материалы международной школы молодых ученых. – Новосибирск: Издат. Центр НГАУ «Золотой колос», 2016. – С. 153–168.
18. Титов М.Г. Качественный состав кормов ООО агрофирмы "Нур" Республики Башкортостан / М.Г. Титов, Е.А. Ажмулдинов // Вестник мясного скотоводства. – 2014. – № 2 (85). – С. 75–80.
19. Фисинин В. Природные минералы в кормлении животных и птицы / В. Фисинин, П. Сурай // Животноводство России. – 2008. – № 8. – С. 66–68.
20. Хенниг А. Минеральные вещества, витамины, биостимуляторы в кормлении сельскохозяйственных животных / Под ред. А.Л. Падучевой, Ю.И. Раецкой. – М.: Колос, 1976. – 557 с.
21. Aditi Soni, Kajan Kumar, Ravi Mathur. Mineral status of some common vegetation available in Jodhpur district of Rajasthan // International journal of plant, animal and environmental sciences. – 2014. – V. 4. – P. 359–365.

УДК 579.69; 631.427.4

ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИИ ЦИНКА МЕТАЛЛРЕЗИСТЕНТНЫМИ ШТАММАМИ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

П.Д. Погонышев, П.П. Якупов, В.В. Зинченко, А.В. Горовцов, Т.М. Минкина

Южный Федеральный Университет, Академия биологии и биотехнологии, Ростов-на-Дону, Россия

Объекты экологического бедствия вызывают интерес у исследователей, так как в условиях экстремального загрязнения возникает возможность изучения влияния поллютантов на компоненты экосистемы и разработки методов ремедиации. Одним из таких объектов является высохшее озеро Атаманское в Каменском районе Ростовской области. На донных отложениях данного озера сформировались почвы, в которых наблюдается чрезвычайно высокий уровень содержания цинка. Цинк, как и другие тяжелые металлы, способен к миграции по почвенному профилю и дальнейшей аккумуляции в живых организмах, что пагубно влияет на растения и может создавать угрозу для здоровья человека. За несколько десятилетий, прошедших с момента загрязнения, микробные сообщества техногенно-загрязненных почв изменились, и к условиям существования при высокой концентрации тяжелых металлов адаптировались некоторые виды бактерий. Данные металлрезистентные бактерии могут рассматриваться как потенциальные агенты ремедиации почв. Они могут снижать концентрацию подвижных форм тяжелых металлов за счет адсорбции на поверхности клеток и химических реакций осаждения – преципитации карбонатов при участии гидролитических ферментов.

Цель работы – исследование сорбции цинка металлрезистентными штаммами бактерий рода *Bacillus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы был проведен опыт по определению сорбции цинка из водного раствора. Биомасса бактерий штаммов: *B. pumilus*-TR-3.2, *B. atrophaeus*-TR-3.3, *B. cereus* – TR-20.1 была помещена в растворы цинка, $C(Zn^{2}+)$ = 0.0665 мг/м, на 1 и 17 часов. Далее биомасса отделялась центрифугированием при 10000 g в течение 5 мин, в супернатанте определялась остаточная концентрация цинка методом фотоколориметрии с использованием металлоиндикатора ксиленолового оранжевого. Условия опыта: pH раствора 6,0–6.5, состав общей смеси: 100 мг биомассы и 1 мл раствора цинка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных фотоколориметрии показал, что штаммы сорбировали за 1 час: *Bacillus pumilus* TR-3.2 82,0 %, *B. atrophaeus* TR-3.3–65,4 %, *B. cereus* TR-20.1–62,4 %; за 17 часов: *B. pumilus* TR-3.2 100,0 %, *B. atrophaeus* TR-3.3 91,35 %, *B. cereus* TR-20.1 83,80 %. Таким образом наиболее эффективным оказался штамм TR-3.2 (*B. pumilus*), а выдерживание в течение 17 часов приводит к значительно более эффективному удалению ионов цинка из раствора. Однако сорбция не происходит пропорционально времени, так как за 1 час бактерии поглощают из раствора большую часть металла. Более высокие показатели сорбции *B. pumilus*, вероятно, объясняются более удачным пространственным и молекулярным устройством клеточной стенки, а именно расположением и длиной тейхоевых кислот, которые у этого вида могут составлять до 50 % массы клеточной стенки. Фосфатные группы тейхоевых кислот активно присоединяют ионы металлов и в целом влияют на величину отрицательного заряда поверхности стенки, а значит определяют сорбционную способность клетки.

Основываясь на результатах опыта, можно сделать вывод, что металлрезистентные бактерии являются перспективными агентом ремедиации почв в борьбе с тяжелыми металлами. Они способны практически полностью инактивировать подвижные формы металлов в ходе адсорбции на клеточных стенках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19–29–05265 мк

УДК 577

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ АМАРАНТА – АККУМУЛЯТОРЫ КАДМИЯ

З.Р. Вершинина, Л.Р. Хакимова, О.В. Чубукова

Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, Россия

На сегодняшний день чрезвычайно актуален поиск методов и подходов для избавления окружающей среды от экополлютантов. Фиторемедиация представляет собой устранение, обезвреживание или перевод в менее токсичную форму экополлютантов с помощью растений. Данный метод достаточно часто применяют в случаях загрязнения почв тяжелыми металлами (ТМ), используя растения-гипераккумуляторы тяжелых металлов для восстановления биологической продуктивности экосистем [1]. Факторами, которые в наибольшей степени ограничивают эффективность фиторемедиации, являются недостаточное накопление биомассы растениями и низкая доступность тяжелых металлов из почв. Эти проблемы можно решить с помощью бактерий, которые принимают непосредственное участие в биогеохимическом цикле тяжелых металлов и могут в значительной степени увеличить их доступность для растений [2]. При этом если данные бактерии будут обладать ростостимулирующими свойствами, это может повысить устойчивость растений к стрессам, вызванными тяжелыми металлами, и будет способствовать накоплению биомассы.

Известно, что при воздействии тяжелых металлов на растения начинают синтезироваться особые небольшого размера пептиды, которые выполняют строго определенные функции, связывая ионы металлов и транспортируя их к месту назначения. Одними из таких металлсвязывающих пептидов являются фитохелатины. Первичная структура фитохелатинов представляет собой небольшой, богатый цистеином пептид, способный связывать ионы тяжелых металлов через SH-группы. Кроме того фитохелатины характеризуются наличием γ-пептидной связи, что усложняет их биосинтез в клетках. Ранее уже проводились эксперименты с химически синтезированными генами, кодирующими аналоги природных фитохелатинов с α-пептидной связью (псевдофитохелатины), что позволяло им синтезироваться с участием рибосомного аппарата клетки. Детальные эксперименты показали, что эти пептиды связывают различные металлы так же, как и природные фитохелатины и нарабатываются в клетках в большем количестве [3]. В рамках данного исследования геном псевдофитохелатина *pph6* с формулой Мет (α-Глу-Цис) 6Гли были трансформированы растения амаранта, а также штаммы клубеньковых бактерий (ризобий), обладающие ростостимулирующей активностью: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* THy1, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* THy2. Кроме того в экспериментах были использованы ранее полученные растения амаранта и ризобии, трансформированные геном бактериального агглютинина *rapA1* [4–6].

Цель работы – оценка эффективности применения трансформированных генами pph6 и rapA1 растений амаранта в фиторемедиации почв, загрязненных кадмием, в том числе в рамках ассоциативного симбиоза с ризобиями, вырабатывающими псевдофитохелатин или адгезин RapA1, повышающий устойчивость симбиотических систем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты по воздействию кадмия и ризобий проводились на растениях, достигших 6-недельного возраста. Корни проростков выдерживались в течение 1 ч в суспензии ризобий (10^5 КОЕ/мл в среде YM). Часть проростков оставляли необработанными в качестве контроля. После инокуляции растения растения переносили в емкости с 1 л почвы с добавлением $CdCl_2$ согласно схеме опыта. Концентрации вносимого в почву Cd^{2}+ составили 0 (контроль), 5, 10 и 20 мг/кг; продолжительность эксперимента – 30 суток. По окончании экспериментов растения были разделены на 2 части – корни и побеги. Корни отмывали в 0,1 мМ растворе $CaCl_2$ и в дистиллированной воде для удаления кадмия, адсорбированного на их поверхности. Далее растительный материал фиксировали при 105 °С в течение 1 часа, высушивали при 70 °С в течение 24 часов до абсолютно сухого веса и взвешивали. Для определения содержания кадмия в растениях подготовка проб для анализа проводилась методом сухого озоления: 200 мг сухого материала измельчали в фарфоровой ступке и сжигали при 500 °С в муфельной печи в течение 4 часов. Определение содержания кадмия проводилось методом инверсионной полярографии с использованием вольтамперометрического анализатора «Экотест-ВА» с программируемым роботизированным автосамплером АС-01/3Д и углеродным электродом «три в одном» (НПП «Эконикс-Эксперт», Россия) согласно инструкции по использованию прибора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инокуляция ризобиями положительно влияла на накопление сухой биомассы в экспериментах без добавления кадмия. Обработка $Cd^{2}+$ снижала биомассу растений, но инокуляция ризобиями позволяла в разной мере преодолевать токсическое действие этого тяжелого металла. Наилучшие результаты были получены для бактерий, трансформированных геном *rapA1*, который положительно влияет на колонизацию бактериями корней растений (рис. 1).

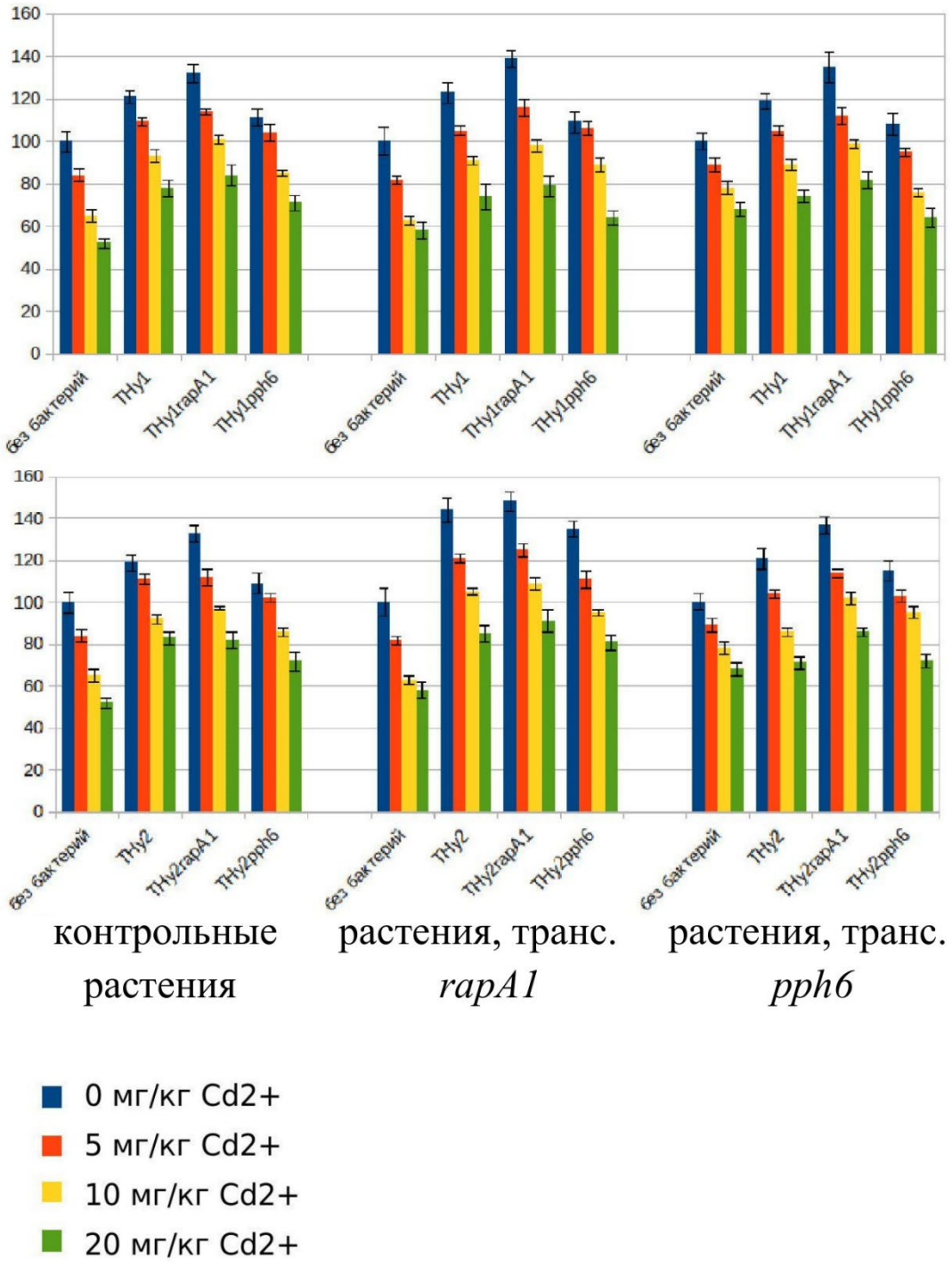


Рис. 1. Сухая биомасса растений амаранта в зависимости от концентрации кадмия и выбранного микросимбионта (по оси ординат – биомасса растений амаранта в %)

Штаммы, трансформированные *pph6*, увеличивали содержание кадмия в корнях растений, но при этом накопление в побеге уменьшалось до 50 %. Растения, трансформированные *pph6*, накапливали больше кадмия в побегах, однако совместное использование и растений и бактерий, трансформированных *pph6*, нивелировало данный положительный эффект (рис. 2).

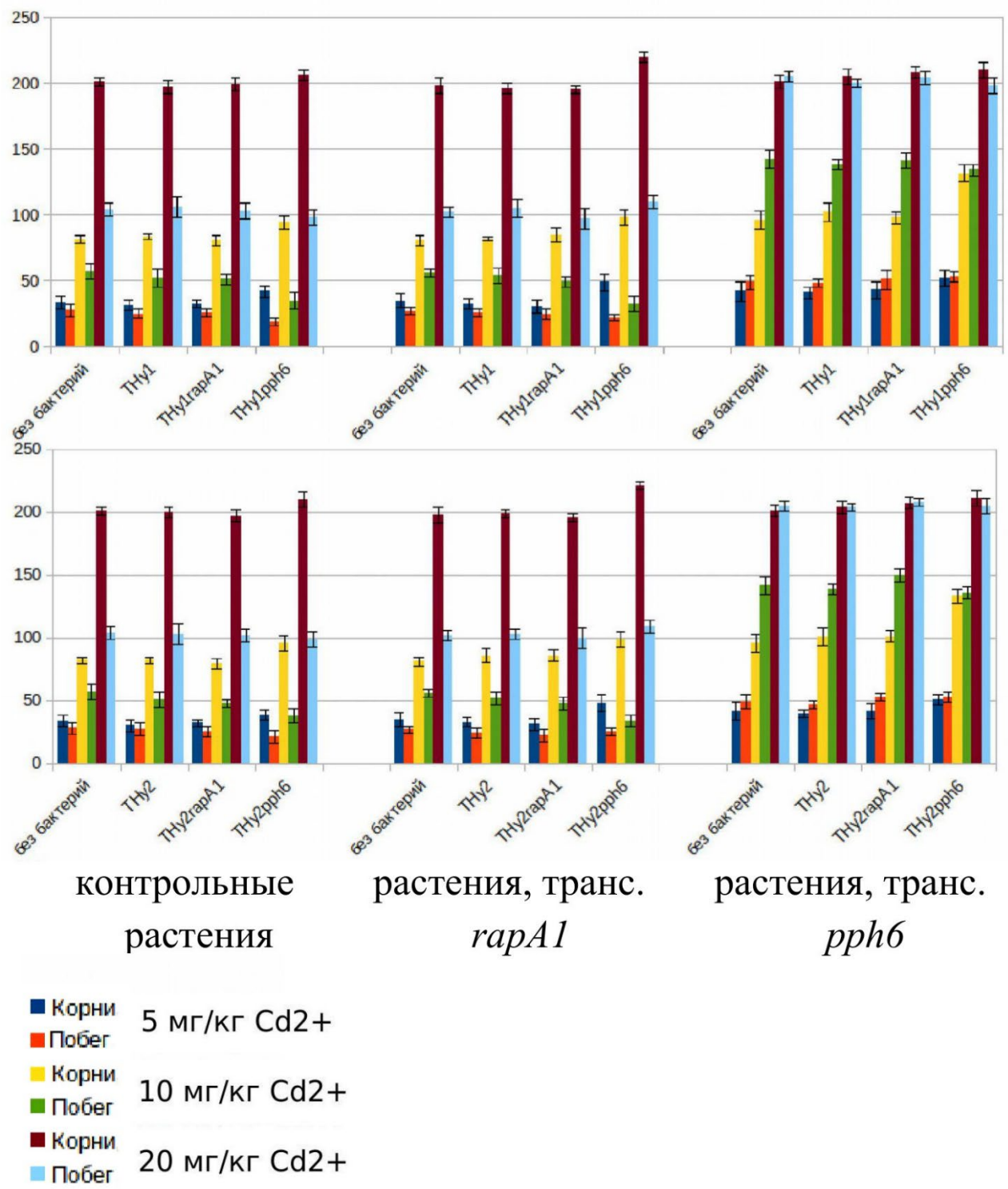


Рис. 2. Анализ содержания кадмия в растениях амаранта методом инверсионной полярографии (по оси ординат – содержание кадмия, мг/кг сухой массы растений амаранта)

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что для фиторемедиации почвы целесообразно использовать растения, трансформированные *pph6*, совместно с бактериями, трансформированными *rapA1*. Использование бактерий, трансформированных *pph6*, применимо в тех случаях, когда необходимо накопление тяжелых металлов в корнях или в когда требуется уменьшить содержание тяжелых металлов в надземной части растений.

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16–116020350028–4) при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 18–34–00033 мол_а, № 18–34–20004 мол_а_вед.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li C., Ji X., Luo X. Phytoremediation of Heavy Metal Pollution: A Bibliometric and Scientometric Analysis from 1989 to 2018 // International Journal of Environmental Research and Public Health. 2019. V. 16(23). P. 4755. doi:10.3390/ijerph16234755
2. Manoj S.R., Karthik C., Kadirvelu K., Arulselvi P.I., Shanmugasundaram T., Bruno B., Rajkumar M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. Journal of environmental management. 2020. V. 254. P. 109779. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109779
3. Постригань Б.Н., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Яхин О.И., Чемерис А.В. Клонирование и активность синтетического псевдофитохелатинового гена в модельных растениях табака // Физиология растений. Т. 59 (2). 2012. С. 303–308.
4. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Федяев В.В., Баймиев А.Х., Баймиев А.Х. Взаимодействие томатов (*Solanum lycopersicum* L.), трансформированных *rapAl*, с бактериями *Pseudomonas* sp. 102, устойчивыми к высоким концентрациям кадмия, как основа эффективной симбиотической системы для фиторемедиации // Биотехнология. 2019. Т. 35 (2). С. 38–48. doi: 10.21519/0234–2758–2019–35–2–38–48
5. Вершинина З.Р., Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Каримова Л.Р., Сербаева Э.Р., Сафронова В.И., Шапошников А.И., Баймиев Ан. Х., Баймиев Ал. Х. Влияние конститутивной экспрессии гена *rapA1* на образование бактериальных биопленок и ростостимулирующую активность ризобий // Микробиология. 2019. № 1 (88). С. 62–71. doi: 10.1134/S0026365619010105
6. Vershinina Z., Khakimova L., Lavina A., Baymiev A. *Raphanus sativus* and *Amarantus sanguineus* transgenic plants transformed with *psl* gene // FEBS OPEN BIO. 2019. V. 9. P. 282–283. doi:10.1002/2211–5463.12675

УДК 631.45, 504.054

АНАЛИЗ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЗОН РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ С ПОМОЩЬЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕСТОВ

Т.Н. Ажогина

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия

Методы оценки загрязнения окружающей среды, применяемые в настоящий момент, весьма разнообразны. Классическим методом оценки токсичности почв является химический анализ (Сазыкина и др., 2019 a). Одним из наиболее перспективных методов, используемых при проведении мониторинга окружающей среды, является анализ с использованием цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров, в которых в качестве репортеров используются гены бактериальных люцифераз (Сазыкина и др., 2019 b).

Цель работы – оценка токсичности проб почв промышленных зон Ростовской области.

Для исследования были отобраны 22 пробы на территории г. Ростова-на-Дону и Ростовской области.

Для оценки токсичности почв была использована батарея lux-биосенсоров: *E.coli* MG1655 (pRecA-lux), *E.coli* MG1655 (pKatG-lux), *E.coli* MG1655 (pSoxS-lux). Штаммы бактериальных lux-биосенсоров любезно предоставлены И.В. Мануховым (ФГУП «ГосНИИГенетика»).

Мерой токсичности служил фактор индукции (I), рассчитываемый как отношение биолюминесценции опытной пробы к биолюминесценции контрольной пробы. При достоверном отличии опыта от контроля $I<2$, обнаруженный токсический эффект оценивали как «слабый». При $2\leq I\leq 10$ – как «средний». При $I>10$ – как «сильный».

ДНК-тропные вещества были обнаружены в 10 пробах с использованием биосенсора *E.coli* pRecA-lux. Максимальный фактор индукции был зарегистрирован в пробе, отобранной в 15 км к юго-западу от Ростовской АЭС, и составил 4,13±0,86. Наличие веществ, вызывающих появление в клетке супероксид-анион радикала с помощью биосенсора *E.coli* pSoxS-lux было определено в 9 из 22 исследованных проб, при этом, максимальный фактор индукции составил 3,59±0,16 в пробе, отобранной у НПО «НИИ ПАВ» г. Волгодонск. Ответ на окислительный стресс, вызываемый появлением в среде перекиси водорода (*E.coli* pKatG-lux), был обнаружен только в 1 пробе, отобранной около АО «Энергопром – Новочерскасский электродный завод» (фактор индукции составил 2,00±0,10). В данной пробе были обнаружены вещества, вызывающие окислительный стресс из-за появления в среде и перекиси водорода, и супероксид-анион радикала.

В 10 пробах (45 %) токсические вещества обнаружены не были. В 8 пробах (36 %) были обнаружены генотоксичные вещества, а также вещества, вызывающие окислительный стресс.

Таким образом, при изучении 22 проб почв было установлено наличие веществ, вызывающих окислительный стресс, а также генотоксикантов. Наиболее загрязненной пробой оказалась проба почвы, отобранная в 15 км к юго-западу от АЭС.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19–34–90107).

ЛИТЕРАТУРА

(a) Сазыкина М.А., Карчава Ш.К., Журавлева М.В., Кудеевская Е.М., Хаммами М.И., Сазыкин И.С. Мониторинг загрязнения экосистем ростовской области методом биотестирования // Трансформация экосистем под воздействием природных и антропогенных факторов: Материалы международной научной конференции. (г. Киров, 16–18 апреля 2019 г.). – Киров: ВятГУ, 2019. – С. 267.

(b) Сазыкина М.А., Сазыкин И.С., Кудеевская Е.М., Журавлева М.В., Карчава Ш.К., Хаммами М.И. Применение батареи бактериальных цельноклеточных lux-биосенсоров в экотоксикологическом анализе //VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы. – 2019. – С. 497.

УДК 541.49

МОДИФИКАЦИЯ ИОНООБМЕННЫХ ВОЛОКОН ДЛЯ СОРБЦИИ АММИАКА

А.В. Астапов, *Ю.С. Перегудов, *О.И. Долматова, П.А. Поздняков

Военно-воздушная академия им. профессора Н.Е. Жуковского и Ю.А. Гагарина, Воронеж, Россия
**Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

Аммиак в больших количествах используется в химической промышленности при производстве минеральных удобрений и азотной кислоты. При этом возможны утечки газа, что является опасным как для персонала, работающего на предприятии, так и для населения близлежащих районов, поэтому проблемы улавливания аммиака в вентиляционных выбросах, а также защиты органов дыхания во время техногенных аварий являются очень актуальными.

Снижение концентрации аммиака в воздухе может быть достигнуто путем фильтрации через слой ионообменного материала. Ионная форма сорбента во многих случаях является определяющей для удаления загрязнителя. В настоящее время для сорбции оснований Льюиса (аммиака, аминов, пиридина) часто применяют протонированную форму слабокислотных катионитов. В данной работе предлагается модификация ионообменников ионами металлов, образующих с аммиаком координационные соединения.

Для исследования были выбраны гранульные иониты марок АНКБ-35, КБ-2э и ионообменные волокна марок ФИБАН Х-1 и ВИОН КН-1. Данные ионообменники содержат в своем составе карбоксильные (КБ-2э и ВИОН КН-1) и иминодиуксусные (АНКБ-35 и ФИБАН Х-1) функциональные группы.

На первом этапе работы была изучена сорбция на выбранных ионообменниках ионов Cu^2+ и Ni^2+, так как они обладают высокой способностью образовывать аммиачные комплексы. Установлено, что предельная емкость ионитов по указанным ионам уменьшается в ряду:

КБ-2э > АНКБ-35 > ВИОН КН-1 > ФИБАН Х-1.

Предельные емкости для волокнистых сорбентов имеют более низкие значения, чем для гранулированных аналогов, и достигаются при более низких концентрациях ионов Cu^2+ и Ni^2+.

Преимущество волокнистых материалов перед гранульными заключается в высокой скорости сорбционных процессов и более эффективной регенерации. Более высокая скорость достигается за счет короткого диффузионного пути поглощаемого иона внутрь ионообменного волокна. Благодаря высокой скорости работы волокнистые иониты могут применяться в виде тонких фильтрующих слоев при высоких скоростях потока раствора или газа.

На втором этапе работы, в программном модуле HyperChem, были проведены квантово-химические расчеты комплексов, которые предположительно образуются в фазе ионитов.

Расчеты показали, что сорбция на АНКБ-35 и ФИБАН Х-1 ионов Cu^2+ и Ni^2+ протекает с участием одной иминодиуксусной группы ионита. Взаимодействие с двумя функциональнами группами расположенными рядом на одной цепи невозможно из-за стерических затруднений. Вероятность взаимодействия с группами на различных полимерных цепях незначительна, поэтому такие структуры в дальнейших расчетах не рассматривались. На ионитах КБ-2э и ВИОН КН-1 взаимодействие сопровождается образованием однотипных комплексов с двумя рядом расположенными карбоксильными группами.

В присутствии аммиака на иминодиуксусных функциональных группах, насыщенных ионами меди, образуются комплексы с участием от 1 до 4 молекул аммиака. Для групп насыщенных ионами никеля – от 1 до 3 молекул аммиака. На карбоксильных ионообменниках, содержащих как медь, так и никель, образуются комплексы в которых содержится от 1 до 3 молекул аммиака.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно предположить, что для сорбции аммиака более подходящими будут волокнистые ионообменные материалы. Насыщение сорбентов ионами Cu^2+ и Ni^2+, предположительно увеличит их емкость по аммиаку в 1,5–2 раза.

УДК 631.453

ВЛИЯНИЕ БИОЧАРА НА ФРАКЦИОННО-ГРУППОВОЙ СОСТАВ МЕДИ В ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВАХ

Т.В. Бауэр[1], Т.М. Минкина[2], С.С. Манджиева[2] А.Г. Федоренко[1,2]

[1] Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону, Россия
Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

В настоящее время серьёзную опасность для окружающей среды представляет загрязнение тяжелыми металлами (ТМ). Металлы не подвержены биодеградации с течением времени, за счёт чего они способны накапливаться в объектах окружающей среды и нести опасность для разных трофических звеньев [1]. Загрязнение ТМ приводит к ухудшению качества почвы и потере почвенных функций [2, 3], что представляет опасность для здоровья человека [4, 5]. Поэтому ремедиация почв, загрязненных ТМ, стала важной и широко изучаемой проблемой во всем мире [6–8].

В последнее время разрабатываются и испытываются различные способы очистки почв от ТМ и приемы предотвращения их миграции в сопредельные среды. В частности, для иммобилизации ТМ в почве широко используются углеродистые сорбенты (например, активированный уголь и биочар), к которым относятся продукты термической обработки материалов растительного и животного происхождения, а также некоторые промышленные отходы. Благодаря большой площади удельной поверхности и высокой пористости, их внесение в почву снижает биодоступность загрязняющих веществ [9, 10], а также токсичность и биоаккумуляцию живыми организмами [11]. В последнее время все более популярным становится использование биочара (биоугля), который обладает близкими с активированным углем сорбционными свойствами, но значительно дешевле [12, 13]. Биочар – твердый высокоуглеродистый материал, полученный путем термического разложения биомассы в условиях полного или частичного отсутствия кислорода [14]. Он обладает техническими преимуществами, такими как широкие источники сырья, низкая стоимость, экологическая безопасность и широкомасштабное внедрение. Биочар признан «зеленым» экономически эффективным мелиорантом для восстановления окружающей среды [15], для стабилизации ТМ в почвах и для снижения их накопления растениями [16, 17]. Помимо иммобилизации поллютантов его внесение оказывает положительное влияние на химические свойства почвы, такие как изменения pH, емкости катионного обмена, содержании элементов питания [18], что является важным преимуществом такого типа ремедиации [19].

Цель работы – изучить эффективность внесения биочара на иммобилизацию меди в почве, подверженной загрязнению, с использованием комбинированной схемы фракционирования.

Исследования были проведены в условиях модельного опыта на луговой тяжелосуглинистой почве (слой 0–20 см), отобранной в пойме реки Северский Донец (Каменск-Шахтинский район Ростовской области). Исследуемая почва характеризуется следующими физическими и химическими свойствами: Сорг – 4.3 %; pH – 7.5; обменные катионы (Ca^2++Mg^2+) – 38.1 cM(+)/кг; $CaCO_3$–0.6 %; содержание физической глины – 55.8 %, ила – 32.0 %, Cu – 43.7 мг/кг. К почве был добавлен углеродистый сорбент в дозе $2{,}5_{масс}$ %, что в пересчете на 20-см-ый пахотный слой почвы соответствует примерно 500 кг/100 м^2 или 50 т/га.

В качестве загрязняющего вещества использовали Cu в дозе 10 (1320 мг/кг) ОДК [20] из расчета на чистый элемент. Перед закладкой опыта образцы почвы были высушены, измельчены до размера частиц менее 1 мм, корни растений и крупные включения удалены. Навески почвы массой по 1000 г. помещали в сосуды объемом 2 л. Затем вносили оксид Cu в сухом виде и тщательно перемешивали стеклянной палочкой. После 6 месяцев инкубации почвы с металлом в сосуды вносили биочар в дозе 1 % и 2,5 %, что в пересчете на 20-см-ый пахотный слой почвы соответствует примерно 200 кг/100 м^2 и 500 кг/100 м^2 или 20 т/га и 50 т/га. После внесения сорбента модельный эксперимент длился месяц, после чего сухую почву снова измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 1 мм для дальнейших анализов. Опыт заложен в 3-х кратной повторности при естественном освещении. На протяжении всего эксперимента в сосудах поддерживалась оптимальная влажность – 60 % от полной влагоемкости.

В качестве сорбента использовался биочар, произведенный пиролизом берёзовой древесины на ретортных установках, ГОСТ 7657–84 [21] марка А, сорт 1 (температура пиролиза 550 °С, фракции биоугля 3–5 мм). Измерения площади удельной поверхности и пористости, выполненные на волюметрическом анализаторе «ASAP 2020» по методу низкотемпературной адсорбции азота, показали следующие величины: удельная площадь поверхности – 540 м^2/г; общий объем пор: – 0,81 см^3/г; объем микропор (<2нм) – 0,63 см^3/г, мезопор (2–500нм) – 0,04 см^3/г, макропор (>500нм) – 0,14 см^3/г.

Площадь поверхности биочара, помимо методов низкотемпературной адсорбции–десорбции азота, была исследована при помощи методов лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (3D-сканирующий лазерный микроскоп (Keyence VK-9700) с длинной волны фиолетового лазера 408 нм, что позволяет различать детали в трех плоскостях с разрешением до 200–300 нм. При помощи данного метода были построены 3d модели микрорельефа образца биочара (рис. 1). Учитывая, что размер макропор составляет 500 нм и более, можно сопоставить величины площади поверхности, измеренные оптическим и сорбционным способами. Измерение площади поверхности проводилось путем вычисления среднего значения площади одинаковых участков образца размером 10х10 мкм (красный квадрат), размещенных в пределах исследуемой области случайным образом. Образец измерялся в 10-ти кратной повторности. Установлено, что образец биочара имеет достаточно большую площадь интегральной поверхности -797,439±81 μm^2.

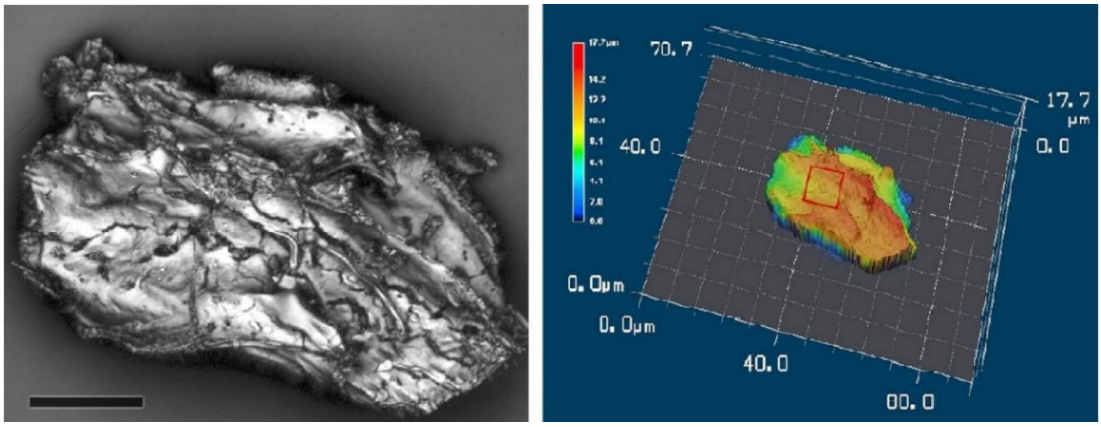


Рис. 1. Изображение биочара и его трехмерная модель микрорельефа полученные при помощи 3D-сканирующего лазерного конфокального микроскопа. Масштабный отрезок – 10 μm.

Для изучения механизмов иммобилизации Cu в луговой почве при внесении углеродистого сорбента использована комбинированная схема фракционирования [22], которая позволяет более полно по сравнению с другими методами последовательных селективных экстракций определять состав непрочно связанных (НС) и прочно связанных (ПС) соединений ТМ и дает возможность проследить за изменением прочности связи металла с основными почвенными компонентами. Данная схема основана на сочетании результатов, полученных по методу Тессье [23] и параллельных экстракций [24]. Содержание металла в составе фракций, входящих в группы НС и ПС соединений, найдено аналитическим методом и расчетным путем (рис. 2).

На основе комбинированной схемы фракционирования изучена эффективность применения биочара в целях ремедиации загрязненных почв. Анализ изменения фракционно-группового состава соединений Cu в почве в условиях ремедиации позволяет глубже проанализировать механизм воздействия сорбента на иммобилизацию металла, изучить перераспределение соединений металла и направленность процессов их трансформации.

В незагрязненной луговой почве (контроль) наблюдается (табл. 1) преобладание прочно связанных соединений Cu (92 % от суммы фракций), которое обеспечивается, главным образом, удержанием металла первичными и вторичными минералами (66 %). Подвижность Cu в почве невысока (8 %) и представлена в основном специфически сорбированными соединениями металла.

При искусственном загрязнении почвы не только возрастает содержание всех формCu, но их соотношение изменяется в сторону повышения содержания НС соединений (до 38 %) (табл. 1). В большей степени увеличивается содержание комплексных и специфически сорбированных на оксидах Fe и Mn соединений металла. В составе ПС соединений Cu сохраняется преобладание фракции металла, связанной с алюмосиликатами. Однако ее относительное содержание в условиях техногенной нагрузки уменьшается до 41 %. Органическое вещество принимает активное участие в удерживании Cu как в прочно, так и в непрочно связанном состоянии.

Внесение биочара вызвало изменения в соотношении формируемых групп соединений металла и входящих в их состав фракций (табл. 1). Исследования показали, что сорбент оказывает существенное влияние на трансформацию соединений Cu в почве. На всех вариантах опыта с внесением сорбента отмечается снижение подвижности металла за счет образования ПС соединений.

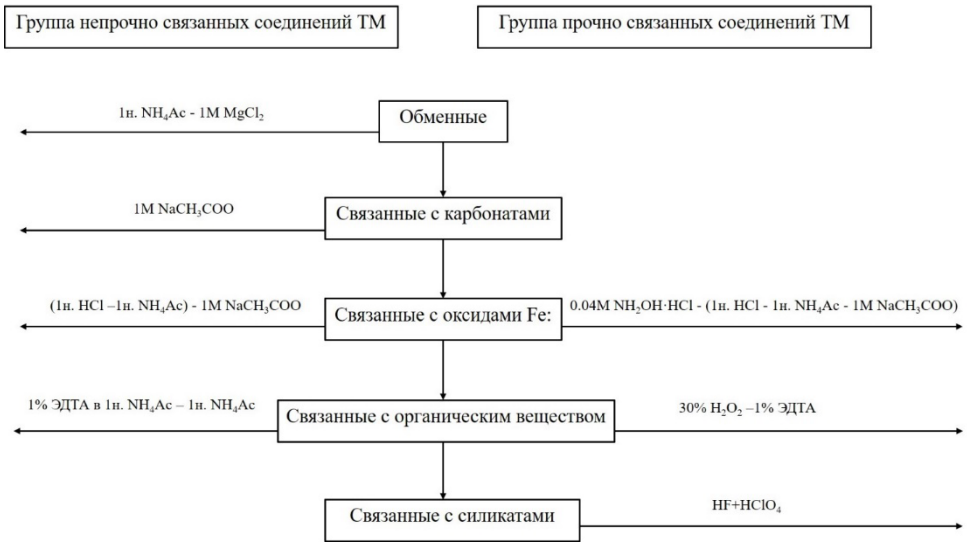


Рис. 2. Комбинированная схема фракционирования соединений ТМ в почве (Минкина и др., 2013)

Таблица 1. Распределение Cu по формам и группам соединений в луговой почве модельного опыта в присутствии биочара

Варианты опыта	НС соединения				ПС соединения с			Сумма фракций	НС/ ПС, % от суммы
	Обменные	Комплексные	Специфически сорбированные		органическим веществом	(гидр) оксидами Fe и Mn	силикатами		
			на карбонатах	на (гидр) оксидах Fe и Mn					
Контроль	0,2 0	0,8 2	1,6 4	0,7 2	8,3 19	3,2 7	28,9 66	43,7	8/92
Cu	27,1 2	216,4 16	81,2 6	189,3 14	175,8 13	108,3 8	554,5 41	1352,6	38/62
Cu + 1 % биочар	13,6 1	122,4 9	68,1 5	108,8 8	271,9 20	136,1 10	639,3 47	1360,2	23/77
Cu + 2,5 % биочар	9,4 1	67,4 5	53,9 4	57,6 4	350,9 26	121,3 9	687,4 51	1347,9	14/86

При внесении биочара в дозе 2,5 % относительное содержание НС соединений металла практически приближается до уровня контроля. Одновременно происходит перераспределение фракционно-группового состава металла. В составе ПС соединений Cu при внесении углеродистого сорбента в загрязненные почвы наблюдается повышение, как в абсолютных, так и в относительных концентрациях металла во всех фракциях.

В большей степени отмечается увеличение содержания металла во фракции, связанной с органическим веществом (до 13 %). Такая тенденция может быть связана с привнесением органического вещества в почву, которое довольно активно сорбирует ионы Cu. На одну-две трети уголь состоит из аморфного углерода, часть которого выгорает в процессе активации с образованием пор различных размеров, что обуславливает не только наличие большой удельной сорбирующей поверхности, но и приводит к увеличению содержания органического вещества в почве [25]. В свою очередь, увеличение содержания органического вещества в почве за счет добавления биочара может трансформировать лабильную Cu в менее подвижные фракции, например, связанную с органическим веществом. Функциональные группы (например, – OH, – COOH, – C = O- и C = N), присутствующие на поверхности биочара, также участвуют во взаимодействии с металлом с образованием комплексов, которые увеличивают специфическую адсорбцию металла. Содержание остаточной фракции также имеет тенденцию к увеличению, что свидетельствует о более прочном закреплении металла в почве в присутствии сорбента.

Таким образом, внесение высокопористого углеродистого сорбента (биочара) в загрязненную почву привело к иммобилизации подвижных соединений Cu. С увеличением дозы внесения сорбента данные изменения в содержания НС соединений металла более выраженные. Наибольшую роль в прочном закреплении Cu играет органическое вещество.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–34–60041.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kabata-Pendias A. (2011). Trace Elements in Soil and Plants. CRC Press, Boca Raton, 548 p.
2. Schloter M., Nannipieri P., Sorensen S.J., Elsas J.D.V. Microbial indicators for soil quality. Biology and Fertility of Soils. 2017. Vol. 54. P. 1–10.
3. Wang Y., Wang R., Fan L., Chen T., Bai Y., Yu Q., Liu Y. Assessment of multiple exposure to chemical elements and health risks among residents near Huodehong lead-zinc mining area in Yunnan, Southwest China. Chemosphere. 2017. Vol. 174. P. 613–627.
4. Wood J.L., Tang C., Franks A.E. Microbial associated plant growth and heavy metal accumulation to improve phytoextraction of contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry. 2016. Vol. 103. P. 131–137.
5. Shen F., Liao R., Ali A., Mahar A., Guo D., Li R., Sun X., Awasthi M.K., Wang Q., Zhang Z. Spatial distribution and risk assessment of heavy metals in soil near a Pb/Zn smelter in Feng county, China. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2017. Vol. 139. P. 254–262.
6. Zota A.R., Willis R., Jim R., Norris G.A., Shine J.P., Duvall R.M., Schaider L.A., Spengler J.D. Impact of mine waste on airborne respirable particulates in Northeastern Oklahoma, United States. Journal of the Air & Waste Management Association. 2009. Vol. 59 (11). P. 1347–1357.
7. Violante A., Cozzolino V., Perelomov L., Caporale A.G., Pigna M. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. Journal of Soil Science and Plant Nutrition. 2010. Vol. 10. P. 268–292.
8. Ju W.L., Liu L.Q., Fang L.C., Cui Y.X., Duan C.J., Wu H. Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2019. Vol. 167. P. 218–226.
9. Ahmad M., Usman A.R.A., Al-Faraj A.S., Ahmad M., Sallam A., Al-Wabel M.I. Phosphorus-loaded biochar changes soil heavy metals availability and uptake potential of maize (Zea mays L.) plants. Chemosphere. 2018. Vol. 194. P. 327–339.
10. Houben D., Evrard L., Sonnet P. Beneficial effects of biochar application to contaminated soils on the bioavailability of Cd, Pb and Zn and the biomass production of rapeseed (Brassica napus L.) Biomass Bioenergy. 2013. Vol. 57. P. 196–204.
11. Wang H-T., Ding J., Chi Q. – Q., Li G., Pu Q., Xiao Z-F., Xue X-M. The effect of biochar on soil-plant-earthworm-bacteria system in metal(loid) contaminated soil. Environmental Pollution. 2020. Vol. 263, Part B, 114610.
12. Ahmad M., Rajapaksha A.U., Lim J.E., Zhang M., Bolan N., Mohan D., Vithanage M., Lee S.S., Ok Y.S. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review, Chemosphere. 2014. Vol. 99. P. 19–33.
13. Huggins T.M., Haeger A., Biffinger J.C., Ren Z.J. Granular biochar compared with activated carbon for wastewater treatment and resource recovery. Water research. 2016. Vol. 94. P. 225–232.
14. Cao X., Harris W. Properties of dairy-manure-derived biochar pertinent to its potential use in remediation. Bioresource Technology. 2010. Vol. 101. P. 5222–5228.
15. Rees F., Simonnot M.O., Morel J.L. Short-term effects of biochar on soil heavy metal mobility are controlled by intra-particle diffusion and soil pH increase. European Journal of Soil Science. 2014. Vol. 65. P. 149–161.
16. Lomaglio T., Hattab-Hambli N., Miard F., Lebrun M., Nandillon R., Trupiano D., Scippa G.S., Gauthier A., Motelica-Heino M., Bourgerie S., Morabito D. Cd, Pb, and Zn mobility and (bio) availability in contaminated soils from a former smelting site amended with biochar Environ. Environmental Science and Pollution Research. 2017. Vol. 25. P. 25744–25756.
17. R.V. Poucke, J. Ainsworth, M. Maeseele, Y.S. Ok, E. Meers, F.M.G. Tack Chemical stabilization of Cd-contaminated soil using biochar. Applied Geochemistry. 2018. Vol. 88. P. 122–130.
18. Warnock D.D., Lehmann J., Kuyper T.W., Rillig M.C. Mycorrhizal responses to biochar in soil – concepts and mechanisms. Plant and Soil. 2007. Vol. 300. P. 9–20.
19. Laird D.A., Fleming P., Davis D.D., Horton R., Wang B., Karlen D.L. Impact of biochar amendments on the quality of a typical Midwestern agricultural soil, Geoderma 158 (2010) 443–449.
20. ГН 2.1.7.2511–09 Ориентировочно допустимые концентрации химических веществ в почве, утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 18 мая 2009 года
21. ГОСТ 7657–84 Уголь древесный. Технические условия. – М.: Изд-во Стандартов, 1976. – 7 с.
22. Минкина Т.М., Мотузова Г.В., Манджиева С.С., Назаренко О.Г., Бурачевская М.В., Антоненко Е.М. Фракционно-групповой состав Mn, Cr, Ni и Cd в почвах техногенных ландшафтов (район Новочеркасской ГРЭС). Почвоведение. 2013. №. 4. С. 414–425.
23. Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. Analytical Chemistry. 1979. Vol. 51(7). P. 844–850.
24. Minkina T.M., Mandzhieva S.S., Burachevskaya M.V., Bauer T.V., Sushkova S.N. Method of determining loosely bound compounds of heavy metals in the soil // MethodsX. 2018. Vol. 5. P. 217–226.
O'Connor D., Peng T., Zhang J., Tsang D.S.W., Alessi D.S., Shen Z., Bolan N.S., Hou D. Biochar application for the remediation of heavy metal polluted land: A review of in situ field trials. Science of The Total Environment. 2018. Vol. 619. P. 815–826.

УДК 631.416.8

ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДИСТОГО СОРБЕНТА НА ПОДВИЖНОСТЬ ЦИНКА В ПОЧВЕ

М.В. Бурачевская, Т.В. Бауэр, В.С. Цицуашвили, И.П. Лобзенко, П.Д. Погонышев

Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время остро стоит проблема загрязнения почв химическими соединениями различного класса. Среди загрязняющих веществ тяжелые металлы (ТМ) имеют особое экологическое и биологическое значение. Даже биофильные микроэлементы такие как, например, Zn, при значительных концентрациях в окружающей среде переходят в разряд загрязняющих веществ. Данный металл входит в число приоритетных загрязняющих веществ почв Ростовской области (Minkina et al. 2012).

Наиболее распространенные методы ремедиации загрязненных почв in situ основаны на удалении ТМ или их связывании. Обработка почвы путем внесения в нее сорбентов и / или мелиорирующих добавок позволяет обеспечить связывание ТМ, приводящее к уменьшению их подвижности и биологической доступности, все шире применяется в современных технологиях ремедиации (Bezuglova et al., 2018). Для этих целей в качестве сорбентов используют широкий ряд природных минеральных и органических веществ, отходов промышленности и сельского хозяйства, а также специально разработанных материалов (Koptsik, 2014; Pukalchik et al., 2018).

Углеродистые сорбенты – продукт термической обработки (пиролиза) растительных материалов и некоторых промышленных отходов (Mohan et al., 2006). Возможности использования углеродистых сорбентов для прочного закрепления загрязняющих веществ в почве способствует их чрезвычайно высокая стабильность в почве. Так, полупериод минерализации биочара (T50) достигает 100 лет и более, а скорость минерализации активированного угля еще ниже (Zimmerman, 2019).

Углеродистые сорбенты (активированный уголь, биочар, сажа и другие) могут прочно связывать различные загрязняющие вещества в почве, поскольку обладают большой сорбционной способностью (Pukalchik et al., 2018). Удельная площадь поверхности пор углеродистых сорбентов велика и варьируется в интервале 400–2000 м^2/г, сорбционная емкость – 200–980 г./кг (Sokolov, Kamakhina, 2011; Зиннатшина и др., 2018). Биочар является пористым богатым углеродом продуктом с низкой плотностью, полученный в результате термической обработки органического материала при недостатке или отсутствии кислорода воздуха. Органическая часть биочара представлена слоями ароматических колец, богатых углеродом. В отличие от графита, имеющего похожую структуру, слои ароматических колец биочара менее выровнены относительно друг друга. Для производства биочара используют отходы разного рода: древесины, стеблей, листьев, шелухи сельскохозяйственных растений. Это значительно удешевляет данный продукт, однако при этом качество получаемого биочара зависит от исходного сырья.

Биочар химически инертен и стабилен, имеет высокую абсорбционную способность и огромную пористость (Kishimoto, Sugiura, 1985). Благодаря данных характеристикам биочар широко известен как эффективное средство для ремедиации загрязненных почв. Показано, что внесение в почвы (sandy loam paddy soil) биочара из рисовой соломы и древесины бамбука также существенно снижало концентрацию подвижных форм Cd, Cu, Pb и Zn в почве (Lu et al., 2017). Несмотря на множество проведенных в последние годы исследований как в лабораторных, так и в полевых условиях (Puga et al., 2015; O'Connor et al., 2018), понимание влияния на почву высокозольных сорбентов все же ограничено, в связи с отсутствием достаточных данных по их долгосрочному эффекту на свойства почвы (Hunt et al, 2010). В основном, исследования по действию углеродистых сорбентов проводились на бедных песчаных и кислых почвах. Остается актуальным вопрос в изучении свойств углеродистых сорбентов, эффективность их применения на черноземах.

Цель работы – изучить влияние внесения биочара на подвижность Zn в черноземе обыкновенном.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для закладки модельного опыта отбирался верхний слой (0–20 см) чернозема обыкновенного карбонатного (Haplic Chernozem, по классификации WRB, 2015) целинного участка, находящемся вдали от возможных источников загрязнения. Исследуемый образец почвы обладает следующими физико-химическими свойствами: pH – 7.3; 48.1 % физической глины (частиц с диаметром < 0,01 мм), 28.6 % ила (частиц с диаметром < 0,001 мм), содержание органического углерода 3.7 %; карбонатов – 0.1 %; ЕКО почвы – 36 сМ(+)·кг$^{-1}$.

Состав обменных оснований вместе со значительным содержанием органического вещества, наличием высокодисперстных мицелярных форм карбонатов и лессовидным характером почвообразующих пород обусловили благоприятные физические свойства чернозема обыкновенного: водо- и воздухопроницаемость, неплотное сложение и большую влагоемкость.

В сосуды с дренажем помещали по 1 кг почвы, просеянной через сито диаметром ячеек 2 мм, добавляли водный раствор нитрата Zn. Доза внесения металла 5 ОДК (220 мг/кг, ГН 2.1.7.2511/09). Через 2 месяца после закладки опыта в загрязненную почву добавляли сорбент. В качестве сорбента вносили биочар. Инкубация проходила при температуре +20–22 °С и естественном освещении. Опыт был заложен по следующей схеме: 1) контроль (почва без загрязнения); 2) Zn 1100 (почва с внесением металла в дозе 5ОДК – 1100 мг/кг); 3) Zn 1100 + 1 % биочара; 4) Zn 1100 + 2,5 % биочара; 5) Zn 1100 + 5 % биочара. Опыт проводился в 3-х повторностях.

Для определения непрочно связанных соединений Zn в почве применялись параллельные экстракции, позволяющие определять: обменные формы (1 н. ацетатно-аммонийный буфер (ААБ) с pH 4,8); комплексные формы (по разнице между результатами экстракции 1 % ЭДТА в ААБ с pH 4,8 и ААБ); специфически сорбированные (по разнице между результатами экстракции 1 н. HCl и 1 н. ААБ) (Minkina et al., 2018). Суммарное содержание обменных, комплексных и специфически сорбированных соединений составляет группу непрочно связанных (НС) соединений. Содержание металла в экстрактах было определено с помощью ААС. Валовое содержание Zn в почве определяли рентген-флуоресцентным методом с использованием спектроскана «МАКС-GV».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общее содержание Zn в исследуемой почве соответствует фоновому содержанию в черноземах и не превышает ОДК (Minkina et al. 2012) (табл. 1). Содержание обменных соединений Zn в черноземе обыкновенном не превышает 3 % от общего содержания (табл. 1).

Таблица 1. Содержание обменных, комплексных и специфически сорбированных форм Zn в почве модельного опыта, мг/кг

Вариант опыта	Непрочно связанные соединения металла			Общее содержание, мг/кг
	обменные	комплексные	специфически сорбированные	
Контроль	2,3±0,2*	1,1±0,1	9,6±0,9	84,30±7,6
Zn 1100	165,5±14,9	70,9±6,4	248,2±22,3	1182,00±106
Zn 1100+1 % биочара	94,6±8,5	35,5±3,2	177,5±16,0	1183,00±110
Zn1100+2,5 % биочара	21,2±1,9	23,6±2,1	117,8±10,6	1178,00±101
Zn 1100+5 % биочара	4,7±0,4	5,9±0,5	35,6±3,2	1185,00±100
	ПДК 23,0 (ГН 2.1.7.2041–06)			ОДК 220,0 (ГН 2.1.7.2511/09)
* – ошибка средней				

При внесении соединений Zn в почву происходит увеличение валового содержания металла, а также обменных, комплексных и специфически сорбированных форм. При загрязнении почвы Zn наблюдается наибольший рост обменных форм металла (до 14 %), что отражает склонность Zn к ионному обмену в почве.

Как и в незагрязненном образце, при загрязнении непрочно связанные соединения металла представлены в основном его специфически сорбированными формами (табл. 1). При загрязнении увеличивается в большей степени относительное содержание наиболее мобильных форм – обменных (на 11 %) и комплексных (на 5 %). Zn обладает слабой комплексообразующей способностью с органическим веществом (Minkina et al., 2017; Bauer et al., 2018; Burachevskaya et al., 2018). При одинаковом pH 1г гуминовых кислот смог связать 0,995 мг-экв Zn и 2,390 мг-экв Cu, хотя первого элемента было в системе в 2 раза больше второго (Piccolo, Stevenson, 1982). Рядом исследователей отмечено, что Zn более склонен к взаимодействию с минеральными почвенными компонентами (Kabata-Pendias, 2011; Minkina et al., 2017; Burachevskaya et al., 2018).

При внесении углеродистого сорбента в загрязненную металлом почву происходят заметные изменения в содержании и составе непрочно связанных форм. На вариантах опыта с внесением биочара отмечается снижение подвижности соединений металла. Отмечается снижение подвижности Zn: обменных форм на 6–13 %, комплексных форм на 3–5 %, специфически сорбированных на 6–18 %. Уменьшение подвижности металла возрастало с повышением дозы внесения углеродистого сорбента (табл. 1). На варианте с внесением 1100 мг/кг металла, уже на дозе 2,5 % биочара уровень содержания обменных форм Zn не превышал ПДК для почвы (23 мг/кг), что указывает на способность применяемого сорбента прочно закреплять на своей поверхности металл и уменьшать его мобильность в загрязненных почвах. Наибольшее снижение подвижности Zn наблюдалось при внесении 5 % биочара. Сорбент показал высокую эффективность применения на загрязненной почве.

В оценке подвижности ТМ в почве информативным показателем является относительное содержание обменных, комплексных и специфически сорбированных форм металла в группе непрочно связанных соединений. В незагрязненной почве установлено следующее распределение форм Zn в группе непрочно связанных соединений: специфически сорбированные > обменные > комплексные (табл. 2).

Таблица 2. Доля Zn в группе непрочно связанных соединений, % от группы

Вариант опыта	% от группы НС		
	обменные	комплексные	специфически сорбированные
Контроль	18	8	74
Zn 1100	34	15	51
Zn 1100+1 % биочара	31	12	58
Zn1100+2,5 % биочара	13	14	72
Zn 1100+5 % биочара	10	13	77

Непрочно связанные соединения Zn представлены в основном его специфически сорбированными формами как в незагрязненном образце, так и при загрязнении (табл. 2). Следует отметить, что при загрязнении почвы доля специфически сорбированных форм Zn сокращается (до 51 % от группы непрочно связанных соединений), однако увеличиваются доли более мобильных форм – обменные и комплексные. Причем в распределении в группе для Zn характерно преобладание обменных форм соединений (до 34 %) (табл. 2).

Применение сорбентов на загрязненной почве восстанавливает соотношение в группе непрочно связанных соединений, близкое к незагрязненной почве, наиболее эффективным было применение дозы 5 % биочара (табл. 2).

Таким образом, содержание Zn в незагрязненной почве не превышает допустимых значений ОДК и фонового уровня для черноземов обыкновенных. Содержание обменных соединений не более 3 % от общего содержания. В группе непрочно связанных соединений следующее распределение Zn: специфически сорбированные > обменные > комплексные. При загрязнении почвы наблюдается увеличение содержания обменных, комплексных и специфически сорбированных форм соединений исследованного металла. Подвижные соединения Zn в основном представлены обменными и специфически сорбированными формами.

Благодаря высокопористой структуре биочара, его внесение в загрязненную почву привело к иммобилизации подвижных соединений металла. При загрязнении 1100 мг/кг Zn в присутствии биочара отмечена эффективность его применения уже на дозе внесения 2,5 %. Эффективность была показана снижением содержания обменных форм металла в почве и ниже уровня ПДК.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МК-2244.2020.5

ЛИТЕРАТУРА

ГН 2.1.7.2041–06. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве: Гигиенические стандарты. – Введ. 2006–04–01. – М.: Роспотребнадзор, 2006. – 15 с.

ГН 2.1.7.2511/09, Ориентировочно-допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве: Гигиенические стандарты. – Введ. 2006–07–01 – М.: Роспотребнадзор, 2006. – 10 с.

Зиннатшина Л.В., et al. Влияние сорбентов на скорость биоремедиации и свойства почвы, загрязненной смесью нефтепродуктов // Естественные и технические науки. – 2018. – № 9(123). – С. 24–30.

Bauer T., et al. Stabilization dynamics of easily and poorly soluble Zn compounds in the soil // Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis. – 2018. – № 19. – P. 184–192

Bezuglova O.S., Gorbov S.N., Tischenko S.A., Shimko A.E. Use of brown coal as a detoxifier of soils contaminated with heavy metals // Journal of Geochemical Exploration. – 2018. – № 184. P. 232–238

Burachevskaya M., et al.. Chemical partitioning of Zn in soil: application of two sequential extraction procedures // Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis. – 2018. – № 19. – P. 93–100.

Hunt J., DuPonte M., Sato D., Kawabata A. Soil and Crop Management. Dec. SCM-30. – 2010.

Kabata-Pendias A. Trace elements in soils and plants. 4th ed. NW: CRC Press, Taylor and Francis Group. – 2011.

Koptsik G.N. Problems and prospects concerning the phytoremediation of heavy metal polluted soils: A review // Eurasian Soil Science. – 2014. – № 47 (9). – P.923–939.

Lu K., et al.. Effect of bamboo and rice straw biochars on the mobility and redistribution of heavy metals (Cd, Cu, Pb and Zn) in contaminated soil // Journal of Environmental Management. – 2017. – № 186(2). – P. 285–292

Minkina T.M., Motusova G.V., Mandzhieva S.S., Nazarenko, O.G. Ecological resistance of the soil-plant system to contamination by heavy metals // Journal of Geochemical Exploration. – 2012. – № 123, P. 33–40.

Minkina T.M., Mandzhieva S.S., Burachevskaya M.V., Bauer T.V., Sushkova S.N. Method of determining loosely bound compounds of heavy metals in the soil // MethodsX. – 2018. – № 5. – P. 217–226.

Minkina T.M. et al.. Heavy metals in the soil–plant system of the Don River estuarine region and the Taganrog Bay coast // Journal of Soils and Sediments. – 2017. – № 17(5). – P. 1474–1491.

Mohan D., et al. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review // Energy Fuels. 2006. № 20(3). P. 848–889.

O'Connor D. et al. . Sulfur-modified rice husk biochar: A green method for the remediation of mercury contaminated soil // Science of the Total Environment. – 2018. – № 621. – P. 819–826

Piccolo A., Stevenson F.J. Infrared spectra of Cu2+, Pb2+ and Ca2+ complezes of soil humic substances // Geoderma. № 27. P. 195–208.

Puga A.P., et al.. Biochar application to a contaminated soil reduces the availability and plant uptake of zinc, lead and cadmium // Journal of Environmental Management. -2015. – № 159. P. 86–93

Pukalchik M., Mercl F., Terekhova V., Tlustoš P. Biochar, wood ash and humic substances mitigating trace elements stress in contaminated sandy loam soil: Evidence from an integrative approach // Chemosphere. -2018. – № 203. – P.228–238.

Sokolov E.M., Kamakhina S.A. Influence of Moscow lignite basin soil on the development of plant crops // New of Tula State University. Engineering Science. -2011. – № 6(2). – P. 521–530

УДК 544.77.052.5

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ДЕТОКСИЦИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БИОКОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ТОРФОВ И МИКРООРГАНИЗМОВ-НЕФТЕДЕСТКРУТОРОВ РОДА *RHODOCOCCUS* ПО ОТНОШЕНИЮ К НЕФТЕПРОДУКТАМ В РАЗЛИЧНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ (ВОДА И ПОЧВА)

М.М. Герцен, Е.Д. Дмитриева

Тульский государственный университет, Тула, Россия,

Поступление сырой нефти в экосистемы (водные и почвенные) является результатом утечки нефтепродуктов [1]. В настоящее время около 80 % земель загрязнено продуктами нефтяного происхождения (углеводороды, растворители и т. д.), используемыми в качестве источника энергии в нефтяной промышленности [2]. Поэтому актуально проведение исследований, направленных на решение проблем, связанных с загрязнением почвенной и водной среды в результате разлива нефтепродуктов.

Рекультивация загрязненных сред с использованием микроорганизмов-нефтедеструкторов заключается в одновременной активации аборигенной микрофлоры почвы бактериями и параллельной интродукцией адаптированных к загрязнителю и условиям внешней среды штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов [3]. При введении в токсичную среду природных биологически активных полимеров – гуминовых кислот (ГК), благодаря их сложной внутримолекулярной организации, может происходить не только сорбция нефтяных углеводородов, но и повышение метаболической активности микроорганизмов-нефтедеструкторов за счет ГК, выступающих в качестве питательного субстрата [4]. Микробиотические особенности гуминовых кислот способствуют проявлению сильной деструктивной активности при попадании в почвенную среду, загрязненную углеводородами нефти.

Цель работы – определить связывающую и детоксицирующую способность биокомпозиции на основе гуминовых кислот торфов и микроорганизмов-нефтедесткруторов рода *Rhodococcus* по отношению к нефтепродуктам в почвенных и водных экосистемах.

Объекты исследования – гуминовые кислоты торфов различного генезиса Тульской области: тростникового низинного торфа (ТНТ), черноольхового низинного торфа (ЧНТ), сфагнового верхового торфа (СВТ) и сфагнового переходного торфа (СПТ) [5]. Штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis S67, Rhodococcus erythropolis X5* получены из лаборатории плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН (г. Пущино). Данные штаммы входят в состав биопрепарата «МикроБак», применяемого для биоремедиации нефтезагрязненных территорий [6]. В качестве токсикантов выбраны: дизельное топливо (ДТ) с заправки Роснефть и нефть с нефтеперерабатывающего завода АО «ГАЗПРОМНЕФТЬ-МНПЗ». Эксперимент проводили в пресной воде при комнатной температуре. Растворы анализируемых гуминовых кислот готовили растворением навесок препаратов в 0.1 М NaOH в течение суток. Затем доводили до нейтрального значения pH с помощью pH-метра Анион 4154 добавлением 0.05 М HNO_3 или 0.05 М NaOH и до метки – 0.1М $NaNO_3$. Микроорганизмы культивировали в полноценной среде Лурия-Бертани (ЛБ). Готовые среды стерилизовали автоклавированием в течение 30 мин при 120^0 С. Бактерии выращивали в жидкой питательной среде ЛБ в течение 24 ч для получения инокулята. На первом этапе работы методом биотестирования определяли связывающую способность гуминовых кислот по отношению к нефтепродуктам в присутствии микроорганизмов рода *Rhodococcus* в водных средах. Тест-объектом являлся представитель гидрофитов – ряска малая, наиболее чувствительный объект к действию гуминовых кислот.

Установлено, что ГК торфов, не зависимо от их происхождения, оказывали стимулирующее действие на ростовые показатели гидрофита: происходило увеличение количества роста лопастей ряски по сравнению с контролем от 24 до 42 %. Максимальный прирост лопастей ряски наблюдался в присутствии ГК (ЧНТ) 42 %, минимальный – ГК (СПТ) 24 %, причиной является качественный и количественный состав ГК: в составе ГК (ЧНТ), состоящего преимущественно из лиственных пород, содержится большое количество лигнина [7], еще не окисленного до перехода в нерастворимый в щелочах остаток гуминовых кислот – гумин, поэтому, они отличаются большим значением молекулярных масс. Установлено, что использование лигниновых препаратов меняло динамику распределения основных метаболитов в растениях, продолжительность их развития, биометрические и биохимические показатели [8]

Для построения шкалы токсичности дизельного топлива и нефти проводили вегетационный эксперимент с использованием в качестве тест-отклика прирост лопастей ряски малой. Регистрацию тест-отклика проводили через 14 дней после начала эксперимента. Токсический эффект модельных загрязнителей оценивали ($T_{эт}$) как уменьшение тест-отклика в присутствии модельного загрязнителя ($R_{эт}$) по сравнению с контролем ($R_о$): $T_{эт} = \frac{R_O - R_{эт}}{R_O} * 100\ \%$.

Токсический эффект рассчитывали по формуле и строили зависимость токсического эффекта от концентрации модельного загрязнителя (на рис. 1). Токсичность нефтяных углеводородов зависит от содержания в них ароматических фракций, которые способны сохраняться в морской воде и в донных отложениях длительный период в силу своей стойкости к деградации. Алканы обладают не меньшей токсичностью, но деградация их происходит сравнительно быстрее. Кроме того, в присутствии нефтяных углеводородов токсичность других загрязняющих веществ, в частности металлов и хлорированных углеводородов, проявляется в большей степени. Наличие нефтяных углеводородов и масел в донных отложениях способствует интенсивному накоплению в них хлорированных углеводородов и металлов. С другой стороны, процесс перехода других загрязняющих веществ из донных отложений в воду в присутствии нефти замедляется [9]. Значения эффективных концентраций нефти, вызывающих 50 % снижение тест-отклика для ДТ и нефти, были практически одинаковыми и составили 0,5 и 1 % об., соответственно. Но т. к. рабочие концентрации гуминовых кислот и микроорганизмов Rhodococcus – 2 и 5 % об. нами было решено увеличить концентрацию до 2 % об. загрязнителя в водной среде.

Для оценки токсического эффекта в системе, состоящей из гуминовых кислот, микроорганизмов рода Rhodococcus и модельного загрязнителя, сравнивали тест-отклик контроля и контроля в присутствии микроорганизм рода Rhodococcus и модельного загрязнителя: $T_{м/о+эт} = \frac{R_O - R_{м/о+эт}}{R_O} * 100\ \%$ Количественно детоксицирующую способность (D) ГК оценивали с помощью следующего уравнения: $D = \left(\frac{1 - \frac{R_{гк} - R_{гк+эт}}{R_{гк}}}{\frac{R_O - R_{м/о+эт}}{R_O}} \right) * 100\ \%$

Значения коэффициентов детоксикации при совместном присутствии ГК и микроорганизмов рода Rhodococcus и в отдельном присутствии при добавлении модельных загрязнителей представлены на рис. 2.

В присутствии дизельного топлива на лопастях ряски наблюдался некроз, добавление в раствор гуминовых кислот снижало степень некроза. Максимальный детоксицирующий эффект на рост лопастей ряски малой в присутствии дизельного топлива концентрации 2 % об. продемонстрировали ГК (СВТ) и ГК(ТНТ) 52 и 43 % соответственно. Гуминовые кислоты оказывают детоксицирующий эффект за счет связывания модельных загрязнителей и стимулировании роста тест-объекта. В присутствии углеводородокисляющих микроорганизмов *Rh. erythropolis S67 и X5* детоксицирующий эффект увеличивался. Наилучшие показатели у микроорганизмов *Rh.erythropolis S67* и ГК (ТНТ) или ГК (СВТ) 72 и 69 % соответственно, также в данных вариантах опыта наблюдалось увеличение длины корней у ряски. Максимальный показатель детоксикации дизельного топлива в присутствии *Rh. erythropolis X5*и ГК (СВТ) 76 %, а также максимальный показатель длины корня, исследуемого тест-объекта.

Присутствие гуминовых кислот в растворе оказывало детоксицирующий эффект на исследуемый тест-объект. Можно предположить, что присутствие в ГК как полярных, так и неполярных структур может вносить вклад в снижение токсичности нефти, обусловленное как непосредственным связыванием ГК нефтяных углеводородов, так и стимулирующим воздействием ГК на тест-объект, проявляющееся в повышении сопротивляемости ряски нефтяному загрязнению водной биоты. Максимальный коэффициент детоксикации у ГК (ТНТ) и ГК (СВТ) 31 % и 27 % соответственно.

Добавление микроорганизмов рода Rhodococcus увеличивало показатели коэффициента детоксикации. Максимальные значения у систем, содержащих микроорганизмы Rh. erythropolis S67 или ГК (ТНТ), или ГК (СВТ) 45 % и 35 %, и микроорганизмы Rh. erythropolis X5 или ГК (СВТ), или ГК (ТНТ) 38 % и 35 % соответственно, что превышает показатели контроля, а также вариантов опыта в присутствии одних ГК и одних микроорганизмов, что еще раз доказывает стимулирующий эффект, оказываемый гуминовыми кислотами на растения и микроорганизмы, а так же перспективность применения химико-биологического сорбента на основе гуминовых кислот торфов и микроорганизмов Rh. erythropolis S67 и X5.

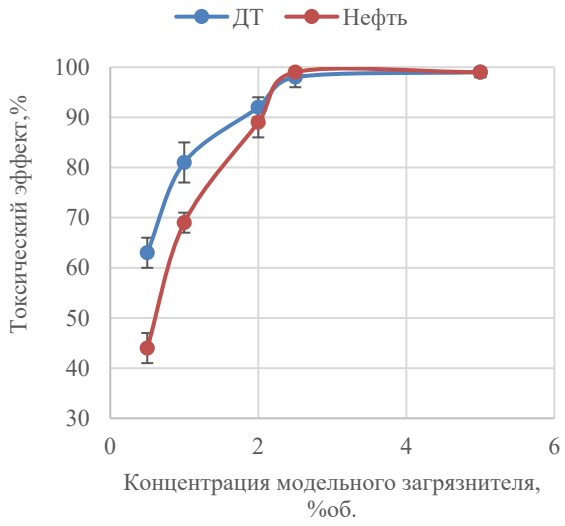


Рис. 1 Токсический эффект, оказываемый модельными загрязнителями на рост лопастей ряски

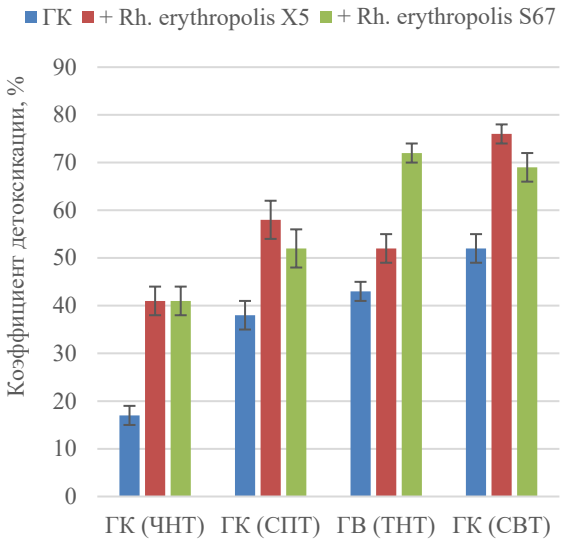


Рис. 2 Детоксицирующий эффект биокомпозиции в присутствии ДТ 2 % об.

Нефть и нефтепродукты в зависимости от фракционного состава и количества могут оказывать определенное токсическое действие на некоторые организмы. Содержание нефти в почве даже небольшой концентрации (0,15 %) снижает урожай зерновых культур. Так как изменение уровня токсичности нефтяного загрязнения в присутствии ГК может быть обусловлено их собственным воздействием на тест-объект, то одновременно с детоксицирующим эффектом оценивали и собственное влияние ГК на тест-объект – биостимулирующее действие.

Изучали влияние на всхожесть и энергию прорастания семян внесения в субстрат углеводородсодержащих загрязнителей, гуминовых кислот и микроорганизмов. Энергию прорастания семян определяли на 3-ий день после посадки, всхожесть – на 7-ой. Присутствие в модельном грунте нефти приводило к снижению энергии прорастания и всхожести семян в 4 раза.

Результаты вегетационного опыта в варианте с загрязнителем и микроорганизмами – нефтедеструкторами *Rh. erythropolis S67 и X5* показали, что наиболее выраженный положительный эффект от внесения указанных микроорганизмов наблюдается в условиях загрязнения нефтью: энергия прорастания и всхожесть превышают аналогичные показатели контрольной группы в 2,5 – 2,8 раза (*Rh. erythropolis X5*) и в 3,3 – 3,9 раза (*Rh. erythropolis S67*) соответственно. Как видно из рис. 3.44–3.45, внесение *Rh. erythropolis S67* в грунт привело к частичному снятию токсичности нефти по отношению к растениям кресс-салата.

В опыте при совместном применении гуминовых кислот, микроорганизмов – нефтедеструкторов и загрязнителей проросших семян на 3-й и 7-й день после начала эксперимента было больше, чем во всех остальных вариантах опыта. Наибольший стимулирующий эффект по сравнению с контролем был выявлен в следующих вариантах: ГК (СВТ) + *Rh.erythropolys X5*+нефть; ГК (СПТ) + *Rh.erythropolys X5* + нефть; ГК (ТНТ) + *Rh.erythropolys S67* + нефть. Энергия прорастания в данных вариантах опыта превышала контроль (загрязнитель+песок) на 36 %, 70 %, 65 % и 61 %, а всхожесть на 36 %, 70 %, 64 % и 60 % соответственно.

Во всех вариантах опыта микроорганизмы *Rh. erythropolys X5* давали лучшие показатели в сочетании с гуминовыми кислотами сфагнового торфа, а микроорганизмы *Rh. erythropolys* S67 – с гуминовыми кислотами тростникового низинного торфа. Следует отметить, что энергия прорастания и всхожесть семян кресс-салата в данных вариантах превышала аналогичные показатели, полученные в опыте на прокаленном песке с поливом дистиллированной водой.

Эксперимент показал, что совместное применение гуминовых кислот и микроорганизмов – нефтедеструкторов в условиях загрязнения субстрата дизельным топливом не приводит к значимому изменению энергии прорастания или всхожести семян кресс-салата.

Таким образом, методом биотестирования было показано, что гуминовые кислоты оказывают положительное влияние на посевные качества семян кресс-салата, а также повышают жизнеспособность растений в условиях загрязнения нефтью.

Полученные в ходе эксперимента данные показали перспективность совместного применения ГК (СВТ) + *Rh.erythropolys X5*, ГК (СПТ) + *Rh.erythropolys X5*, ГК (ТНТ) + *Rh.erythropolys S67* в условиях нефтяного загрязнения.

Связывание углеводородов гуминовыми кислотами не является основным фактором, определяющим интенсивность прорастания семян кресс-салата, положительное влияние на посевные качества тест-культуры в условиях загрязнения нефтью и нефтепродуктами связано в большей степени со стимулирующим действием гуминовых кислот за счет проникновения низкомолекулярных фракций молекул гуминовых кислот внутрь семени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Войно Д.А. Процесс очистки природных вод от гуминовых веществ с использованием электроразрядного реактора: Дисс… канд. техн. наук // Томск, Томский политехнический институт. 2016, 124 с.
1. Иваненко Н.В. Экологическая токсикология. Учебное пособие. Владивосток: Изд-во ВГУЭС. 2006. 108 с.
2. Ганиев М.М., Недорезков В.Д. Химические средства защиты растений. М.: Колосс. 2006. 248 с.
3. Гречищева Н.Ю., Перминова И.В., Мещеряков С.В. Перспективность применения гуминовых веществ в технологиях очистки нефтезагрязненных почв. // Экология и промышленность России. 2016. Том 20. № 1. С. 30–36.
4. Бойкова О.И., Волкова Е.М. Химические и биологические свойства торфов Тульской области // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2013. № 3. С. 253–264.
5. Нечаева И.А. Биодеградация углеводородов нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами: дисс… канд. биол. наук. Пущино, 2009. 175 с.
6. Дмитриева Е.Д., Леонтьева М.М., Сюндюкова К.В. Молекулярно-массовое распределение гуминовых веществ и гиматомелановых кислот торфов различного генезиса Тульской области. // Химия растительного сырья. 2017. № 4. С. 187–194.
7. MuryginaV. P., Arinbasarov M., Kalyuzhnyi S. Bioremediaton of oil polluted aquatic systems and soils with the novel preparation “Rhoder” // Biodegradiation 11. 2000. P. 385–389.
8. Гречищева Н.Ю., Щукина В.Д., Холодов В.А., Лазарева Е.В., Парфенова А.М., Мещеряков С.В., Перминова И.В. Оценка способности гуминово-глинистых комплексов стабилизировать эмульсии нефти в воде. // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2014. №. 9. С. 51–55.

УДК 674:667.621/67.08

НОВЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ЦЕЛЕВОЙ ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНОЙ МОДИФИКАЦИИ ДРЕВЕСИНЫ

А.Б. Дягилева, А.И. Смирнова

Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия

Экологичные товары и спрос на них на рынке в последние десятилетия приобретают все более широкое распространение в мире. Несмотря на повышенный интерес экологически ориентированного потребителя, который интересуется экологической политикой компаний и производимыми ими товарами, сегодня он не всегда может получить подтверждение соответствия «зеленой» продукции и «зеленых» технологий. Причем подтверждение этого соответствия [1] остается не обязательным актом и осуществляется производителями исключительно в форме добровольной сертификации, которую осуществляют аккредитованные органы только в рамках зарегистрированных в установленном порядке систем добровольной сертификации, в правилах функционирования которых предусмотрена сертификация по требованиям «зеленых» стандартов.

Основная работа по подготовке материала к сертификации лежит на плечах предприятия, осуществляющего хозяйственную деятельность, имеющую отношение к любым этапам создания «зеленой» продукции. Экологически ориентированный бизнес часто испытывает дефицит в объективной информации для применения композиций нового поколения, полученных в результате инновационных исследований, которые способны улучшить качество материала, не меняя его естественные экологически значимые параметры.

Экологичность товара в рыночной экономике является привлекательным маркетинговым ходом, однако современный потребитель уже не верит так называемым «зеленым меткам», хотя на первом этапе они позволяют сделать выбор. Сегодня повсеместно состав и способ производства определяют спрос, а наличие достоверной информации о конечном продукте – его продвижение.

Экологически чистым материалом в представлении большинства потребителей остается древесина, которая без химической обработки обладает такими свойствами, как прочность, сопротивляемость статическим и динамическим нагрузкам, податливость к механической обработке. К основным достоинствам древесины, как строительного материала, следует отнести ее малую теплопроводность (0,16–0,30 Вт/м·К), сопряженную с высокой пористостью (до 80 %) этого материала. Также необходимо обратить внимание на способность древесины поддерживать оптимальную влажность в помещении на уровне 45–57 %, что создает комфортные условия для проживания человека при использовании этого материала.

Однако главными проблемами при использовании древесины для различных целей являются ее гигроскопичность, анизотропность, высокая пожарная опасность и биодеградация. Для устранения данных недостатков принято обрабатывать поверхность материалов растительного происхождения различными защитными растворами, которые часто переводят первоначальный материал в более высокий класс опасности в виде конечного продукта, и, таким образом, снижают экологическую ценность исходного материала. В качестве химической защиты древесины принято использовать лаки, эмали, краски, пасты, которые содержат в своем составе модифицирующие добавки для придания поверхности каких-либо свойств, связующие синтетические вещества, а также водные растворы антипиренов.

Ряд свойств и механизмы действия применяемых промышленных антипиренов, состоящих из галогенсодержащих соединений, соединений фосфора, азота, ряда неорганических соединений, составы которых способны замедлять горение, систематизированы в работе [2].

В состав антипиренов, как правило, входят компоненты, негативно влияющие на здоровье людей, такие как галоген-, фосфорорганических добавки, тяжелые металлы и другие токсичные примеси. Основной причиной запрета целого класса галогенсодержащих антипиренов в странах ЕС, в том числе в Германии [3], является выделение опасных продуктов в окружающую среду при их применении. К их числу относятся реагенты, в состав которых входят производные бромированного дифенилоксида, так как материалы, обработанные композициями на их основе в процессе горения и переработки, выделяют высокотоксичные и канцерогенные бромированные диоксины и фураны.

Традиционно при производстве древесных плит, которые активно используются для производства мебели, применяются синтетические связующие на основе разных смол и клеевых составов на их основе. Хорошо известно, что синтетические связующие, как в процессе производства, так и при эксплуатации изделий на их основе, выделяют химические вредные вещества, такие как фенол, фенолформальдегид, аммиак и другие, которые негативно влияют на здоровье человека, особенно на детей. Однако современные требования безопасности к мебельной продукции [4] полного перечня вредных веществ не приводят, что является фактом не раскрытия полной информации об опасности данной продукции. К сожалению, в научной литературе также отсутствует исчерпывающая информация [5] о кумулятивном влиянии на человека нескольких вредных химических веществ, выделяющихся при эксплуатации древесных материалов, подготовленных и обработанных синтетическими веществами. Поэтому проблема создания современных эффективных экологически безопасных связующих и средств защиты древесины до сих пор сохраняет свою актуальность.

Появление на рынке новых и вместе с тем экологически безопасных реагентов, которые могли бы заменить традиционные антипирены, закономерный процесс. Развитие золь-гель технологий позволяют получать нанокомпозиты на основе слоистых силикатов, прекурсоров керамики и низкоплавких стекол. Интумесцентные (вспучивающиеся) системы или органические коксообразователи представляют определенный интерес для обеспечения пожаробезопасности древесных конструкций. Особым направлением исследований и разработки технологий по получению эко-антипиренов можно рассматривать золь-гель синтез новых композиций на основе производных из возобновляемого природного сырья (например, лигнина, полисахаров (крахмала) [6] и отходов минерального происхождения, которые относятся к 4 -5 классам опасности).

Использование отходов или побочных продуктов биохимической переработки растительной биомассы в производстве защитных композиций для обработки деревянных конструкций является приоритетным направлением в «зеленых» технологиях. Во-первых, это решает задачу по снижению специфических отходов биохимических производств. Во-вторых, вещества, выделенные в результате химической обработки древесины (например, на стадии делигнификации) и введенные в композиции для получения эко-антипиренов, обеспечивают специфическое взаимодействие композиции с деревянной поверхностью. Механизм действия композиций на основе производных лигнина при температурной нагрузке на обработанную поверхность основан на поверхностном коксообразовании за счет реакций твердофазного ингибирования процессов высокотемпературной деструкции целлюлозы затрудненными полифенолами, входящими в структуру лигнина, что можно рассматривать как позитивный эффект в сохранении исходного материала.

В качестве минеральной составляющей для новых композиций можно рассматривать различные алюмокремниевые отходы, которые также подлежат учету и являются эффективным вторичным сырьем для получения новых композиций целевого назначения. Данные технологии находятся в разработке и подлежат защите в виде интеллектуальной собственности. Важным условием при разработке технологии является то, что полученная композиция не должна содержать в своем составе тяжелых металлов и примесей вредных для здоровья человека веществ как при эксплуатации, так и при утилизации полученных материалов, что в полной мере отвечает требованиям «зеленых» технологий на современном рынке. В качестве основы для получения данных продуктов используется технология золь-гель модификации лигнина [7], которая позволяет получать новые продукты целевого назначения.

В гелевой композиции регулируется оптимальное соотношение активных компонентов как минеральной части, так и органической составляющей, которая формируется в виде водной дисперсии по оригинальной технологии. Введенная органическая составляющая способствует закреплению гелевой композиции на поверхности древесины при ее модификации. Причем при такой обработке материала не теряются, а в некоторых случаях усиливаются, дополнительные эстетически привлекаемые свойства отдельных пород древесины.

Подготовка образцов древесины при исследовании производилась в соответствии с ГОСТ Р 53292–2009, испытания проводили путем термического воздействия в муфельной печи с температурными режимами 250–270 °С. Образы подвергались воздействию определенной температуры в течение 20 минут, шаг по времени составлял 5 минут.

В качестве примера (рис. 1) представлены результаты многофакторного анализа поведения образцов модифицированной древесины лиственной породы с помощью новых гелевых композиций при повышенной температурной нагрузке в различном временном интервале.

В исследовании образцы подготавливались различными способами, в данном случае представлены результаты для образцов, подготовленных погружным способом обработки с помощью водных дисперсий гелевых композиции с различным содержанием алюминия и кремния в них. В состав водных дисперсий гелевой композиции входят: алюминий (Al) 0,035 – 0,07 мас. %, кремний (Si) 0,037 - 0,075 мас. % и лигнин (СЛ) 5 мас. %. Такая стадия обработки достаточно легко может быть совмещена с технологией подготовки материала в структуре древесно-подготовительных цехов предприятий переработки древесины.

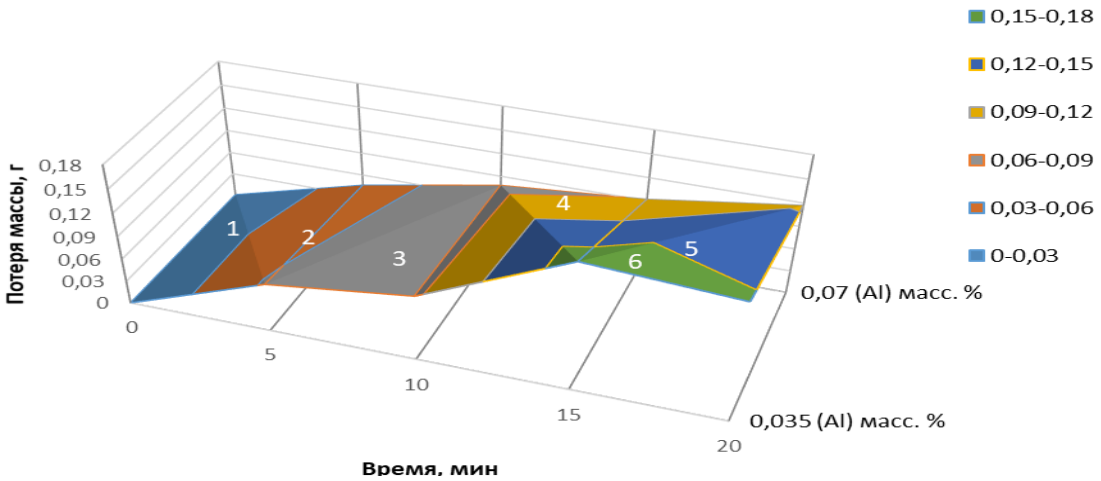


Рис. 1. Поверхность отклика потери массы от времени при тепловом воздействии (270 °С) на образцы лиственной породы древесины при подготовке их поверхности погружным способом в гелевые композиции

Образцы, обработанные водными гелевыми композициями, имеют неравномерную тенденцию к потере массы, что демонстрирует поверхность отклика в виде зон, выделенных на рисунке различным цветом, которые косвенным образом характеризуют специфическую устойчивость образцов к определенным тепловым нагрузкам во времени и от концентрации активных веществ в композиции при обработке. В интервале времени воздействия до 10 минут потеря массы образцов существенно не зависит от способа нанесения покрытия и концентрации минеральной составляющей в гелевой композиции (зоны 1–3). Эффект влияния концентрации минеральной составляющей композиции проявляется именно при более длительном воздействии, причем конфигурация зон приобретает четкую зависимость от концентрации минеральной составляющей в композиции: чем выше концентрация активных веществ в композиции, тем меньше потери массы образцов при тепловой нагрузки на них (зона 4). Это может быть связано с образованием на поверхности и в верхних слоях древесины дополнительного защитного слоя из гелевой структуры, которая за счет проникновения и закрепления минеральной гелевой составляющей препятствует быстрой деструкции композиционный структуры исходной древесины и, таким образом, способствует сохранению массы образцов, что может свидетельствовать о более высокой пожароустойчивой способности модифицированной древесины.

ЛИТЕРАТУРА

1. ПНСТ 329–2018 "Зеленые" стандарты. "Зеленая" продукция и "зеленые" технологии. Оценка соответствия по требованиям "зеленых" стандартов // Общие положения (Источник: ИИС «ТЕХЭКСПЕРТ»). М.: Стандартинформ, 2019
2. Смирнова А.И., Дягилева А.Б. Обеспечение экологической безопасности при обработке древесины новыми защитными растворами/В сборнике: Актуальные проблемы науки и техники. Инноватика.. Уфа, 2020 с. 32–37.
3. Варфоломеев, С. Антипирены: российский период [Текст]/ С. Варфоломеев, С. Ломакин, П. Сахаров П. // The Chemical Journal. Январь-февраль 2010. С. 42–45.
4. ТР ТС 025/2012 Технический регламент таможенного союза «О безопасности мебельной продукции» [Текст] // URL: http://docs.cntd.ru/document/902352816
5. Кислый, В. Нормативное обеспечение экологической безопасности древесных плит [Текст] /В. Кислый // ЛесПромИнформ: электрон. науч. журнал. 2017. № 6. С .98–102. URL: https://lesprominform.ru/media/ protected/journals pdf/1426/lesprominform 128.pdf (дата обращения 30.07.2020).
6. Смирнова, А.И. Механизм формирования органоминеральных структур на основе сульфатного лигнина и алюмосодержащих компонентов [Текст] // ИВУЗ. Лесной журнал. – 2011. – № 6. – С. 112–118.
7. Пат. на изобретение RU 2658907 C2. 26.06.2018 Заявка № 2016108476 от. 10.03.2016 Способ модификации лигнина путем золь-гель синтеза с минеральными компонентами Дягилева А.Б., Смирнова А.И., Присмакова А.Е., Дягилева Д.В.

УДК 663.48

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИВНОЙ ДРОБИНЫ В КАЧЕСТВЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО ЭНЕРГОНОСИТЕЛЯ НА ПИВОВАРЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЯХ

В.В. Житков, Б.Н. Федоренко

Московский Государственный Университет Пищевых Производств, Москва, Россия

В настоящее время одной из базовых задач практически всех отраслей мировой экономики является масштабное внедрение «зеленых» технологий, позволяющих развивать ответственный подход к экологии производства. В случае когда удается использовать эти экологичные производственные решения и подходы еще и для целей повышения внутренней рентабельности производства и утилизации производственных отходов создается синергетический эффект от их внедрения. Переход к ресурсосберегающим технологиям, обеспечивающим безотходное производство, использование отходов основного производства в качестве вторичного сырья являются необходимыми мерами, особенно актуальными и в пищевой промышленности [1].

Одним из основных проблемных отходов в пивоваренной промышленности является пивоваренная дробина (зерновой отход). Доля дробины в общей массе отходов пивоварни доходит до 80 %. Ежегодно 1 пивоваренный завод средней мощности производит в качестве отхода до 30000 – 40000 тонн пивной дробины, и таких заводов на территории РФ – более 350.

В настоящее время основная масса дробины утилизируется абсолютно не эффективно. В лучшем случае из нее производятся корма для сельскохозяйственных животных, в худшем случае захораниваются на полигонах. А меж тем дробина является ценнейшим компонентом, который при должном подходе может быть использован на благо самих пивоваренных предприятий [2].

Пока еще очень медленно, во всем мире начинаются процессы вовлечения пивной дробины в процессы «biomass-to-energy». Одним из самых перспективных методов является анаэробное сбраживание дробины с получением биогаза и последующее использование его в когенерационных установках. Дробина является достаточно специфическим сырьем, требующим особенного подходя к этому процессу. Основная задача состоит в создании оптимального процесса переработки дробины с максимальным выходом целевого продукта, минимальной себестоимостью и применимостью в различных регионах России. На базе МГУПП» под научным руководством Б.Н. Федоренко разрабатывается метод интенсификации процесса переработки пивоваренной дробины посредством оптимизации температурных режимов и воздействия ультразвуковых волн. Разработанная и протестированная методика позволяет однозначно полагать, что использование дробины в качестве альтернативного энергоносителя для пивоваренных производств может быть достаточно эффективным.

Отходом такого биогазового производства является сброженный субстрат, который так же является ценным продуктом – биоудобрением) [3].

Подобный комплексный подход позволяет вывести дробину из категории отходов производства и считать ее ценным дополнительным ресурсом для практически любого пивоваренного производства.

ЛИТЕРАТУРА

1 Сатьянов С.В. Повышение эффективности биоустановок путем получения альтернативной энергии и биоудобрений: дис… канд. тех. наук: 05.20.01. – М., 2011. – 158 с. – 04201158468

2. Койбагаров С.Х., Толеуов С.Е., Зарыкбаева К.С. Биогазовые установки. Перспективы и развитие: Аналитический обзор. – Усть-Каменогорск.: ВКФ «НЦНТИ», 2013. – 66 с.

3. Wellinger A., Murphy J. The biogas handbook. Woodhead Publishing Limited, 2013. – 512 p.

УДК 546.22/24; 579.66

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА КАДМИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ

О.А. Журавлева[1,2], Е.И. Кожухова[1,3], Т.А. Воейкова[1,2], Кулигин В.С.[1,2], В.Г. Дебабов[1,2]

[1] НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия
[2] НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия
[3] НИЦ «Курчатовский институт» – ИРЕА, Москва, Россия

В настоящее время большой интерес представляет получение и изучение перспективных по своим оптоэлектронным, структурно-морфологическим и химическим характеристикам квантовых точек (КТ) халькогенидов металлов, в том числе, полупроводниковых наночастиц сульфида кадмия (NPsCdS). КТ NPsCdS находят применение в области создания солнечных батарей, светодиодов, фотокатализаторов для разложения органических красителей в очистке загрязненных сточных вод, в качестве флуорофоров для биомедицинских целей [1]. Однако промышленные способы синтеза NPsCdS зачастую энергоемкие, технологически сложные и требуют использования химических реактивов, длительное воздействие которых токсично для окружающей среды и здоровья людей. В качестве экологически безопасного, простого и эффективного подхода рассматривают «зеленый» синтез с участием различных видов микроорганизмов и других биообъектов, чьи активные восстановительные и стабилизирующие агенты способствуют образованию стабильных в водных растворах биогенных наночастиц, сравнимых по своим свойствам с промышленными аналогами [2].

Нами предложен методологически простой синтез NPsCdS с использованием бактерий *S. oneidensis* MR-1 (№ В-9861) и *B. subtilis* 168 (№ В-7360), проводимый аэробно при нормальном давлении и температуре, оптимальной для роста штаммов. Непосредственное введение водных растворов солей Na_2 S×$9H_2$ O и $CdCl_2$×$2,5H_2$ O в культуральную жидкость, обогащенную бактериальными клетками и метаболитами, и изменение процедуры фильтрации реакционной смеси, содержащей биогенные NPsCdS, привело к увеличению их концентрации в водной суспензии до 7–8 мг/мл, повышению выхода на 15–20 % с сохранением характеристик наночастиц, что свидетельствует об успешной оптимизации процесса. Доказана целесообразность применения центрифугирования и УЗ-обработки суспензий NPsCdS как способов повышения монодисперсности коллоидных систем.

Показано, что вне зависимости от применяемого штамма, водные суспензии NPsCdS характеризуются как метастабильные, при этом наночастицы имеют отрицательный заряд поверхности, сферическую форму, размер 5±1 нм и флуоресцируют в синей области спектра. Доказано влияние видов бактерий на формирование и состав белкового покрытия NPsCdS, а также зависящие от него электрофоретические характеристики – индекс полидисперсности, величину гидродинамического диаметра и ζ-потенциала. Обнаружена зависимость уровня интенсивности флуоресценции NPsCdS от *S. oneidensis* и *B. subtilis*, однако на другие оптические свойства биогенных наночастиц – спектры поглощения и длину волны пика флуоресценции – влияние штаммов не выявлено.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–04–00088. Бактериальные штаммы предоставлены НБЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chandan H.R, Schiffman J.D., Balakrishna R.G. Quantum Dots as Fluorescent Probes: Synthesis, Surface Chemistry, Energy Transfer Mechanisms, and Applications // Sensors and Actuators B: Chemical. 2017. V. 258. P. 1191–1214. DOI 10.1016/j.snb.2017.11.189.
2. Gahlawat G., Choudhury A.R. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes // RSC Adv. 2019. V. 9. P. 12944–12967. DOI 10.1039/C8RA10483B.

Актуальная биотехнология
№3 (34), 2020
УДК 577.112

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛЕКТИНОВ БАКТЕРИЙ

А.В. Кобелев, С.В. Клементьев, Т.В. Вдовина, А.С. Сироткин

Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия

Традиционно в качестве объектов для обнаружения лектинов используют клетки крови – эритроциты человека или животных. Однако, ввиду того, что получение клеток крови довольно затратно, и эритроциты могут сохранять активность ограниченное время, вызывает особый интерес возможность использования в качестве объектов агглютинации клеток бактерий, дрожжей и микроводорослей.

Цель работы – определение активности внеклеточных лектинов бактерий с использованием в качестве объектов агглютинации клеток микроорганизмов.

В работе использовались культуры аэробных гетеротрофных бактерий *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens*, р. *Acinetobacter*, накопительные культуры нитрификаторов I и II фазы, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, микроводоросли р. *Chlorella* из коллекции микроорганизмов кафедры промышленной биотехнологии Казанского национального исследовательского технологического университета.

Периодическое культивирование микроорганизмов проводили в аэробных условиях и постоянном перемешивании при температуре 37 °С (для гетеротрофных бактерий), 25 °С (для нитрификаторов I и II фазы, дрожжей и микроводорослей) в течение 18 часов (для гетеротрофных бактерий и дрожжей) и 14 суток (для нитрификаторов I и II фазы и микроводорослей). В качестве питательных сред использовали мясопептонный бульон (для гетеротрофных бактерий), среду Виноградского (для нитрификаторов I и II фазы), среду Сабуро (для дрожжей), среду Тамия (для микроводорослей).

Полученные суспензии микроорганизмов центрифугировали в течение 10 минут при 8000 об/мин в случае бактерий и дрожжей; при 2000 об/мин – для суспензии микроводорослей. Клетки микроорганизмов, осажденные центрифугированием, трижды отмывали в 1 % фосфатном буфере при 8000 об/мин в течение 10 минут, а затем доводили до 2 %-й суспензии клеток.

Из образцов культуральных жидкостей получали нативные растворы путем трехкратного центрифугирования при 10000 об/мин в течение 30 минут.

Для определения активности внеклеточных лектинов в нативных растворах использовали реакцию агглютинации на планшетах, помещая во всевозможных вариациях исследуемые клетки микроорганизмов в образцы нативных растворов. Расчет результатов проводили по формуле: $RA=2^{n-1}$, где: RA – агглютинирующая активность (титр, единиц), n – разведение (лунка), при которой наблюдается агглютинация клеток микроорганизмов.

Было показано, что культуральная жидкость (нативный раствор) *Bacillus subtilis* обладает наиболее высокой активностью внеклеточных лектинов и способна вызывать агглютинацию клеток *Escherichia coli* (титр RA = 4 ед.), *Pseudomonas fluorescens* (титр RA = 2 ед.), р. *Acinetobacter* (титр RA = 4 ед.), *р. Chlorella* (титр RA = 2 ед.).

Культуральная жидкость (нативный раствор) *Pseudomonas fluorescens* проявляла высокую лектиновую активность (титр RA = 4 ед.), однако лишь в случае агглютинации клеток р. *Acinetobacter*. Лектины *Escherichia coli* показали слабую способность вызывать агглютинацию (титр RA = 2 ед.) бактериальных клеток *Pseudomonas fluorescens* и р. *Acinetobacter.* Способность к агглютинации у лектинов р. *Acinetobacter* наблюдалась для клеток *Pseudomonas fluorescens* (титр RA = 2 ед.) и *р. Chlorella* (титр RA = 4 ед.).

Культуральная жидкость (нативный раствор) нитрификаторов I и II фазы была исследована на способность к агглютинации бактериальных клеток, обладающих наибольшей способностью к агглютинации – р. *Acinetobacter* и *Pseudomonas fluorescens*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что внеклеточные лектины нитрификаторов I и II фазы способны агглютинировать лишь бактериальные клетки р. *Acinetobacter* (титр RA= 4 и 2 ед.), соответственно.

Кроме того, в ходе экспериментальных исследований выявлено, что ни одна из исследуемых культуральных жидкостей, как источник внеклеточных лектинов, не была способна агглютинировать клетки дрожжей.

УДК 504.06+577.1+574+663.1

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД С РЕГУЛИРУЕМЫМ ОКСИДАТИВНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ (РОВ-ТЕХНОЛОГИЯ)

А.Е. Кузнецов[1], А.В. Мелиоранский[2]

[1] Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия
[2] ООО ТДС, Москва, Россия

По перерабатываемым потокам и распространенности биологическая очистка сточных вод является самой крупнотоннажной технологией в мире.

В настоящее время отечественные нормативы к очистке воды по сравнению со странами Европы намного более строгие. Например, по российским стандартам годной для сброса в водоемы рыбохозяйственного назначения считается вода с уровнем ХПК 15 мг/л (в Западной Европе 125 мг/л), уровнем $БПК_5$ 6 мг/л (в Западной Европе 20 мг/л), NH_4+ 0,5 мг/л (в Западной Европе 10 мг/л), PO_4^3 – 0,2 мг/л (в Западной Европе 1 мг/л). Поддержание таких стандартов требует постройки высокоэффективных многоступенчатых очистных сооружений, следовательно – высоких затрат на очистку стоков, поэтому если имеется возможность снизить требования к качеству очищенной воды, выбирают оптимальную степень очистки. По российским же нормам одновременно обеспечивать высокие стандарты очистки и внедрять ресурсосберегающие недорогие технологии тем более сложно. Требуется существенная модернизация существующих методов или внедрение принципиально новых решений.

В России с 1 января 2016 года вступило в действие постановление Министерства природных ресурсов и экологии РФ, вынуждающее налоговыми мерами переход действующих предприятий к наилучшим доступным технологиям [1, 2].

Надо отметить, что в настоящее время в отечественной практике при уровне ХПК в воде на входе в очистные сооружения не выше 1000–2000 мг/л используются, как правило, одноступенчатые или многоступенчатые системы биологической очистки на основе аэротенков классического типа или их модификаций. При этом в одностадийном аэробном процессе удается снизить содержание загрязнений на выходе лишь до 60–100 мг/л (по ХПК), что в 3–5 раз выше российских природоохранных требований. Поэтому сточную воду приходится разгружать в городскую канализацию на общегородские очистные сооружения либо в естественные или искусственные системы доочистки по установленным региональным нормам и лимитам сброса. Использование же дополнительных систем доочистки сточных вод или увеличение объемов сооружений ведет к росту капитальных и операционных затрат, территории, занятой под водоочистку. При повышении степени очистки с 85 до 95 % расходы возрастают в 2–3 раза, а свыше 95 % – примерно в 10 раз на каждый дополнительный процент повышения степени очистки [1]. Поэтому попытки «сочетать несочетаемое» – одновременно обеспечить высокую производительность, экологическую эффективность и высокое качество очистки сточных вод путем использования реакторов современных конструкций, в частности, зонированных аэротенков, биореакторов с гранулированным илом, с биопленкой, совмещения микробиологического процесса с мембранным разделением в мембранных реакторах, без отвода избыточного активного ила из очистных сооружений [3] обеспечивается высокой ценой и нерациональным расходыванием средств.

В течение длительного времени на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева велись экспериментальные исследования по совершенствованию технологий биологической очистки сточных вод на основе следующих подходов:

– сочетание по месту и времени абиотических и биотических процессов трансформации веществ в единой экологической нише, как это часто наблюдается в природных экосистемах;

– моделирование и воспроизведение природных процессов самоочищения, особенно важных для устойчивого функционирования замкнутых экосистем;

– учет и управление стрессорными воздействиями на популяции микроценозов очистных систем, сочетание и совместное действие стрессорных и антистрессорных факторов, факторов с прооксидантной и антиоксидантной активностями при воздействии на микроценозы [4, 5].

В наиболее яркой форме такие условия в природе наблюдаются в тонком поверхностном слое почвы или воды, в эпифитной зоне растений, где одновременно бурно развивается жизнь, наблюдается химическая и фотохимическая трансформация и деградация различных веществ [6–10]. Процессы самоочищения в замкнутых водоемах и других природных средах часто протекают при совместном действия биоты, химически-активных частиц, активных форм кислорода – АФК (каталитически активных, радикальных, H_2 O_2 и др.), ионов железа, марганца и др. Так, АФК постоянно присутствуют в воде и образуются в результате реакций каталитического инициирования, растворения активных газов из атмосферы, радиационно-химического инициирования, кавитационных эффектов, фотохимического инициирования, биологической эмиссии. Ведущая роль в этих процессах принадлежит каталитическому и фотохимическому инициированию, а также генерированию радикалов за счет биологической эмиссии [6, 7].

При исследовании в лабораторных условиях на кафедре биотехнологии РХТУ было показано, что использование вышеупомянутых подходов применительно к процессам микробиологического синтеза различных веществ и биодеструкции органических загрязнений позволяет в ряде случаев существенно улучшить целевые выходные технологические показатели. Так, при совместном одновременном воздействии микробиологических и малых доз химических и фотохимических факторов (активных форм кислорода или УФА-излучения в сочетании с видимым светом низкой интенсивности) при биологической очистке сточных вод возможно снижение количества остаточных загрязнений в сточных водах в 1,5–3 раза, при этом повышается качество активного ила и очистки, можно снизить затраты на удаление поллютанта по сравнению с использованием только химических или фотохимических методов.

Основываясь на полученных экспериментальных данных по биологической очистке сточных вод с использованием совместного воздействия источника АФК (РОВ-активатора) и видимого света, названной нами РОВ-технология, с февраля 2020 г. при поддержке фирмы ТДС, Министерства ЖКХ Московской области, администраций ряда районов и городских округов Московской области и обслуживающего персонала очистных сооружений были проведены испытания предложенной технологии на действующих очистных сооружениях при очистке хозяйственно-бытовых стоков. На двух объектах испытания завершены, на других объектах – продолжаются.

Первые два объекта:

1. Поселковые очистные сооружения, включающие аэротенк смешения с вторичным отстойником и рециклом активного ила с объемом поступающих сточных вод 200 $м^3$/сут. с временем пребывания воды в очистных сооружениях – 15–23 час, средним содержанием загрязнений во входном потоке в период испытаний: взвешенные вещества – 257 мг/л; ХПК – 609 мг/л, аммонийный азот – 19,4 мг/л, азот нитратов – 0,3 мг/л, фосфор фосфатов – 4,3 мг/л.

2. Городские очистные сооружения, включающие аэротенк вытеснитель с вторичным отстойником с рециклом активного ила, работающий в режиме полной нитрификации с объемом поступающих сточных вод около 20 тыс. $м^3$/сут. с временем пребывания воды в очистных сооружениях – 12 час и содержащих на входе: ХПК – около 100 мг/л, аммонийного азота – около 20 мг/л, фосфора фосфатов – около 10 мг/л, т. е. избыточное количество неорганического азота и фосфора по отношению к величине ХПК.

На рис. 1 представлены изменения содержания взвешенных веществ и ХПК на выходе из очистных сооружений в ходе проведения испытаний на поселковых очистных сооружениях, а в табл. 1 – результаты испытаний в обобщенном виде.

Из рис. 1 видно, что внесение РОВ-активатора с постепенным увеличением суточной дозы приводит к адаптации активного ила к оксидативному воздействию реагента. После адаптации ила внесение активатора в дозах 12 л/сут (в пересчете на активное вещество – 4 г/$м^3$.сут), приводит к снижению показателя ХПК в выходной воде до недетектируемых величин (менее 10 мг/л), т. е. до значений, близких к нулю. Эффект снижения ХПК до минимально возможных значений был стабилен и наблюдался на протяжении более чем 30 суток, когда активатор вносился в оптимальных дозах.

Одновременно наблюдалось повышение скорости и степени нитрификации и денитрификации, снижение содержания фосфатов в выходящей воде, а также возрастание удельной активности ила по удалению соединений азота и фосфатов из сточной воды. При прекращении внесения активатора показатели биологической очистки возвращались к величинам, наблюдавшимся до его внесения.

Испытания на поселковых очистных сооружениях показали, что внесение реагента в оптимальных дозах приводит к снижению остаточного содержания загрязнений в выходящей сточной воде: по ХПК – оценочно в 8–10 раз, по фосфатам – в 1,3–1,5 раз с одновременным повышением нитрифицирующей и денитрифицирующей активностей в 1,1–1,3 раз, возрастанием скорости денитрификации, удельной активности ила по удалению соединений азота и фосфатов из сточной воды.

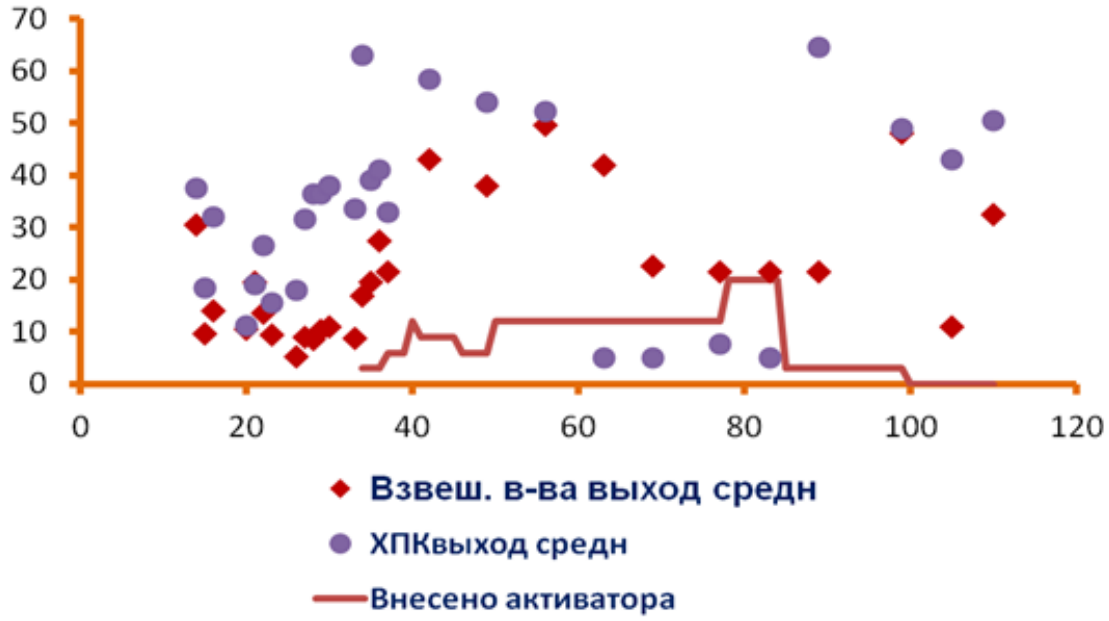


Рисунок 1 – Изменение во времени содержания взвешенных веществ и ХПК на выходе из очистных сооружений.

Таким образом, применительно к поселковым сооружениям биологической очистки сточных вод проведенные испытания технологии очистки хозяйственно-бытовых стоков с регулируемым оксидативным воздействием (РОВ-технологии) показали высокую эффективность в отношении удаления органических загрязнений с возможностью достижения степени очистки в одностадийном процессе по показателю ХПК 99,2 %, что обеспечивает абсолютные значения ХПК в очищенной воде близкие к нулю с одновременным повышением степени удаления биогенных элементов из сточных вод.

Таблица 1 – Усредненные показатели очистки на выходе из очистных сооружений

Вариант	$ВВ_{вых}$	$ХПК_{вых}$	$N\text{-}NH_{4вых}$	$N\text{-}NO_{3вых}$	$P\text{-}PO_{4вых}$	Уд. акт-ть ила по удалению $N\text{-}NH_{4вых}$	Уд. акт-ть ила по нитрификации $N\text{-}NO_{3вых}$	Уд. акт-ть ила по дефосфатации $P\text{-}PO_{4вых}$
Без активатора, среднее, мг/л	28,3	51,8	7,9	7,9	2,2	3,6	7,7	0,5
С активатором, среднее, мг/л	26,9	**5,7**	**6,0**	**10,8**	**1,6**	**5,2**	**10,5**	**1,1**

Испытания на городских очистных сооружениях подтвердили ускорение скорости нитрификации и денитрифакации, возможность снижения содержания взвешенных веществ на выходе из очистных сооружений, длительность (около двух месяцев) функционирования сооружений без сброса избыточного активного ила (т. е. в режиме самоокисления). В то же время снижения величины выходного ХПК до уровней ниже 10 мг/л не наблюдалось, возможно по причине внесения недостаточного количества РОВ-активатора (не более 2 г/м^3).

На основании полученных данных были оценены операционные затраты на реализацию предлагаемого метода очистки сточных вод в промышленных масштабах. В зависимости от варианта исполнения они составят от 0,8 до 1,2 руб./м^3 очищаемой воды, или 23–30 % от затрат на электроэнергию при использовании наиболее экономичных аэраторов, однако при этом качество очистки сточных вод по показателю ХПК повысится от 1,5 до 3 раз без ухудшения других показателей очистки, без падения скорости биологического окисления и окислительной мощности сооружений. Расчеты показывают, что при действующей в настоящее время схеме начисления экологических платежей за сверхнормативные сбросы затраты на РОВ технологию компенсируются при снижении показателей по $ХПК_{вых}$ на 20–30 мг/л. В другом варианте реализация РОВ-технологии обеспечит одно и то же качество очистки при повышении нагрузки и окислительной мощности сооружений биологической очистки в 1,5–2 раза, снижении площадей, занимаемых новыми вводимыми в эксплуатацию очистными сооружениями, а также снижении совокупных операционных и капитальных затрат на 10–15 % при одном и том же качестве очистки.

Разработанный подход универсален в отношении биоценозов очистных сооружений и удаляемых органических биодоступных загрязнений, обладает патентной чистотой, не имеет мировых аналогов. Однако в каждом конкретном случае необходимо учитывать зависимость положительных эффектов от типа сооружений, конструкции и режима течения воды в аэротенках, плотности популяции активного ила, оптимального физиологического состояния, фазы роста микроорганизмов, дозы стрессоров и антистрессоров, концентрации субстрата, условий аэрации, циклов адаптации микроорганизмов к воздействию стрессора. Применительно к очистке сточных вод обнаруженные эффекты позволяют вести разработку как высокопроизводительных малосточных систем аэробной очистки и биологической переработки высококонцентрированных стоков с повышением компактности очистных реакторов в несколько раз, так и совершенствовать традиционные технологии биологической очистки на основе активных илов и биопленок очистных биореакторов (аэротенков, биотенков, биофильтров и др.) со снижением количеств остаточных загрязнений в потоке сточной воды на выходе в 2–3 раза, избыточного ила, биогенных элементов, устранением проблемы вспухаемости ила, при высокой устойчивости к перерывам в подаче субстрата, к лимитированию биоокисления кислородом, компонентами питания, при снижении площадей, занимаемых новыми вводимыми в эксплуатацию очистными сооружениями, а также эксплуатационных и капитальных затрат.

Реализация предложенных решений в промышленных условиях не потребует больших затрат и существенной модернизации биореакторов или очистных сооружений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Информационно-технический справочник по наилучшим доступным технологиям. ИТС 10–2019. Очистка сточных вод с использованием централизованных систем водоотведения поселений, городских округов. – М.: Бюро НДТ Федерального Агентства по техническому регулированию и метрологии, 2019. – 434 с.
2. Информационно-технический справочник по наилучшим доступным технологиям. ИТС 8–2015. Очистка сточных вод при производстве продукции (товаров), выполнении работ и оказании услуг на крупных предприятиях. – М.: Бюро НДТ Федерального Агентства по техническому регулированию и метрологии, 2015. – 129 с.
3. Кузнецов А.Е. Прикладная экобиотехнология / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градова, С.В. Лушников и др. // Учебное пособие: в 2 тт. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – т. 1–629 с., т 2 – 485 с. Переиздание 2012, 2015 гг.
4. Oxidants and Antioxidants: Ultrastructure and Molecular Biology Protocols / Edited by: D. Armstrong // Methods in Molecular Biology, vol. 196: Humana Press Inc., Totowa, NJ. – 2002. – 356 p.
5. Denisov E.T. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology / E.T. Denisov, I.B. Afanas'ev. – 2005. – 992 p. – URL: http://www.tryphonov.ru/tryphonov/donat.htm
6. Скурлатов Ю.И., Дука Г.Г., Мизити А. Введение в экологическую химию – М.: Высш. шк., 1994. – 400 с.
7. Богдановский Г.А. Химическая экология. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 273 с.
8. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. – М. Мир, 2006. – 504 с.
9. Bioavailability of organic xenobiotics in the Environment. Practical consequences for the Environment. // In Proceedings of the Meeting on Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment. Prague, 18–29 August, 1997 / Eds. Ph. Baveye, J. – C. Block, V.V. Goncharuk. – NATO Advanced Study Institute, Series 2: Environment. – Kluwer Academic Publishers, 1999. – 64. – 503 p.
10. Синельников В.Е. Механизм самоочищения водоемов. – М.: Стройиздат, 1980. – 112 с.

УДК 579.66

ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА КАДМИЯ НА МОДЕЛИ ОБЕСЦВЕЧИВАНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

В.С. Кулигин[1,2], О.А. Журавлева[1,2], Т.А Воейкова[1,2], В.Г. Дебабов[1,2]

[1] НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия
[2] НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия

Во всем мире значительные объемы промышленных сточных вод, содержащих органические загрязняющие вещества, сбрасываются в окружающую среду. Отмечается, что даже малые концентрации красителей, таких как метиленовый синий (МС), оказывают токсичное воздействие на все виды живых организмов. Данные красители устойчивы к биодеградации и периоды их полураспада под воздействием солнечного света превышают 2000 ч.

В настоящее время все большее развитие получает фотокаталитическая деградация загрязняющих веществ под действием УФ излучения в присутствии наночастиц (НЧ). Выбор в пользу нанообъектов объясняется их более высоким соотношением поверхности к объему и, как следствие, большей площадью контакта фотокаталитической реакции по сравнению с поликристаллическими материалами. Механизм фотокатализа исследован, в частности, на примере полупроводниковых НЧ сульфида кадмия (NPsCdS). Биогенные NPsCdS, полученные простым и дешевым методом микробного синтеза, могут быть использованы в фотокатализе наряду с НЧ CdS, полученными традиционными физико-химическими способами.

Для биосинтеза NPsCdS был использован бактериальный штамм B. subtilis 168 (№ В-7360) из Национального биоресурсного центра ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика. НЧ получали из культуральной жидкости штамма в присутствии Na_2 S×9H_2 O и $CdCl_2$×2,5H_2 O в соответствии с ранее опубликованной нами методикой биосинтеза НЧ сульфидов металлов [1]. Растворы МС различных концентраций готовили с использованием деионизированной воды Milli Q. В раствор МС вносили NPsCdS до достижения искомой концентрации. Полученную смесь в чашках Петри облучали в течение 3 ч УФ-светом лампы Вуда (ОЛДД-1, Россия) мощностью 9 Вт и длиной волны 365 нм, установленной на высоте 30 см от объекта. Контрольные образцы раствора МС не содержали NPsCdS и были облучены УФ-светом в том же режиме.

Показано влияние концентрации МС (25 ppm и 50 ppm) на эффективность обесцвечивания (ЭО) раствора красителя при концентрации NPsCdS, составляющей 0,7 мг/мл. ЭО растворов МС 25 ppm и 50 ppm составляла 17,8±0,4 % и 14,6±0,4 %, соответственно. Установлено, что реальная доля красителя, которая обесцвечивается в результате фотокаталитического процесса, в 1,66 раз больше при концентрации МС 50 ppm, чем при 25 ppm. Таким образом, увеличение концентрации МС приводит к разложению большего количества красителя, однако нет прямой корреляции между концентрацией МС и ЭО раствора МС. Продемонстрировано влияние концентрации NPsCdS – 0,7; 0,35; 0,17 мг/мл на ЭО раствора МС, составляющее 13,3±0,3 %; 7,8±0,7 %; 5,8±0,3 %, соответственно. Такой результат может быть объяснен увеличением количества реакционных центров и образованием большего количества свободных радикалов при повышении концентрации наночастиц.

Установлено, что при увеличении толщины слоя раствора МС, в отсутствие НЧ происходит уменьшение интенсивности УФ-света вследствие поглощения молекулами МС, при этом процент деградации красителя снижается. Наличие НЧ в исследуемой концентрации в растворе МС не приводит к дополнительному ослаблению интенсивности УФ-света, фотокаталитическая активность NPsCdS одинакова в слоях различной величины.

Установлена фотостабильность NPsCdS и возможность трехкратного использования НЧ для деколоризации красителя, что является важным аспектом для практического применения фотонанокатализаторов биогенного происхождения в процессах очистки окрашенных производственных стоков воды.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–04–00088.

УДК 579.26 : 622.193.81

ЖЕЛЕЗООКИСЛЯЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ФАКТОР КОРРОЗИИ ГИДРОТЕХНИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

Г.Г. Няникова[1], К.К. Лебедева[1], И.М. Царовцева[2]

[1]Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия [2]АО «ВНИИ гидротехники им. Б.Е. Веденеева», Санкт-Петербург, Россия

Гидротехнические сооружения значительно подвержены коррозионным процессам, следствием которых является снижение их прочности и долговечности [1]. Железоокисляющие микроорганизмы вносят свой вклад в коррозию конструкционных материалов [2]. Механизм коррозии определяется совокупностью физико-химических и микробиологических процессов.

Целью данного исследования было выделение из проб воды и грунта, отобранных вблизи комплекса защитных сооружений (Балтийское море) и образцов конструкционных материалов, экспонированных в течение полугода в натурных условиях на Кислогубской ПЭС (Баренцево море) штаммов микроорганизмов, окисляющих железо, и изучение их коррозионной активности.

По результатам метагеномного анализа проб воды и донного осадка обнаружено большое количество некультивируемых видов железобактерий. Для выделения железоокисляющих микроорганизмов в накопительную, а затем в чистую культуру использовали питательную среду состава: $(NH_4)_2SO_4$ – 0,5 г, $NaNO_3$ – 0,5 г, K_2HPO_4 – 0,5 г, $MgSO_4*7H_2O$ – 0,5 г, лимонная кислота – 10,0 г, сахароза – 2,0 г, триптон – 1,0 г, $FeSO_4*7H_2O$ – 5,9 г, вода дистиллированная – 1 л (Захарова, 2007); pH=6,8. Для приготовления плотных сред к жидкой среде добавляли агар-агар в количестве 20 г./л. Данная селективная среда позволяет выделить окисляющие железо микроорганизмы, способные к хемоорганогетеротрофному типу питания.

Культивирование проводили поверхностным и глубинным способами от трех суток до двух недель. Проводили микроскопирование клеток; определяли морфологию колоний; отношение к кислороду методом укола в столбики агаризованной среды. Для определения отношения бактерий к температуре культивирование проводили при +4, +28, +37 и +45 °С.

Были выделены штаммы бактерий *Siderococcus* sp. – мелкие кокки одиночные или формирующие скопления, вокруг клеток видны отложения железа в виде желто-оранжевой корочки, мезофилы, аэробы. Бактерии *Bacillus cereus* – грамположительные палочки, спорообразующие, мезофилы, микроаэрофилы. Бактерии *Naumaniella* sp. – мелкие палочковидные или эллипсоидные, окруженные капсулой с осажденными оксидами железа, мезофилы, аэробы. Бактерии *Pseudomonas fluorescens* – грамотрицательные изогнутые палочки, одиночные или в цепочках, мезофилы, аэробы.

Коррозионную активность микроорганизмов изучали на модельных пластинах. В чашки размером 24х24 см заливали селективную среду, засевали культуру железоокисляющих бактерий и на поверхности среды размещали пластины из конструкционной стали. Чашки хранили при комнатной температуре в темном месте. Наблюдение вели в течение 1 года. Коррозионный процесс был заметен спустя четыре недели, через полгода был ярко выражен. При экспонировании образцов стали и алюминия в жидкой среде, инокулированной бактериями *Siderococcus* sp., отмечено увеличение pH среды, что объясняется образованием $Fe(OH)_3$. Масса образцов из алюминиевого сплава не изменилась. Образцы из стали покрылись ржаво-коричневым налетом и наблюдалось незначительное снижение их массы.

Работа проведена в рамках выполнения проекта РФФИ № 18–29–05031/19 мк.

ЛИТЕРАТУРА

1. Роль биофактора в коррозии металлических и железобетонных конструкций гидротехнических сооружений / Л.Э. Беллендир [и др.] // Авиационные материалы и технологии. 2015. № 1. С. 61–66.
2. Соколова Т.С., Воложенинова Е.А. Коррозия стали под воздействием железобактерий и методы защиты от нее // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. 2012. № 14. С. 187–192.

УДК: 66.094.3.098.

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ СВОЙСТВА-СТРОЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ПОЛИМЕРНЫЕ МАТРИЦЫ ФЕРМЕНТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Н.В. Лакина[1], В.Ю. Долуда[1], В.Г. Матвеева[1], Г.Ю. Рабинович[2]

[1] Тверской государственный университет, Тверь, Россия
[2] ВНИИ меллиорированных земель, Тверь, Россия

В настоящее время большую популярность получают способы получения электричества с использование механизмов живой природы. Этим занимается научное и прикладное направление энергетики, занимающееся получением энергии с использованием принципов живой природы, иначе называемое биоэнергетика. Все идеи связанные с этим направлением реализуются путем переработки экологически безопасных, неиссякаемых и недорогих биологических веществ. В качестве биокатализаторов могут быть использованы ферменты или даже целые клетки или их органеллы. Несмотря на большие потенциальные возможности использования иммобилизованных ферментов в производстве, в настоящее время реализованы лишь немногие [1].

Ферментативные биотопливные элементы представляют собой биоэлектронные устройства, которые используют ферменты оксидоредуктазы для катализа превращения химической энергии в электрическую. Одним из распространенных примеров биоэлектронного устройства является ферментный биотопливный элемент [2].

Получение ферментативных биотопливных элементов – достаточно трудоемкая процедура. Для их конструирования нужно учесть множество факторов: условия протекания реакции, pH буферных смесей, при которых ферменты будут более активны, затем подобрать такие ферментативные системы, сочетание которых будет давать наилучший результат.

При этом глюкооксидаза (GOx) является одним из наиболее широко используемых ферментов для анодного окисления глюкозы в присутствии пероксидазы (HRP) с выделением пероксида водорода. Пероксидаза (HRP) является ферментом, катализирующим окислительно-восстановительные реакции в присутствии пероксида водорода, который выступает в качестве акцептора электронов, многих видов органических субстратов за счет высвобождения кислорода [3].

GOx катализирует с высокой селективностью окисление β-D-глюкозы до глюконолактона с помощью процесса переноса $2e^-$ и $2H^+$ и регенерирует себя путем восстановления кислорода до пероксид водорода. Этот побочный продукт часто рассматривается как недостаток в применении биотоплива в клетках из-за его токсичности и денатурации белков. Однако используют HRP в качестве катализатора для восстановления пероксида водорода [4].

В восстановительной половине реакции GOX катализирует окисление β-D-глюкозы до D-глюконо–1,5–лактона, который не ферментативно гидролизуется до глюконовой кислоты. Впоследствии флавинадениндинуклеотидное (ФАД) кольцо GOx восстанавливается до $ФАДН_2$. В окислительной половине реакции восстановленныйGOx перекисляется кислородом с образованием перекиси водорода. Перекись водорода расщепляется каталазой с образованием воды и кислорода. Это служит доказательством, что фермент лактоназа отвечает за катализ гидролиза D-глюконо–1,5–лактона до глюконовой кислоты (рисунок 1) [5]. Однако присутствие лактоназы не является ключевым, так как стадия гидролиза происходит самопроизвольно, но с более низкой скоростью.

Реакции, катализируемые окислительно-восстановительным комплексом ферментов, приведены на схемах (1,2).

$$O_2 + \text{β-D-глюкоза} \xrightarrow{GOD} \text{β-D-глюкоза-δ-лактон} + H_2O_2 \quad (1)$$

$$ABTS + 2H_2O_2 \xrightarrow{HRP} ABTS + H_2O \quad (2)$$

Цель работы – изучение зависимости свойств окислительно-восстановительных ферментов, иммобилизованные в полимерные матрицы поливинлпирролидона (ПВП), ацетилцеллюлозы (АЦТ) и полиакрилонитрила (ПАН), от их химического строения.

В данной работе выбор носителя – поливинилпирролидона (ПВП) – обусловлен прежде всего его высокой механической прочностью и химической стабильностью, наличием высокореакционноспособных ионогенных групп (OH-), что делает возможным модификацию носителя различными функциональными группами.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

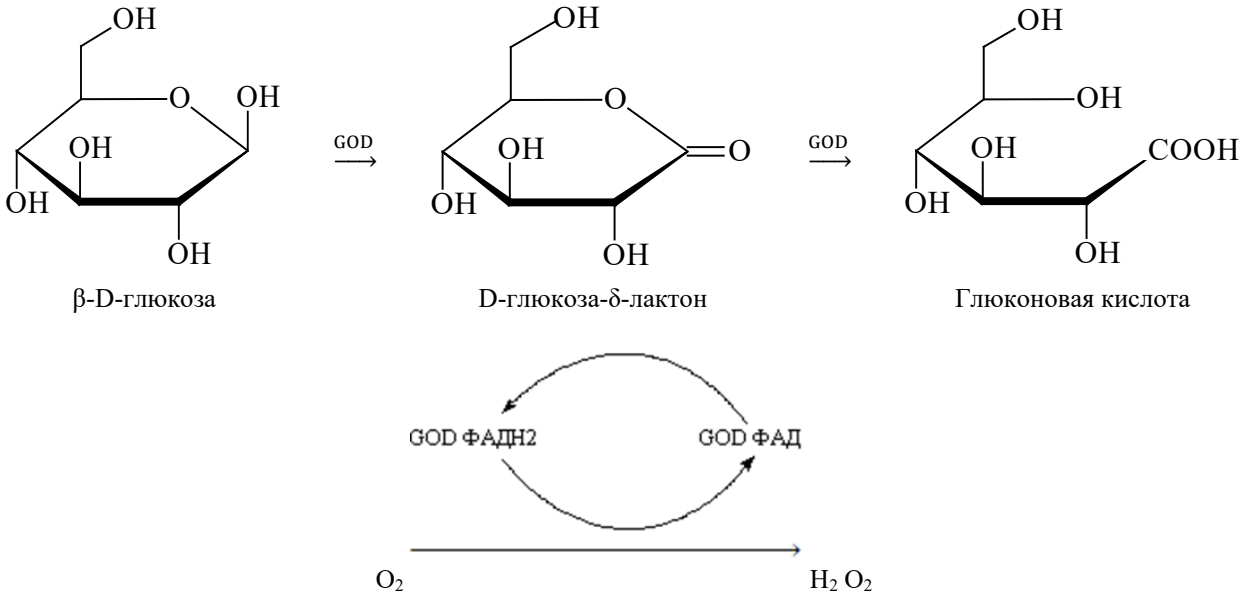


Рисунок 1. Реакция окисления β-D-глюкозы до глюконовой кислоты в присутствии фермента GOX

Хитозан (Хит) широко используется в каталитических процессах, катализируемых оксидоредутазами, причем как в качестве носителя, так и в качестве коагулянта и защитной добавки для предотвращения инактивации фермента. Наиболее важным свойством хитозана является наличие аминогрупп, которые, во-первых, позволяют использовать его при ковалентной иммобилизации ферментов, во-вторых, обуславливают высокую адсорбционную способность хитозана по отношению к хинонам, являющимся продуктами реакции окисления многих фенолов, защищая тем самым активный центр фермента от инактивации. В то же время, многими исследователями была доказана неэффективность использования чистого хитозана в качестве носителя для иммобилизации из-за его растворимость исключительно в кислой среде и высокой способности к гелеобразованию.

Глутаровый диальдегид (Glu) является наиболее широко используемым активатором для ковалентной иммобилизации ферментов, при этом в механизме сшивки носителя с ферментом участвуют различные функциональные группы фермента: аминогруппы – в случае с глутаровым альдегидом. Применение глутарового альдегида основано на образовании в слабощелочной среде азометиновой связи (-CH=N-) в реакции альдегида с аминогруппами белковой части фермента и хитозана, присоединенного по донорно-акцепторному механизму к поверхности катионита.

В качестве субстрата для реакции окисления выбор ABTS – обусловлен достаточно широким применением этого соединения в различных областях промышленности (пирокатехин используется для синтеза красителей), а также тем, что для этого субстрата хорошо изучены механизмы его окисления оксидоредуктазами. Также необходимо отметить, что строение и свойства этого субстрата (в частности присутствие дополнительной гидроксильной группы, связанной с ядром) оказывает существенное влияние на ход процесса его ферментативного окисления и резко изменяет отношение ароматического ядра к окислителям [6].

Методы синтеза полимерных матриц и проведения иммобилизации комплекса ферментов пероксидазы (HRP) и глюкооксидазы (GOx)

Метод иммобилизации ферметов в матрицу поливинилпиролидона (ПВП).

К 10.0 г. 40 %-ного водного раствора ПВП добавили 10.0 г. 2 %-ного водного раствора хитозана. Смесь перемешивали в течение одной минуты до гелеобразного состояния. Гель при помещении в среду с избытком воды или соли при комнатной температуре абсорбирует дополнительную жидкость, но не растворяется и не разрушается. К 10 мл полученного геля добавили 1 мл глутарового диальдегида (Glu) 0.1 % и перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение 6 часов. Из полученного полимерного геля готовили пленку толщиной 1 мм. Высушивали на воздухе, затем добавляли ацетатный буферный раствор фермента пероксидазы (0.01 г./л) и выдерживали в течение 12 часов. Тщательно промыли буферным раствором до отсутствия реакции на нингидрин, свидетельствующей о наличии белка в растворе. Исследуемый образец фермента обозначили в работе ПВП / Хит/Glu/HRP/GOX.

Метод иммобилизации ферментов в матрицу ацетилцеллюлозы (АЦТ).

1 г ацетилцеллюлозы растворяли в 20 мл полиэтиленгликоля в течение 24 часов при t=60^0 С, в качестве нерастворителя (осадителя) использовали глицерин в обьеме 30 мл. Смесь охладили, отфильтровали, из полученного полимерного геля сформировали пленку толщиной 1 мм. Полученную ацетилцеллюлозную пленку пропитали раствором хитозана 2 % в течении 6 часов, промыли дистиллированной водой и высушили. Затем полученную полимерную матрицу выдерживали в растворе глутарового диальдегида (Glu) 0.1 %, обьемом 50 мл, в течение 6 часов, тщательно промыли и высушили на воздухе. Полученную модифированную полимерную матрицу выдерживали в течение 12 часов в 100 мл ацетатного буферного раствора фермента пероксидазы (0,01 г./л). Тщательно промыли буферным раствором до отсутствия реакции на нингидрин, свидетельствующей о наличии белка в растворе. Таким образом получили иммобилизованный фермент в матрице АЦТ. Исследуемый образец фермента обозначили в работе АЦТ / Хит/Glu/HRP/GOX.

Метод иммобилизации ферментов в матрицу полиакрилонитрила (ПАН).

1 г полиакрилонитрила нагревали до полного расплавления при t=90^0 С, из полученного полимерного геля сформировали пленку толщиной 1 мм, высушили на воздухе. Далее проводили все стадии модификации, как и при получении АЦТ / Хит/Glu/HRP. Исследуемый образец фермента обозначили в работе ПАН / Хит/Glu/HRP/GOX.

Реакционная смесь содержала 0.36 мМ ABTS и 5 мМ D-глюкозы в случае изучения ферментного комплекса) в 0.1 М Na-ацетатном буфере. Скорость реакции определяли по изменению поглощения при 405 нм, используя коэффициент экстинкции окисленного ABTS 36.8 мМ$^{-1}$см$^{-1}$. Измерения проводили спектрофотометрическим методом с помощью спектрофотометра UV/VIS Excellence.

Для определения активности полученного ферментативного комплекса по ABTS при варьированнии pH от 3.05 до 8.45 проводили разбавление ABTS в пределах концентраций 0.87 – 3.47××10^{-3} моль/л. Для этого отбирали 1 мл раствора ABTS и добавляют 2 мл ацетатного буфера. Затем методом последовательного разбавления готовили разведения. После этого в каждую пробирку добавляли 1 мл раствора комплекса ферментов GOX:HRP. Непосредственно перед началом измерения оптической плотности вносили в кювету (толщина кюветы 1 см) 1 мл раствора D-глюкозы 0.026 моль/л.

За единицу активности ферментного комплекса принимали такое его количество, которое превращает 1.0 ммоль ABTS в минуту. Полученное значение активности комплекса пересчитывали на удельную активность относительно нативной формы ферментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния pH раствора ABTS на активность иммобилизованных ферментов

В процессе выполнения исследования были исследованы образцы:

1) нативного ферментативного комплекса(HRP/GOx), 2) ферментативного комплекса, иммобилизованного на модифицированную хитозаном полимерную матрицу поливинилпирролидона с помощью глутарового диальдегида (ПВП / Хит/Glu/HRP/GOx), 3) ферментативного комплекса, иммобилизованного на модифицированную хитозаном полимерную матрицу ацетилцеллюлозы с помощью глутарового диальдегида (АЦТ / Хит/Glu/HRP/GOx), 4) ферментативного комплекса, иммобилизованного на модифицированную хитозаном полимерную матрицу полиакрилонитрила с помощью глутарового диальдегида (ПАН / Хит/Glu/HRP/GOx. Для получения заданного значения pH использовались ацетатные буферные растворы. Полученные данные представлены на рисунке 2.

Полученные данные показывают, что максимальная активность нативного ферментного комплекса (HRP/GOx) наблюдается при pH 6.5–7.2. При pH ниже 6 и выше 8 активность биокатализатора сильно уменьшается. Показано, что в диапазоне pH = 5.0–8.5 для иммобилизованных ферментов наблюдаются наибольшее увеличение каталитической активности, в то время как для свободных ферментов увеличение концентрации продуктов реакции окисления ABTS+ с меньшей скоростью. Полученные данные подтверждают литературные данные об увеличении лабильности ферментов к изменениям pH при их иммобилизации. Полученные данные можно объяснить изменением мобильности третичной структуры, обусловленной определенной локализацией заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекулы фермента, что затрудняет образование фермент-субстратного комплекса. Для свободных ферментов мобильность поверхностных зарядов увеличивается за счет изменения конформации молекулы, что сопровождается значительным увеличением каталитической активности по сравнению с иммобилизованными ферментами.

Исследование стабильности ферментативного комплекса

Для оценки стабильности полученных образцов биокатализаторов было выполнено 10 рециклов реакций окисления глюкозы с использованием в качестве индикатора ABTS с участием биокатализаторов. Определена зависимость значений активности образцов биокатализаторов от количества рециклов биокаталитической окислительно-восстановительной реакции.

Полученные данные представлены на рисунке 3.

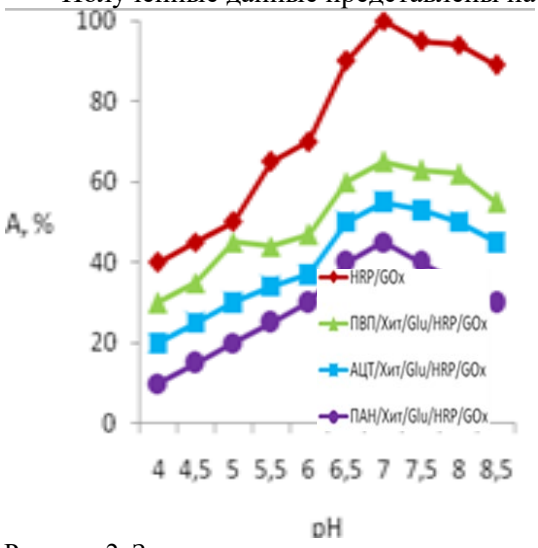


Рисунок 2. Зависимость активности нативного и иммобилизованного ферментного комплекса ферментов от pH реакционного раствора, где A, % – активность ферментного комлекса в %

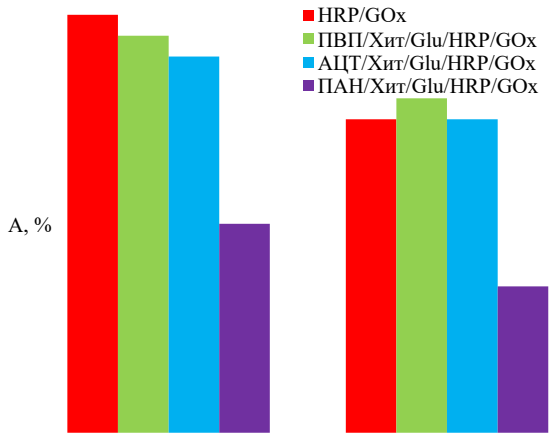


Рисунок 3. Изменение активности биокатализторов на основе ферментного комплекса после 10 рециклов (1 – начальная активность, 2 – активность после 10 рециклов)

Из данных диаграммы видно, что наиболее эффективной биокаталитической системой является система, приготовленная с использованием ПВП, так как в данной системе иммобилизация пероксидазы (глюкооксидазы) прошла более успешно. Это можно объяснить наибольшим количеством доступных для субстрата активных центров фермента, которое определяется степенью приемлемости структурной решетки и окружением функциональных групп для удержания фермента в полимерной матрице ПВП в отличие от матриц АЦТ и ПАН.

Также, можно отметить, что окислительно-восстановительные ферментные системы, включенные в полимерные матрицы проявляют высокую каталитическую активность по отношению к своим специфическим субстратам. Для наиболее активной ферментой системы на основе HRP константа Михаэлиса составила 14 мМоль/л, а для наиболее активной ферментой системы на основе GOx константа Михаэлиса составила 16 мМоль/л.

Полученные данные позволяют выделить наиболее эффективные полимерные носители на основе поливинилпирролидона и ацетилцеллюлозы. Данный факт можно объяснить более выгодным соотношением размерностей наносимых ферментов и пор изучаемых полимерных сеток.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19–08–00186).

ЛИТЕРАТУРА

1. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. Вводный курс и применение в биотехнологии . – М. : Мир, 1983. – 213 с.
2. Toher J. et al. Stability properties of two supports for immobilization of enzymes . Biochem. SOC. Trans. 2016. 18: 313–314.
3. Guisan, Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells / Guisan, M. Jose. – Second Edition, 2016.
4. Elouarzaki, K. [et. al.] Freestanding HRP–GOx redox buckypaper as an oxygen-reducing biocathode for biofuel cell applications // Energy Environ. Sci. – 2015. – V. 8, p. 2069–2074.
5. Hyun, K.H. et al. Fabrication of biofuel cell containing enzyme catalyst immobilized by layer-by-layer method // J. Power Sources – 2015. – Vol. 286, p. 197–203.
6. Rasmussen M., [et al.]. Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancement // Biosensors and Bioelectronics – 2016 – Vol. 76, p. 91–102.

УДК 579.8.06

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КРЕСТОЦВЕТНЫХ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS* С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

М.А. Кузнецов[1], А.А. Щербаков[1], С.В. Иващенко[1], Е.А. Горельникова[2], Н.С. Червякова[2]

[1] СГАУ им. Н.И. Вавилова, Россия
[2] РосНИПЧИ "Микроб" Роспотребнадзора, Россия

Сосудистый бактериоз крестоцветных является одним из наиболее опасных заболеваний сельскохозяйственных культур. Он поражает практически все известные растения, относящиеся к семейству крестоцветных. В частности, это относится к роду капустные (*Brassicaceae*), большинство представителей которых являются возделываемыми культурами, имеющими важное продовольственное значение.

Возбудитель заболевания *Xanthomonas campestris pv. campestris* согласно руководству по систематике бактерий Берджи 2005 года (том второй, протеобактерии, часть B, гаммапротеобактерии) [1] относится к классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Xanthomonadales*, семейству *Xanthomonadaceae*. Это грамотрицательная прямая палочка, подвижная за счёт одного полярного жгутика, аэробная, не восстанавливающая нитрат, оксидазоотрицательная, каталазоположительная, использующая в качестве источника углерода разнообразные углеводы и соли органических кислот, образующая маслянистые или клейкие гладкие жёлтого цвета колонии.

Возбудитель широко распространён в природе. Установлено [2], что патоген изолируется в радиусе 32 км от ближайшего источника инфекции, в связи с этим его диагностика, а также профилактика вызываемых им бактериозов является актуальной задачей.

Различные представители рода *Xanthomonas* отличаются по патогенности и обладают высокой специфичностью относительно поражаемых растительных объектов. Известно, что 27 видов этих бактерий имеют более 80 патоваров [3], но при этом отмечается, что даже при искусственном заражении патовар, характерный для одного вида растений, не вызывает поражения у других [4].

В связи с этим, актуальной становится задача точной идентификации возбудителя на уровне отдельных патоваров и их подробное описание и систематика. Применение современные комплексных методов лабораторной диагностики позволяют в коротки сроки и с достаточной достоверностью провести идентификацию микроорганизма с точностью до отдельных штаммов и патоваров [5] и, в соответствии с этими данными, определить целесообразность и соответствующие риски возделывания тех или иных сельскохозяйственных культур на данной территории, необходимость проведения карантинных мероприятий и выбрать наиболее эффективные способы предпосевной подготовки семян и грунта.

Из всех известных на сегодняшний день способов классификации микроорганизмов наиболее простым, доступным – и, вместе с тем, достаточно точным – является оценка их биохимической активности. В частности, достаточно широко распространено использование систем индикаторных бумажных (СИБ) и специальных комплексных диагностических тест-систем для биохимической идентификации микроорганизмов. Последние являются наиболее предпочтительными, так как позволяют при минимальных затратах получать достаточно полную информацию о конкретном виде, штамме исследуемого микроорганизма. За счёт использования идущих в комплекте цифровых баз данных коммерческие тест-системы позволяют упростить процесс идентификации уже известных и систематизации ещё не описанных штаммов.

В отношении бактерий рода *Xanthomonas* погрешность, присущая коммерческим тест-системам отчасти компенсируется тем, что при всём своём многообразии возбудитель сосудистого бактериоза обладает ярко выраженной видоспецифичностью. Кроме того, для решения задачи идентификации отдельных патоваров разрешающая способность этих систем является достаточной. Таким образом, использование подобных комплексных методик при изучении биоразнообразия бактерий рода *Xanthomonas* оправдано и целесообразно.

Цель работы – идентификация бактерий рода *Xanthomonas* с использованием сравнительного анализа биохимической активности возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных при помощи коммерческой тест-системы.

В ходе исследования решались задачи по выделению чистой культуры дикого возбудителя сосудистого бактериоза крестоцветных, установлению его соответствия с культурой музейного штамма и сравнению его биохимических признаков с культурами широко распространённых в естественной среде микроорганизмов.

Для проведения работы были взяты культура микроорганизмов вида *X.campestris* B-610, полученного из коллекции Института биохимии, физиологии растений и микроорганизмов РАН, а также диких штаммов семейства *X. campestris pv. campestris*, полученных из тканей заражённых растений взятых с приусадебных участков г. Саратова и Вольского района Саратовской области.

Для постановки сравнительного анализа использовались штаммы *Escherichia coli* M-616, *E. coli 1027, Salmonella enterica subsp. enterica ser. abony* M-767, *Yersinia pseudotuberculosis III* и *Y. enterocolitica ser. 0:3* 66–82, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, штамм *Proteus sp*., полученныq из музея кафедры «Микробиология, биотехнология и химия» Саратовский государственный агарный университет им. Н.И. Вавилова»).

Выделение дикого штамма проводилось суточным посевом на плотную среду Эйкмана, содержащую 1 % пептона, 1 % сахарозы, 0,5 % NaCl и 0,5 % дрожевого гидролизата. Посев проводился по методу Дригальского с последующим отбором колоний. Выделенные культуры хранились в музее кафедре «Микробиология, биотехнология и химия» Саратовский государственный агарный университет им. Н.И. Вавилова» на скошенной среде Эйкмана при температуре +4…+5 ºС.

Непосредственно при проведении работы использовались суточные культуры перечисленных выше штаммов. Для этого проводился их высев на скошенный соево-казеиновый агар и культивирование при температурах их оптимального роста.

Анализ проводился с использованием тест-системы API 10S, в трёхкратной повторности. Процедура анализа выполнялась в соответствии с изложенной в инструкции стандартной методикой. Результаты анализа учитывались визуально, непосредственно или после добавления соответствующих реактивов. Запись результатов проводилась на входящих в комплект тест-системы стандартизированных бланках. Для интерпретации результатов каждому из исследуемых штаммов по результатам реакции присваивался соответствующий числовой профиль, который затем соотносился с базой данных системы.

Полученные в ходе исследования результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Числовые профили штаммов, использованных в работе

Вид штамма	Наименование штамма	Числовой профиль	Совпадение профилей
E. coli	M-616	7305	*E. coli* 1
E. coli	1027	7345	–
V. enterocolitica ser. 0:3	66–82	0210	–
V. pseudotuberculosis	III	7420	–
S. enterica subsp. enterica ser. abony	M-767	7755	–
Proteus sp	–	6775	–
X. campestris	B-610	7010	–
X. campestris	*pv. campestris* 1	7004	*Echerichia vulneris, Pantoea sp, Echerichia coli* 2
X. campestris	*pv. campestris* 2	7044	–
X. campestris	*pv. campestris* 3	7000	–
X. campestris	*pv. campestris* 4	7000	–

Биохимические признаки штаммов *Xantomonas*, дикого и музейного, являются типичными для их видовой принадлежности. При этом у музейного штамма наблюдалось наличие признаков продукции сероводорода, тогда как у образцов дикого штамма они отсутствовали. Помимо этого, дикие штаммы имеют способность к восстановлению нитратов. Также, у выделенных диких штаммов семейства *X. campestris pv. campestris*, наблюдались приводящие к неоднозначности интерпретации колебания активности триптофандеаминазы и ферментов, участвующих в утилизации цитратов. (таблица 2).

Таблица 2. Отличие биохимических свойств штаммов *X. campestris pv. campestris*, выделенных из растительных объектов от музейного штамма *X. campestris* B-610

Штамм	Источник получения	Числовой профиль	Отличия от музейного штамма
X. campestris pv. campestris 1	Саратовская обл., Вольский р-н	7004	Восстановление нитратов, отсутствие продукции H_2 S
X. campestris pv. campestris 2	Саратовская обл., г. Энгельс	7044	Триптофандеаминаза, восстановление нитратов, отсутствие продукции H_2 S
X. campestris pv. campestris 3, 4	Саратовская обл., г. Саратов, Кировский р-н	7000	Отсутствие продукции H_2 S

Наиболее выраженные отличия в биохимической активности наблюдались в сравнении с *Y. enterocolitica, Proteus sp* и *S. enterica*. Наиболее близкими по биохимическим свойствам показали себя *E. coli* M-616 и *E. coli* 1027.

Характерным является совпадение разных профилей образцов дикого штамма возбудителя с бактериями видов *Echerichia vulneris, Pantoea sp, Echerichia coli* и микроорганизмами рода *Yersinia*. Однако, источник получения образов ксантомонад не является характерным для перечисленных видов микроорганизмов, что не даёт оснований говорить о контаминации образцов посторонней микрофлорой и, как следствие, о нарушении чистоты эксперимента.

В ходе исследования были определены числовые идентификационные профили микроорганизмов вида *X. campestris* и установлены их различия в биохимической активности по сравнению с другими, широко распространёнными в природе, видами микроорганизмами.

Выявлены характерные внутривидовые различия между музейным и выделенными штаммами *X. campestris* – касающиеся, в частности, активности триптофанаминазы и продукции H_2 S и NO_2 – что, возможно, является следствием приспособления возбудителя к конкретным условиям среды обитания. Данный факт объясняет совпадение профилей отдельно взятых образцов выделенных штаммов с бактериями видов *E.vulneris, Pantoea sp, E.coli* и микроорганизмами рода *Yersinia*. Тем не менее, несмотря на показатели биохимической активности, схожие у выделенных штаммов с микроорганизмами других родов и видов, их отличие по целому ряду параметров достаточно существенно. Это позволяет говорить о возможности применения тест-системы API 10S для идентификации сосудистого бактериоза крестоцветных – при условии использования её в комплексе с другими методами идентификации.

Недостатком идентификации *X. campestris* с использованием тест-системы API10S является визуальный способ учёта результатов анализа, способный приводить к неоднозначной их интерпретации и, как следствие, ошибкам в работе. Целесообразным является использование фото- и колориметрических способов с применением соответствующего аппаратурного оснащения, что помогло бы повысить точность метода и, возможно, усовершенствовать его, дав возможность количественного определения биохимической активности микроорганизмов.

Таким образом, по итогам выполненной работы можно сделать следующие выводы:

1. Установлены числовые профили диких и музейного штаммов возбудителя сосудистого бактериоза *X. campestris* с использованием тест-системы API-10S.

2. Дикие штаммы *X. campestris pv. campestris* отличаются от музейного штамма *X. campestris* B 610 по способности к восстановлению нитратов и отсутствию продукции сероводорода.

3. Тест-система API-10S может быть использована для диагностики, идентификации и описания биохимических характеристик микроорганизмов вида *X. campestris* на уровне отдельных патоваров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Second Edition. – Volume TWO: The Proteobacteria. – Part B: The Gammaproteobacteria. Editor-in-chief George M. Garrity – Springer-Vergal New York, 2005. – 1106 p.
2. 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, 1, 2009 год
3. В.С. Зотов. Биоразнообразие бактерий рода *Rhisobium* и *Xanthomonas* и создание молекулярной системы их идентификации и диагностики. Диссертация на соискание учёной степени к-та биологических наук. Москва, 2013 г.
4. В.В. Козулин. Углеводсодержащие биополимеры *Xanthomonas campestris* и их роль в фитопатогенных процессах. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук. Саратов, 2009 г.
5. Н.С. Червякова. Оптимизация подходов к установлению аутентичности и консервации лабораторных штаммов патогенных микроорганизмов. Диссертация на соискание учёной степени к-та биологических наук. Саратов, 2017 г.

УДК 577.152.119

АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОБАКТЕРИИ КАК ОСНОВА БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

Т.А. Кузнецова

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Благодаря способности метилотрофных бактерий утилизировать метанол и другие восстановленные C_1 – соединения, мембранной локализации основных ферментов и другим физиолого-биохимическим особенностям, данные клетки представляют особый биотехнологический интерес [1, 2] и являются удобным объектом для изучения закономерностей окисления субстратов в присутствии медиаторов электронного транспорта в биоэлектрохимических системах. Уже изученные генетические и биохимические основы метаболизма метилотрофов, описанные механизмы и структура основного фермента первичного C_1-метаболизма – PQQ-метанолдегидрогеназы (МДГ) [3,4], создают необходимую научную основу для получения достоверных результатов новых исследований этой области.

Клетки метилобактерий, их бесклеточный экстракт, фермент МДГ могут являться основой при создании биосенсорных систем мониторинга C_1 – соединений в природных и антропогенно загрязненных экосистемах. Исследование закономерностей процессов, происходящих в биосенсорах на основе клеток метилобактерий, их ферментных фракций, фермента МДГи медиаторов электронного транспорта является актуальной задачей аналитической биотехнологии и позволит разработать фундаментальные основы для создания новых биосенсорных систем. В данной статье я привожу краткий обзор результатов своей работы по изучениюбиокаталитических свойств клеток и ферментов метилобактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе проводила исследования с целыми клетками метилобактерий с разными путями первичной C_1-ассимиляции: *Methylovorusmays* (РМФ – цикл), *Methylobacteriummesophilicum* и *Methylobacteriumdichloromethanicum, MethylobacteriumnodulansMethylobacteriumextorquens* (дикого и рекомбинантного штаммов (сериновый цикл).

На начальном этапе работы в период выбора биокатализаторов были определены физиологические параметры роста метилобактерий и изучена метаболическая активность по скорости потребления метанола. Показано превосходство метилобактерий с РМФ-циклом над бактериями с сериновым циклом по скорости роста, продуктивности и выходу биомассы. Наиболее эффективным деструктором метанола является *Methylovorusmays*, который характеризуется максимальными показателями: удельной скорости роста – 0,33±0,02 ч-1; выхода биомассы – 14±2 г/л; метаболическим и экономическим коэффициентами – 8,33·10–5 и 6,25, соответственно, а также скоростью потребления метанола v = 0,018 % об.·ч-1.

Для изучения свойств биокатализаторов в работе оценивалась их каталитическая активность по отношению к различным субстратам с помощью амперометрического преобразователя – гальванопотенциостата «IPC2000» («Вольта», Россия), интегрированного с ПК. В качестве биоматериала использовали целые клетки, бесклеточный экстракт и выделенный фермент МДГ.

Целые клетки метилобактерий как биокатализаторы амперометрического медиаторного биосенсора.

Для получения биокатализатров с максимальной активностью на начальном этапе работы с каждым штаммом метилобактерий проводили изучение его биокаталитической активности в зависимости от фазы роста. Установлено, что исследуемые метилобактериипроявляют максимальную биоэлектрохимическую активность в фазе экспоненциального роста. Исходя из полученных результатов, для дальнейшего изучения взаимодействия ферментных систем метилобактерий с искусственными акцепторами электронов использовали клетки, собранные в экспоненциальной фазе роста.

Для прогнозирования биокаталитических свойств рекомбинантного фермента, штамм *Mb. extorquens* pCM160/mxaF_Mext, полученный нами [5] использовали в качестве биокатализатора амперометрического медиаторного биосенсора. Для сравнения результатов использовали дикий

штамм аэробных метилотрофных бактерий из коллекции лаборатории метилотрофии ИБФМ РАН: *Mb. extorquens* AM1.

Сравнение биокаталитических свойств *метилобактерий Mb. extorquens* дикого и рекомбинантного штаммов проводили в условиях функционирования амперометрического медиаторного биосенсора с использованием ферроцена в качестве медиатора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

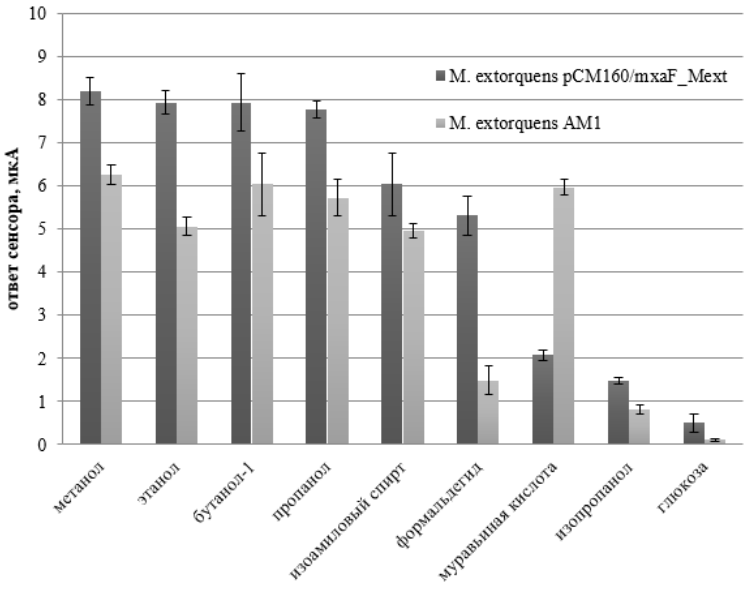


Рисунок 1. – Профиль субстратной специфичности клеток метилобактерий в присутствии ферроцена

В целом, ответы сенсора на основе рекомбинантного штамма выше, чем для бесплазмидного, по отношению практически ко всем субстратам, что может объясняться более высоким содержанием фермента МДГ в его клетках.

Проведен сравнительный анализ параметров биосенсоров на основе дикого и рекомбинантного штаммов *Mb.extorquens* при использовании метанола в качестве субстрата. Определено, что биосенсор на основе рекомбинантного штамма обладает наилучшими показателями коэффициента чувствительности (13,0±0,6 мкА / Мм), операционной (2,8 %) и долговременной стабильностью (потеря стабильности за 10 сут – 70 %) и может применяться для определения содержания метанола в стоках.

Основным недостатком целых клеток метилобактерий как биокатализаторов является их недостаточная стабильность и подверженность внешним факторам (низкая стабильность микробного сенсора может быть обусловлена негативным действием ферроцена на клетки метилобактерий). Для того чтобы снизить роль физиологических аспектов функционирования живых клеток и использовать только каталитическую активность ферментных систем метилобактерий при разработке биосенсоров в качестве биокатализатора использовали клеточные структуры метилобактерий.

Клеточные структуры метилобактерий как биокатализаторы амперометрического медиаторного биосенсора.

Клетки метилобактерий, выращенные до экспоненциальной фазы роста, разрушали ультразвуком и подвергали дифференциальному центрифугированию. Учитывая тот факт, что дегидрогеназыметилобактерий имеют цитоплазматическую (формальдегиддегидрогеназа) и мембранную локализацию (МДГ), для дальнейших исследований использовали бесклеточный экстракт и фракцию суммарных мембран в качестве биокатализаторов.

Наиболее интересные результаты были получены для мембранных фракций *Mb.dichloromethanicum*. Показано, что они в условиях биоэлектрохимического окисления субстратов в присутствии ферроцена специфичны к формальдегиду, что отличает эти бактерии от других, исследованных в работе, и является отправной точкой для новых исследований по выяснению молекулярных механизмов окисления формальдегида этими бактериями.

Нативный и рекомбинантный фермент метанолдегидрогеназа как биокатализатор амперометрического медиаторного биосенсора.

Нативная МДГ из *Mb.nodulans* была очищена до электрофоретически гомогенного состояния и охарактеризована. Схема очистки представляла собой многостадийную процедуру, включающую ионообменную хроматографию на анионите ДЭАЭ-сефарозе, хроматографию на геле гидроксиапатита, катионообменную хроматографию и ультрафильтрацию.

Молекулярная масса нативного белка по результатам гель-фильтрации составляла около 70 кДа и состояла из большой – 60 кДа и малой – 6 кДа субъединиц судя по результатам электрофореза в присутствии SDS. Очищенный белок имел спектр идентиченый с PQQ – МДГ, pH – оптимум при pH 9 – 10, фермент был неактивным в отсутствие активатора – аммония или метиламина, проявлял широкую субстратную специфичность, имея наибольшее сродство к метанолу, но не окислял вторичные спирты. Кажущиеся значения K_M к спиртам увеличивались с ростом углеродной цепи Фермент был иммобилизован на поверхность графитово-пастового электрода, модифицированного медиатором электронного транспорта – ферроценом. Относительное стандартное отклонение для 15 последовательных измерений – 7,6 %. Линейный диапазон определяемых концентраций метанола 0,0135 – 0,5 мМ, предел обнаружения – 4,5 мкМ, длительность единичного измерения – 10 мин; при хранении электрода при 4°С в течение 20 суток сохранялось 75 % активности иммобилизованного фермента. Показано, с помощью увеличение концентрации цианида калия в кювете можно повысить селективность определения метанола в присутствии формальдегида.

Поскольку очистка нативного фермента представляет собой достаточно трудоемкую и длительную процедуру – следующим этапом работы являлось получение рекомбинантной МДГ. В работе использовали рекомбинантный штамм *метилобактерийMb. extorquenspCM160*, сконструированный на основе дикого штамма *Mb. extorquensAM1* (Всероссийская коллекция микроорганизмов ИБФМ РАН им. Г.К. Скрябина, г. Пущино). Рекомбинантный штамм, содержит ген большой субъединицы МДГ – mxaF, клонированный в векторе pCM160. Рекомбинантный белок был очищен аффинной металл-хелатной хроматографией на колонке с Ni^2±NTA-агарозой до электрофоретически гомогенного состояния и охарактеризован. Методом SDS-электрофореза установлено, что рекомбинантная МДГ имеет субъединицу массой около 66 кДа. Определен спектр поглощения метанолдегидрогеназы, пик наблюдается при длине волны 345 нм, что свидетельствует о присутствии восстановленной формы кофермента PQQ в растворе фермента. Измерена pH – стабильность метанолдегидрогеназы, наибольшая активность которой наблюдается в диапазоне pH 7–11, что согласуется с литературными данными. Измерение субстратной специфичности показало, что наибольшая активность рекомбинантной МДГ наблюдается на метанол. Также рекомбинантный белок хорошо окисляет первичные спирты и формальдегид. Значение K_M к метанолу составило 0,36±0,07 мМ.

Показано, что рекомбинантный фермент МДГ является эффективным биокатализатором амперометрического медиаторногографито-пастового сенсора. Ранее предложенный метод модификации графитовой пасты с помощью ГА [6] также обеспечивает высокие каталитические токи окисления метанола и увеличение стабильности биосенсора на основе рекомбинантной МДГ. Модифицированный амперометрический МДГ-биосенсор, будучи экономичным и простым в изготовлении, не уступает, а по некоторым аналитическим и метрологическим характеристикам превосходит другие биосенсоры для определения содержания метанола [7, 8]. Таким образом, основным преимуществом рекомбинантного фермента является легкость его получения: одностадийная очистка более экономична, что является особенно важным при создании расходных материалов для биосенсорного анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта государственного задания МИНОБРНАУКИ (FEWG-2020–008 «Направленное формирование нано/био интерфейсов с переносом заряда в биоэлектрохимических системах»)

ЛИТЕРАТУРА

1. Aerobic methylobacteria as promising objects of modern biotech-nology (Review) / N.V. Doronina, M.L. Torgonskaya, D.N. Fedorov [et al] // Applied Biochemistry and Microbiology. 2015. Vol. 51. № 2. P. 125–134.
2. Synthetic methylotrophy: A practical solution for methanol-based biomanufacturing / Y. Wang, L. Fan, P. Tuyishime[et al] // TrendsinBiotechnology. 2020. V 38. № 6. P. 650–666.
3. Anthony C., Williams P. The structure and mechanism of methanol dehydrogenase // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1647. P. 18–23.
4. The crystal structure of methanol dehydrogenase, a quinoprotein from the marine methylotrophic bacterium Methylophagaaminisulfidivorans MP / T.P. Cao, J.M. Choi, S.W. Kim [et al] // J Microbiol. 2018. V. 56. № 4. P. 246–254.
5. Кузнецова Т.А.. Конструирование рекомбинантной плазмиды для экспрессии гена метанолдегидрогеназы // Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: сб. т. конф.. М.: Макс Пресс, 2014. С. 137.
6. Свойства модифицированных амперометрических биосенсоров на основе метанолдегидрогеназы и клеток Methylobacteriumnodulans / Кузнецова Т.А. [и др.] // Прикл. биохим. микробиол. 2013. Т. 49. № 6. С. 613–618.
7. Электрохимический сенсор на основе алкогольоксидазы для экспресс-определения содержания низших спиртов / Алферов В.А. [и др.] // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 12. С. 1322–1329.
8. Gülce H. A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination // Biosens. Bioelectron. 2002. V. 17. № 6–7. P. 517–521.

УДК 543.9:663:664

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА НА СВОЙСТВА БИОГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ИММОБИЛИЗАЦИИ В ОРГАНОСИЛИКАТНЫЕ МАТРИЦЫ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ В УСЛОВИЯХ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗА

Д.Г. Лаврова, М.С. Тимошина, О.Н. Понаморева

Тульский государственный университет, Тула, Россия

В биотехнологических процессах в качестве биокатализаторов наиболее предпочтительно использовать иммобилизованные микроорганизмы, применение которых позволяет существенно интенсифицировать производство и повышать его эффективность. Такие микроорганизмы сохраняют свою жизнеспособность в течение длительного времени. В настоящее время интенсивно развивается направление на стыке микробиологии и нанотехнологий – разработка методов получение «живых» гибридных материалов (биогибридных материалов), в которых клетки покрыты искусственными оболочками. Материалы со структурой «клетка в оболочке» являются подобием природных одноклеточных микроорганизмов, таких как, диатомовые водоросли, которые на своей поверхности формируют защитный экзо-скелет из кремнезема. Одним из подходов для создания искусственной силикатной оболочки вокруг клеток является применение методов золь-гель химии. Они основаны на конденсации в водных средах мономеров кремниевой кислоты с образованием полимерных молекул, структурированных в виде частиц золя, которые затем формируют сетчатую структуру геля (силикагеля). Обычно в качестве исходных материалов применяют полностью гидролизующийся тетраэтоксисилан (ТЭОС) с образованием кремнеземов с жесткой структурой. Введение в систему различных полимерных молекул или использование в качестве исходных веществ кремнийорганических соединений, которые помимо алкоксильных групп содержат органические радикалы, например, алкильные, позволяет получать органосиликатных материалы. Так, при использовании помимо ТЭОС метилтриэтоксисилана (МТЭС), выполняющего роль гидрофобной добавки, образуются более эластичные материалы [1,2]. Добавление органических полимеров в реакционную смесь придает гибкость конечной структуре материала и обеспечивает возможность варьировать его пористость, поэтому, их можно рассматривать как структуроуправляющие агенты (СА). В качестве СА, в частности, используют полиэтиленгликоль (ПЭГ) и поливиниловый спирт (ПВС) – гидрофильные полимеры, которые в зависимости от своей молекулярной массы и концентрации способны формировать разные трехмерные структуры в водных растворах [3–5].

Ранее в нашем научном коллективе исследовались различные условия иммобилизации микроорганизмов в силикагели, в том числе в органомодифицированные силикагели, которые образуются при участии ТЭОС, МТЭС и ПЭГ-3000. Показано, что микроорганизмы активно участвуют в формировании гибридных материалов, что приводит к образованию вокруг клеток органосиликатной оболочки [6]. Однако выявлены не все параметры и условия для направленного формирования материалов с такой архитектурой. В первую очередь это касается влияния гидрофильных полимеров как структуроуправляющих агентов с одной стороны, и как соединений, способных сформировать благоприятное окружение вокруг клеток микроорганизмов. Таким образом, в работе исследовали влияние ПЭГ и ПВС на свойства биокатализаторов, полученных путем иммобилизации метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha* в органомодифицированные силикагели.

Синтез биокатализаторов проводили по методике, описанной в работе [7]. В качестве исходных соединений для синтеза органосиликатных материалов применяли МТЭС и ТЭОС в различных соотношениях (МТЭС: ТЭОС = 0:100, 50:50, 80:20, 85:15, 100:0 об. %). Золь-гель синтез проводили при нейтральном значении pH, используя в качестве катализатора NaF. ПЭГ с молекулярной массой 3000 Да (далее – ПЭГ-3000) и ПВС с молекулярной массой 78 000 Да (далее – ПВС) выполняли роль структуроуправляющих агентов. Объектом иммобилизации являлись метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, для которых низкомолекулярные спирты являются природными субстратами. Это обеспечивает сохранение жизнеспособности микроорганизмов в присутствии образующегося спирта в процессе гидролиза и конденсации исходных алкоксисиланов.

Степень конденсации исходных соединений в конечных органосиликатных материалах на основе МТЭС, ТЭОС и СА (ПЭГ-3000 или ПВС) в отсутствии биологического компонента оценивали методом ИК-спектроскопии. Число образующихся Si-O-Si связей определяли по интенсивности сигнала в области 1100 $см^{-1}$, которая принадлежит валентным колебаниям Si-O-Si групп, которую нормировали по полосе поглощения 1270 $см^{-1}$, соответствующей колебаниям $Si-CH_3$, поскольку в процессе формирования геля количество Si-C-связей остается неизменным (I_{1100}/I_{1270}) (рисунки 1 и 2).

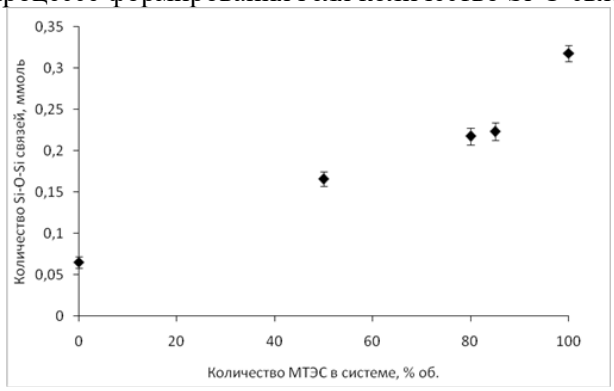


Рисунок 1. Количество образующихся Si-O-Si связей в органосиликатном материале на основе МТЭС, ТЭОС и ПЭГ-3000

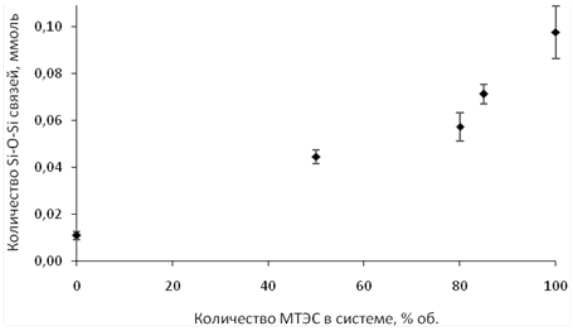


Рисунок 2. Количество образующихся Si-O-Si связей в органосиликатном материале на основе МТЭС, ТЭОС и ПВС

При увеличении содержания гидрофобной добавки МТЭС происходит увеличение количества Si-O-Si связей в органосиликатных матрицах в обоих образцах. При нейтральных значениях pH гидролиз алкоксисиланов лимитирует скорость золь-гель процесса. Известно, что скорость гидролиза МТЭС выше, чем ТЭОС, несмотря на более низкую растворимость МТЭС в воде [8]. Это приводит к формированию не только сетчатой структуры органомодифицированного кремнезема, но и к образованию более гидрофобных олигомеров при взаимодействии гидролизованных молекул МТЭС между собой, что проявляется в увеличении количества силоксановых связей в образцах в целом. Высказанное предположение подтверждается образованием большего количества Si-O-Si связей в образцах, содержащих ПЭГ по сравнению с образцами, содержащими ПВС (рисунки 1 и 2). В составе ПЭГ присутствуют гидрофобные (углеводородные фрагменты) и гидрофильные (кислородные мостики) сегменты, поэтому в водных средах полимер увеличивает растворимость исходных соединений кремния, что обеспечивает более эффективное протекание реакций в этих условиях золь-гель синтеза, в отличие от ПВС.

Морфологию материалов, полученных путем иммобилизации метилотрофных дрожжей в органосиликатные матрицы, представленные выше, изучали методом сканирующей электронной микроскопии. При соотношении исходных соединений кремния МТЭС: ТЭОС = 85:15 об. % вне зависимости от гидрофильного полимера формировалась структура типа «клетка в оболочке» (рисунок 3).

При содержании в материале гидрофобной добавки меньше 85 об. % образовывалась преимущественно монолитная жесткая структура биогибридного материала. Увеличение содержания МТЭС до 100 % об. приводило к неэффективному инкапсулированию метилотрофных дрожжей. Этот результат также можно объяснить увеличением числа олигомерных молекул органосиликатов, образованных из МТЭС, и уменьшением вклада сетчатой структуры в формирование матрицы.

Динамику образования вокруг микроорганизмов органосиликатной оболочки из МТЭС: ТЭОС в соотношении 85:15 и ПВС изучали методом оптической микроскопии. В предложенных нами условиях основного катализа в присутствии ПВС клетки микроорганизмов являются центрами инициации золь-гель реакций, так как на поверхности микроорганизмов наблюдается формирование частиц золя, число которых увеличивается со временем. Через 5 часов все клетки дрожжей покрыты оболочкой. Аналогичная картина наблюдалась ранее при изучении динамики инкапсулирования этих дрожжей в органосиликатные гели в присутствии ПЭГ-3000 [9]. Следует отметить, что получаемые биогибридные материалы различны по макроструктуре – при ПВС формируется пленка, а при ПЭГ фрактальный гель, что можно использовать при разработке биокализаторов разного типа.

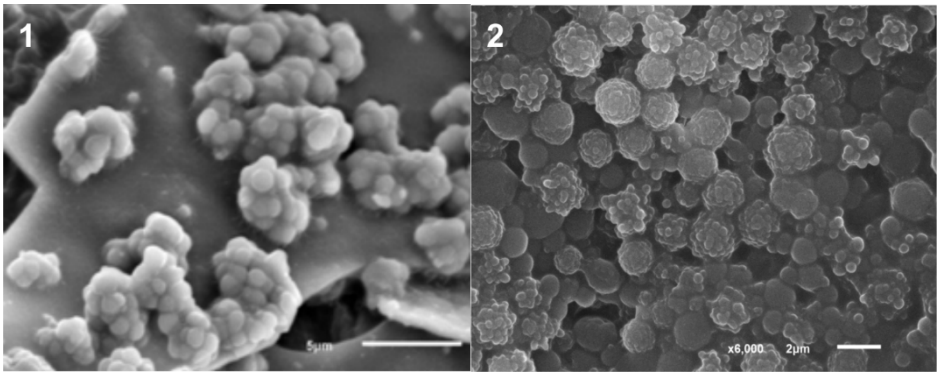


Рисунок 3. СЭМ изображение: 1 – биогибридные материалы на основе инкапсулированных метилотрофных дрожжей в органосиликатные матрицы из МТЭС, ТЭОС в соотношении 85:15 и ПЭГ-3000; 2 – – биогибридные материалы на основе инкапсулированных метилотрофных дрожжей в органосиликатные матрицы из МТЭС, ТЭОС в соотношении 85:15 и ПВС

Биокаталитическую активность биогибридного материала оценивали по дыхательной активности иммобилизованных микроорганизмов в присутствии метанола. Инкапсулированные метилотрофные дрожжи эффективно окисляют метанол в течение 15 дней функционирования. Биокатализатор хранится при -18ºС в течении года без потери активности. Биогибридный материал на основе инкапсулированных микроорганизмов в органосиликатные матрицы являются перспективным биокатализатором окисления метанола, что можно использовать при разработке биосенсоров и биофильтров для очистки метанолсодержащих стоков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Госзадание № FEWG-2020–008)

ЛИТЕРАТУРА

1. Putz A.M. et al. Mesoporous silica obtained with methyltriethoxysilane as co-precursor in alkaline medium // Appl. Surf. Sci. 2017. Vol. 424. P. 275–281.
2. Ma Y., Kanezashi M., Tsuru T. Preparation of organic/inorganic hybrid silica using methyltriethoxysilane and tetraethoxysilane as co-precursors // J. Sol-Gel Sci. Technol. 2010. Vol. 53, № 1. P. 93–99.
3. S. Liu, Z. Zhang, H. Zhang, Y. Zhang, S. Wei, L. Ren, C. Wang, Y. He, F. Li F. – S.X. Phase separation of organic/inorganic hybrids induced by calcination: A novel route for synthesizing mesoporous silica and carbon materials // J. Colloid Interface Sci. 2010. Vol. 345. P. 257–261.
4. W. Guo, G.S. Luo Y.J.W. A new emulsion method to synthesize well-defined mesoporous particles // J. Colloid Interface Sci. 2004. Vol. 271. P. 400–406.
5. S. Shen, W. Wu, K. Guo J.C. Low-cost preparation of mesoporous silica with high pore volume // J. Univ. Sci. Technol. Beijing. 2007. Vol. 14. P. 369–372.
6. Lavrova D.G. et al. Effect of polyethylene glycol additives on structure, stability, and biocatalytic activity of ormosil sol–gel encapsulated yeast cells // J. Sol-Gel Sci. Technol. 2018. Vol. 88, № 1. P. 1–5.
7. Каманина О.А., Лаврова Д.Г., Арляпов В.А., Понаморева О.Н. Биосенсор на основе иммобилизованных в модифицированные силикагели метилотрофных дрожжей для мониторинга процесса брожения // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13, № 4. С. 40–45.
8. Schmidt H., Scholze H., Kaiser A. Principles of hydrolysis and condensation reaction of alkoxysilanes // J. Non. Cryst. Solids. 1984. Vol. 63, № 1–2. P. 1–11.
9. Kamanina O.A. et al. Synthesis of organosilicon sol-gel matrices and preparation of heterogeneous biocatalysts based on them // Russ. J. Appl. Chem. Pleiades Publishing, 2014. Vol. 87, № 6. P. 761–766.

Актуальная биотехнология

№3 (34), 2020

УДК 579.26

ГЕОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОЧВ ЭКОСИСТЕМ БАЛТИЙСКОГО РЕГИОНА

М.В. Куркина[1], П.В. Масленников[1], А.С. Уманский[2]

[1]Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия
[2]Калининградский государственный технический университет, Россия

Широкомасштабное экологическое загрязнение, возрастающее в последние десятилетия из-за городской, промышленной и сельскохозяйственной деятельности, может привести к серьезным угрозам здоровью человека и природным экосистемам [1]. Одним из самых загрязненных компонентов окружающей среды является почва. При значительной техногенной нагрузке она аккумулирует токсичные соединения, и сама становится источником экологической опасности для растений, животных и человека [2]. Загрязнение почвы органическими и неорганическими поллютантами влияет на свойства почвы, изменяя её функции и снижая видовое разнообразие [3]. В первую очередь почвенное загрязнение оказывает давление на чувствительные к загрязнению микроорганизмы, изменяя состав микробного сообщества [4]. Высокая чувствительность и индикационная способность микроорганизмов позволяет использовать их в качестве инструмента мониторинга антропогенных изменений с целью ранней диагностики техногенного повреждения почвенного покрова. Изучение структуры микробных сообществ почвы, выявление чувствительных и резистентных к загрязнению микроорганизмов важно для понимания способности экосистем к адаптации и устойчивости к условиям загрязнения, а также возможности использования микроорганизмов для биоремедиации трансформированных экосистем [5]. Доминирующая роль микроорганизмов в биогеохимических циклах побуждает исследователей к изучению биогеографии почвенных микробных сообществ. Были предприняты попытки понять, как микробное разнообразие почвы изменяется по всему земному шару, и как это разнообразие связано с физическими, химическими и биологическими характеристиками экосистем, а также с человеческой деятельностью, в том числе и урбанизацией [6]. Поэтому изучение почвенного покрова и микробных сообществ почвы является одним из перспективных направлений в почвоведении и экологии и позволяет проследить роль экологических и антропогенных факторов в изменении свойств почвы и, как следствие, ее функционировании. В связи с этим были изучены доминантные микробные сообщества почв юго-восточной части региона Балтийского моря (Калининградская область), выявлены вариации относительного обилия и встречаемости доминирующих почвенных микробных сообществ и определены наиболее важные геоэкологические факторы, определяющие их состав.

Объектами исследования служили различные экосистемы Калининградской области, расположенные в природных ландшафтах Калининградского полуострова и Куршской косы. Для изучения микробных сообществ почв на данных территориях были заложены постоянные ключевые участки. Площадь каждого участка составляла 100 м^2. Отбор проб почвы для микробиологического анализа осуществляли методом «конверта» с глубины 10 см с соблюдением стерильности [7]. При взятии проб измеряли температуру почвогрунтов, отбор почвы проводился в металлические бюксы. Температуру почвы измеряли на глубине взятия пробы почвенным термометром (ГОСТ-112–51). Определение pH почвенной среды осуществляли с помощью портативного pH-метра HANNA марки HI8314. Влажность почвы определяли весовым методом. В образцах почв анализировали содержание тяжелых металлов рентгенфлуоресцентным методом на приборе Спектроскан Макс G производства ООО «НПО Спектрон». Сбор почвенных образцов проводили весной, летом и осенью, в апреле, июле и октябре соответственно в период с 2009 года по 2012 год. В данной работе представлены сведения о качественном и количественном составе микрофлоры за летний период.

Микробиологические исследования проводили в свежих образцах почв в первые сутки после отбора проб. Почвенные пробы освобождали от камней и корней растений, просеивали, тщательно перемешивали и брали среднюю пробу почвы массой 10 г., вносили ее в колбу с 90 мл стерильной воды для приготовления суспензии клеток почвенных микроорганизмов. Полученную суспензию хорошо взбалтывали на аппарате для встряхивания АВУ-6С в течение 5 минут, и после осаждения почвенных частиц, использовали для приготовления суспензий со степенью разведений от 10^{-2} до 10^{-7}. Для определения численности микроорганизмов из суспензий разных разведений осуществляли посев глубинным способом на плотные элективные питательные среды определенного состава.

Для выделения аммонифицирующих микроорганизмов использовали мясо-пептонный агар (МПА); микроорганизмы, использующие минеральные формы азота, в том числе и актиномицеты, выявляли на крахмало-аммиачном агаре (КАА); азотфиксирующие микроорганизмы – на среде Эшби; целлюлозоразрушающие микроорганизмы – на среде Гетчинсона; аэробные спорообразующие бактерии учитывали на питательной среде, состоящей из равных объемов мясо-пептонного агара и сусло-агара; микроскопические грибы – на среде Чапека.

Все микроорганизмы культивировали при температуре 28ºС. Затем проводили количественный учет выросших на чашках Петри колоний микроорганизмов. Количество микроорганизмов рассчитывали в колониеобразующих единицах (КОЕ) на грамм абсолютно сухой почвы. Полученные результаты обработаны статистически с применением программ Microsoft Excel и представлены в виде средних арифметических значений с указанием стандартных отклонений.

Установлено, что изученные экосистемы представлены различными типами почв, от песчаных неполно развитых на зарастающих дюнах Куршской косы (сосняк вейниково-булавоносный) до болотно-низинных-перегнойно-торфяных на польдерах (двукисточниково-манниковый фитоценоз). Показатели pH почвы изменялись от 4,4 в березняке осиново-кленово-подмаренниково-крапивном на болотной низинной торфяно-глеевой почве до 7,4 в агрофитоценозе на камбисолях (табл. 1).

Таблица 1. Геоботаническая характеристика ключевых участков Калининградского полуострова и Куршской косы

Участок	Название фитоценоза	Тип почвы	pH почвы
1	березняк осиново-кленово-подмаренниково-крапивный	болотная низинная торфяно-глеевая на моренных песках	4,4
2	осоково-подмаренниково-люпиновый	дерново-глеевая среднесуглинистая на моренных супесях	6,4
3	агрофитоценоз (озимая рожь)	камбисоль окультуренная среднесуглинистая на моренных суглинках	7,4
4	ельник буково-кисличный	камбисоль среднесуглинистая на моренных суглинках	5,4
5	двукисточниково-манниковый	болотная низинная перегойно-торфяная	7,1
6	ольс крапивно-подмаренниковый	болотная низинная торфяная глеевая маломощная на морских отложениях	6,6
7	сосняк злаково-разнотравный	дерново-торфяно-среднеподзолистая маломощная песчаная на эоловых глауконитовых песках	6,4
8	сосняк мохово-лишайниковый	торфянисто-поверхностно-подзолистая маломощная песчаная на эоловых глауконитовых песках	7,2
9	сосняк вейниково-булавоносный	песчаная неполно развитая	7,2
10	разнотравно-злаковый	дерново-среднеподзолистая иллювиально-железистая окультуренная песчаная на древнеаллювиальных отложениях	6,9

Почвы исследованных экосистем характеризовались различной влажностью с наименьшими показателями в сосняках на Куршской косе, которые в летний период в среднем варьировали от 1,4 % в сосняке вейниково-булавоносном на песчаной незакрепленной растениями дюне до 3,2 % в сосняке злаково-разнотравном на дерново-торфяно-среднеподзолистой маломощной песчаной почве и наибольшими показателями в болотных низинных почвах в березняке осиново-кленово-подмаренниково-крапивном (94,9 %) и в двукисточниково-манниковом фитоценозе на польдерах (141,4 %). Температура почвы в летнее время в среднем за период с 2009 года по 2012 год колебалась от 14,3˚С в болотной низинной торфяно-глеевой почве на моренных песках березняка осиново-кленово-подмаренниково-крапивного до 23,7˚С в песчаной неполно развитой почве сосняка вейниково-булавоносного на не закрепленной растениями дюне Куршской косы.

Важным качеством почвы является плодородие. Его можно оценить по биологической активности, основу которой составляет численность почвенных микроорганизмов [8]. В этом плане наибольший интерес представляют основные физиологические группы микроорганизмов, участвующие в процессах почвообразования и самоочищения почвы.

Изучение количественного содержания микроорганизмов, участвующих в процессе аммонификации показало, что их наибольшая численность выявлена летом 2009 года в почвах ельника буково-кисличного и двукисточниково-манникового фитоценоза, а в период с 2010 по 2011 год аммонификаторы превалировали в березняке осиново-кленово-подмаренниковом на болотной почве. Летом 2012 года наибольшая активность аммонифицирующих микроорганизмов была отмечена в почвах агрофитоценоза и сосняках – злаково-разнотравном и вейниково-булавоносном на Куршской косе. Микроорганизмы, использующие минеральные формы азота, в том числе и актиномицеты, выявляли на крахмало-аммиачном агаре. Установлено, что их численность в почвах всех исследованных ключевых участков варьировала в значительных пределах, а суммарное количество микроорганизмов использующих минеральные формы азота за период с 2009 года по 2012 год было наибольшим в ельнике буково-кисличного на камбисолях.

Среди всех микроскопических организмов, обитающих в почве, особая роль принадлежит азотфиксаторам, способным связывать молекулярный азот воздуха. Результаты исследования численности азотфиксирующих микроорганизмов в почвах различных экосистем Калининградского полуострова и Куршской косы показали, что наибольшей азотфиксирующей активностью характеризовалась почва двукисточниково-манникового фитоценоза и березняка осиново-кленово-подмаренниково-крапивного в 2009 и 2010 годах соответственно. Важным показателем качества почвы является ее целлюлозолитическая активность. Целлюлоза (клетчатка) – наиболее распространенный полисахарид растительного мира. Целлюлозу в почве разлагают бактерии, грибы, актиномицеты. Скорость разложения клетчатки зависит от наличия в почве легкодоступного азота, фосфора и других элементов и в целом отражает энергию мобилизации и направленность хода микробиологических процессов. Проведенные исследования показали, что численность целлюлозоразрушающих микроорганизмов была наибольшей в 2009 году в почвах всех исследованных экосистем, а самое высокое их содержание выявлено в окультуренных камбисолях агрофитоценоза с озимой рожью. Одним из показателей деструкционной функции микроорганизмов в почве является интенсивность минерализационных процессов, на которую влияет ряд экологических факторов. Спрогнозировать направленность и интенсивность процесса минерализации можно с помощью спорообразующих бактерий, обладающих более мощным ферментативным аппаратом по сравнению с неспороносными бактериями. Выявлено, что наибольшим содержанием аэробных спорообразующих бактерий отличались болотные низинные перегойно-торфяные почвы двукисточниково-манникового фитоценоза на польдерах, а наименьшим – дерново-среднеподзолистые иллювиально-железистые окультуренные песчаные почвы на древнеаллювиальных отложениях разнотравно-злакового фитоценоза.

Почва разнотравно-злакового фитоценоза характеризовалась более высоким уровнем микроскопических грибов. В этой почве наряду с дерново-торфяно-среднеподзолистой и торфянисто-поверхностно-подзолистой почвами сосняков Куршской косы численность микромицетов преобладала по сравнению с другими исследованными ключевыми участками. Изучение количественного содержания микромицетов и их соотношения с основными группами микробного населения почвы важно для понимания степени нарушенности экосистем и необходимо учитывать при изучении антропогенного воздействия на экосистемы. Например, увеличение численности микроскопических грибов в антропогенно-измененной почве можно связать с ее устойчивостью к неблагоприятным факторам среды. В процессе жизнедеятельности микромицеты выделяют в окружающую среду различные органические кислоты, которые, нейтрализуют токсическое действие тяжелых металлов, образуя с ними менее токсичные комплексы.

Просуммировав численность микроорганизмов на разных элективных питательных средах, можно судить о величине микробиологической активности, которая отражает биогенность почвы и является одним из показателей биологической активности почвы, обеспечивает ее плодородие и исключительную самоочищающую способность.

Проведенные исследования показали, что из всех исследованных ключевых участков, расположенных на территории Калининградского полуострова и Куршской косы наибольшей биологической активностью почвы в 2009 году характеризовался ельник буково-кисличный на камбисолях, в 2010 году – осоково-подмаренниково-люпиновый фитоценоз на дерново-глеевой среднесуглинистой почве на моренных супесях, в 2011 году – агрофитоценоз на камбисолях окультуренных среднесуглинистых на моренных суглинках и двукисточниково-манниковый фитоценоз на болотной низинной перегойно-торфяной почве, а в 2012 – агрофитоценоз (рис. 1).

На следующем рисунке представлена средняя за исследуемый период микробиологическая активность почв природных экосистем Калининградского полуострова и Куршской косы (рис. 2). Установлено, что агрофитоценоз и ельник буково-кисличный отличаются наибольшей численностью почвенных микроорганизмов, что свидетельствует об их высокой, по сравнению с другими ключевыми участками, биологической активности.

Почва является сложной и динамичной экосистемой, в которой происходят существенные физические, химические и биологические процессы. Накопление тяжелых металлов в почвах является одним из важных показателей загрязнения экосистем. Концентрация тяжелых металлов в исследуемых образцах почв не превышала ПДК. Исключение – мышьяк, во всех изученных экосистемах его концентрация в почвах превышала норму в 2–3,9 раза. При анализе содержания элементов в почвах участков исследования была выявлена положительная корреляция: As / Co ($r = 0,67$; $p < 0,05$), Zn / Ni ($r = 0,71$; $p < 0,05$), Zn / Cr ($r = 0,85$; $p < 0,05$), Ni / Co ($r = 0,67$; $p < 0,05$), Ni / Cr ($r = 0,59$; $p < 0,05$).

В процессе данной работы были изучены различные природные экосистемы, расположенные на территории Калининградского полуострова и Куршской косы. Проведенные исследования показали, что данные экосистемы отличаются не только характером почвенного покрова, но и видовым разнообразием растений, значениями pH почвенной среды и физическими показателями – влажностью и температурой. Установлено, что экосистемы представлены большим разнообразием почв, от песчаных неполно развитых на зарастающих дюнах Куршской косы до болотно-низинных-перегнойно-торфяных на польдерах Калининградского полуострова. В целом на изученной территории встречаются разные типы почв: торфяные болотные, дерново-глеевые, дерново-подзолистые, подзолистые и бурые лесные почвы.

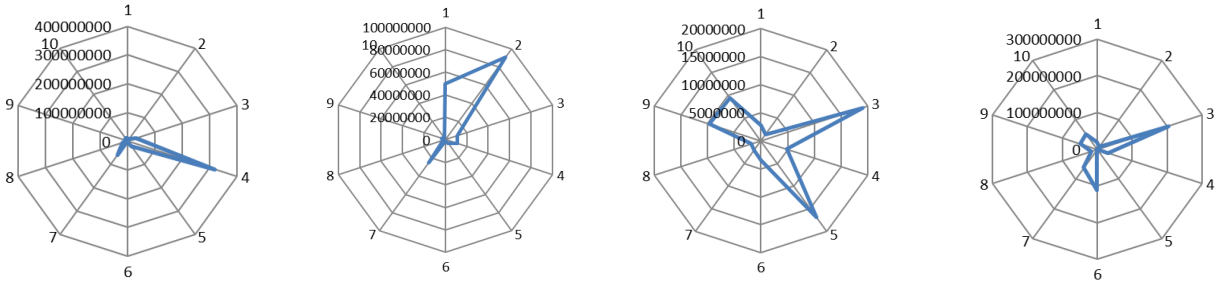


Рис. 1. Микробиологическая активность почв природных экосистем Калининградского полуострова и Куршской косы: 1 – березняк осиново-кленово-подмаренниково-крапивный; 2 – осоково-подмаренниково-люпиновый фитоценоз; 3 – агрофитоценоз (озимая рожь); 4 – ельник буково-кисличный; 5 – двукисточниково-манниковый фитоценоз; 6 – ольс крапивно-подмаренниковый; 7 – сосняк злаково-разнотравный; 8 – сосняк мохово-лишайниковый; 9 – сосняк вейниково-булавоносный; 10 – разнотравно-злаковый фитоценоз

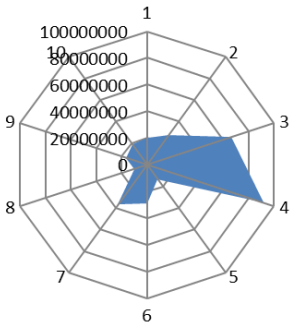


Рис. 2. Средняя микробиологическая активность почв природных экосистем Калининградского полуострова и Куршской косы

Определение численности представителей основных групп микробного сообщества почвы показало, что почвы природных экосистем Калининградского полуострова и Куршской косы отличаются количественным содержанием аммонифицирующих, азотфиксирующих, целлюлозоразрушающих микроорганизмов, микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, а также спорообразущих бактерий и микромицетов. В среднем за исследуемый период бурые лесные почвы агрофитоценоза и ельника буково-кисличного обладали наибольшей по сравнению с другими почвами численностью микроорганизмов, что указывает на их высокую биологическую активность. Данные показатели характеризуют состояние и устойчивость экосистем и отражают геоэкологические и биологические характеристики природных ландшафтов юго-восточной части Балтийского региона. Представленные природные ландшафты являются преобладающими на территории Калининградского полуострова и Куршской косы, что позволяют использовать их в качестве эталонных при исследовании урбанизированных экосистем для изучения трансформации микрофлоры и почвенного покрова под воздействием антропогенного фактора.

Данное исследование было поддержано в рамках реализации Программы повышения конкурентоспособности БФУ им. И. Канта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chen M., et al. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs // Biotechnol. Adv. 2015. Vol. 33. P. 745–755.
2. El fadeli S., Bouhouch R., El abbassi A., Chaik M., Aboussad A., Chabaa L., Lekouch N., Hurrell R.F., Zimmermann M.B., Sedki A. Health risk assessment of lead contamination in soil, drinking water and plants from Marrakech urban area, Morocco // J. Mater. Environ. Sci. 2014. Vol. 5. P. 225–230.
3. Pardo T., et al. Evaluation of the phytostabilisation efficiency in a trace elements contaminated soil using soil health indicators // J. Hazard. Mater. 2014. Vol. 268. P. 68–76.
4. Igbinosa E.O. Effect of cassava mill effluent on biological activity of soil microbial community // Environ. Monit. Assess. 2015. Vol. 187. P. 418.
5. Kurkina M.V., Dedkov V.P., Zotov S.I. An analysis of actinomycete complex structure in Cambisoil of South-East Baltic for the purposes of environmental monitoring // JMES. 2017 Vol.8. P. 1258–1265.
6. H-K. Song, et al. Adams Environmental filtering of bacterial functional diversity along an aridity gradient // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. P. 866.
7. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
8. Мосина Л.В. Основы экотоксикологии. М.: Изд-во РГАУ – МСХА, 2013. 99 с.

Актуальная биотехнология

№3 (34), 2020

УДК: 599.323.4: 574.4 (476)

СТРУКТУРА НАСЕЛЕНИЯ И БИОТОПИЧЕСКАЯ ПРИУРОЧЕННОСТЬ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ОТРЯДОВ ГРЫЗУНЫ И НАСЕКОМОЯДНЫЕ ЛУГОВЫХ И ЛЕСНЫХ ЭКОСИСТЕМ БЕЛАРУСИ

Е.И. Машков, Е.С. Гайдученко, А.И, Крищук

НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

ВВЕДЕНИЕ

Активное изучение териофауны Беларуси началось с середины 50-х годов прошлого века. Так, в 1954 году О.Н. Михолап [1] было установлено обитание 25 видов грызунов и насекомоядных. Также были даны рекомендаций по борьбе с мышевидными грызунами.

На основании экологических исследований мышевидных грызунов в отдельных районах Брестской, Минской и Витебской области в 1955–1964 гг. В.Ф. Терехович и И.Н. Сержаниным была установлена более высокая численность зверьков в южных районах республики, в то время как в центральных и северных районах численность значительно ниже [2].

Многолетние исследования проводимые Е.С. Гайдученко [3; 4] сезонных, возрастных и половых изменений морфологических и морфофизиологических признаков на многочисленных (рыжая полёвка, желтогорлая мышь, обыкновенная бурозубка) и малочисленных (малая бурозубка, тёмная полёвка и лесная мышь) видах мелких млекопитающих, проведенных в двух регионах Беларуси, в значительной мере восполнили пробел в изучении этой группы млекопитающих в белорусском участке ареала и в разработке проблемы адаптации и направлений микроэволюционных изменений.

В исследовании, проводимом в 2016–2019 гг., была установлена плотность популяций видов рода Microtus в долинных экосистемах Беларуси [5].

В настоящее время на территории Беларуси отряд грызунов представлен 26 видами из 7 семейств, из которых только 1 вид интродуцент (ондатра). В отряд насекомоядных обитающих на территории Беларуси входят 13 видов из 6 родов и 3 семейств [6].

Комплексное изучение экологических, и морфологических особенностей мелких млекопитающих представляет большой интерес для накопления фактов, необходимых для разработки рекомендаций по регулированию численности, предотвращению вспышек эпизоотий.

До настоящего времени ещё далеко неполно изучены грызуны в разных участках их огромного ареала.

Цель исследования – оценка видовой структуры ассоциаций мелких млекопитающих отрядов грызуны и насекомоядные.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для настоящей работы послужили данные, собранные на протяжении 2016–2019 гг. с помощью живоловушек трапикового типа и давилок Герро. Учет проводился по стандартной методике учета методом ловушко-суток [7]. Ловушки расставляли в линии по 25–50 штук на расстоянии 5 метров друг от друга. Постановка линий по 25 ловушек, дает возможность оценить равномерное распределение грызунов. В качестве приманки использовался геркулес, смоченный нерафинированным подсолнечным маслом. Возраст зверьков определяли по комплексу признаков: размерам тела, форме и размерам черепа, развитию гребней на черепе, наличию тимуса [8; 9].

По отработанной методике, ловушко-линии экспонировали на одном биотопе 3–5 суток [4, 5, 10, 11].

Пункты сбора материала приведены на рисунке 1.

В выборе мест проведения сбора полевого материала мы руководствовались тем, что в их число входят локалитеты, которые использовались ранее рядом авторов, что упрощает сравнение полученных нами данных с литературными.

За период ловов 2016–2019 гг. на территории Беларуси нами было отработано 18260 ловушко-суток на учетных площадках в 25 районах.

Относительная численность мелких млекопитающих определялась по формуле: $\text{Относительная численность} = \frac{n}{\text{количество ловушко–суток}} * 100$ (1); где n – число добытых зверьков.

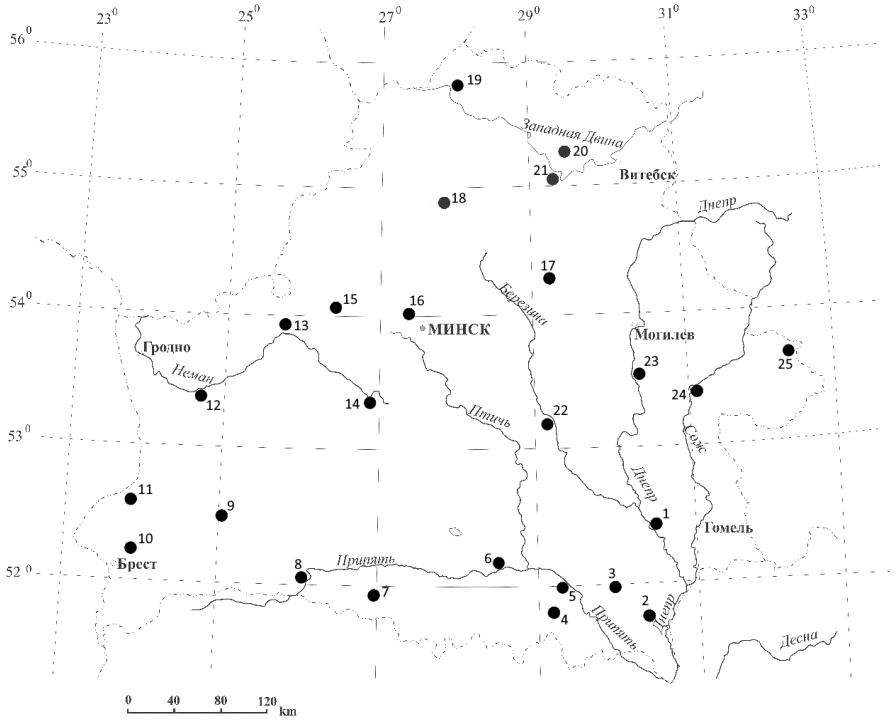


Рисунок 1 – Места сбора полевого материала: 1 – окр. д Чёрное, Речицкий район; 2 – окр. д. Иванки, Брагинский район; 3 – окр. г. Хойники; 4 – окр. д. Добрынь, Ельский район; 5 – окр. д. Мерабель, Мозырский район; 6 – окр. д. Лучицы, Петриковский район, Гомельская область; 7 – окр. г. Лядец, Столинский район; 8 – окр. д. Плещицы, Пинский район; 9 – окр. г. Белоозёрск, Березовский район; 10 – окр. г. Жабинка; 11 – окр. агр. Каменюки, Брестская область; 12 – окр. д. Мосты левые, Мостовский район; 13 – окр. д. Лукашино, Ивьевский район, Гродненская область; 14 – окр. д. Николаевщина, Столбцовский район; 15 – окр. д. Белокорец, Воложинский район; 16 – окр. д Романов, Молодечненский район; 17 – окр. д. Новая жизнь, Крупский район, Минская область; 18 – окр. д. Шнитки, Докшицкий район; 19 – окр. г. Верхнедвинск, Верхнедвинский район; 20 – окр. г. п. Шумилино; 21 – окр. д. Яновиль, Бешенсковичский район, Витебская область; 22 – окр. г. Бобруйск; 23 – окр. д. Воронино, Быховский район; 24 – окр. г. Славгород; 25 – окр. д. Тимошки, Климовичский район, Могилевская область.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2016–2019 годах для изучения оценки видовой структуры ассоциаций мелких грызунов и насекомоядных, были проведены их учетные ловы на территории шести областей Беларуси. В исследуемых экосистемах был установлен актуальный состав мелких млекопитающих.

В Гомельской области исследованиями охвачены 6 административных районов: Хойникский, Брагинский, Речицкий, Ельский, Петриковский и Мозырский. На юго-востоке Беларуси было выявлено 14 видов мелких грызунов (10) и насекомоядных (4). В видовой структуре ассоциаций мелких млекопитающих лесных экосистем (сосняки, черноольшанники, березняки) преобладали полевка рыжая *Myodes glareolus* и / или мышь желтогорлая *Apodemus flavicollis* в относительно суходольных биотопах и в более увлажненных добавляется мышь полевая *Apodemus agrarius* (таблицы 1–3). Субдоминантным видом была бурозубка обыкновенная *Sorex araneus* (Таблица 1).

В Витебской области исследования проведены в 4 административных районах: Докшицком, Бешенковичском, Шумилинском и Верхнедвинском. На севере Беларуси выявлено 15 видов мелких грызунов (11) и насекомоядных (4 вида). На разнотипных лугах выявлено 3–7 видов, и в видовой структуре мелких млекопитающих на внепойменных лугах и болотах доминировали бурозубка обыкновенная и / или бурозубка малая, и субдоминантами были полевка рыжая, а в некоторых более увлажненных местах полевка-экономка. На пойменных лугах доминировали полевка темная и полевка-экономка, а на лугах на мелиорированных землях, где ведется выпас скота – обыкновенная полевка.

На севере Беларуси в видовой структуре ассоциаций мелких млекопитающих лесных экосистем (черноольшанники, березняки) преобладали полевка рыжая и / или мышь желтогорлая, субдоминантным видом была бурозубка обыкновенная.

Таблица 1. Число видов мелких грызунов и насекомоядных

Область	Луговые биотопы		Лесные биотопы	
	Грызуны	Насекомоядные	Грызуны	Насекомоядные
Брестская	8	3	6	2
Гродненская	4	2	3	2
Гомельская	6	4	6	3
Витебская	7	4	6	3
Могилевская	5	2	4	1
Минская	7	3	4	2

В центральной части Беларуси, в Минской области, выявлено 11 видов мелких грызунов (восемь видов) и насекомоядных (три вида) (Таблица 1). В теплый период в видовой структуре на суходольных разнотравных лугах преобладали полевая мышь и полевка обыкновенная, а на лугах на мелиорированных землях вблизи большого города доминировала мышь-малютка. Довольно многочисленными были бурозубки малая и обыкновенная и мышь желтогорлая.

В целом для суходольных лугов центральной части Беларуси выявлено довольно высокое видовое разнообразие (5–7 видов). Наименьшее видовое разнообразие было в черноольшанниках и на участках сенокосных лугов – 3–4 вида.

В 2017–2019 годах на юго-востоке Беларуси (Брестская область) выявлено 14 видов мелких грызунов (11 видов) и насекомоядных (три вида). В видовой структуре ассоциаций мелких млекопитающих лесных экосистем (елово-сосновый лес, сосняк, дубрава, черноольшанник, осинник) преобладали полевка рыжая и / или мышь желтогорлая. Субдоминантным видом была бурозубка обыкновенная. Наиболее бедные ассоциации этих мелких млекопитающих сформировались в разнотипных сосняках (1–3 вида).

Наибольшее видовое разнообразие ассоциаций мелких грызунов и насекомоядных выявлено на открытых биотопах (разнотипные луга и открытые болота – 5–8 видов), что заметно больше, чем в лесных местах обитания (2–6 видов) и на используемых в сельском хозяйстве для сенокосов и пастбищ (2–5 видов) (Таблица 1).

В 2017–2019 годах в Гродненской области исследования проведены в 2 административных районах – Мостовском и Ивьевском.

Выявлено обитание семи видов мелких млекопитающих, из них 5 видов мелких грызунов. В разные годы и в разных биотопах доминировали в основном виды открытых пространств – полевая мышь, полевка обыкновенная либо полевка-экономка. В целом видовое разнообразие ассоциаций мелких млекопитающих было не особо большим, при наличии всего 2–4 видов.

На востоке Беларуси, в Могилевской области, исследования проведены в 4 районах – Бобруйском, Славгородском, Быховском и Климовичском, где выявлено 8 видов мелких млекопитающих. Наибольшее видовое разнообразие отмечено на луговых биотопах (3–6 видов). В лесных экосистемах доминировала рыжая полевка, а общее видовое разнообразие составило – 2–4 вида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На территории Беларуси в 2017–2019 годах выявлено обитание 17 видов мелких грызунов и насекомоядных. Все эти виды являются обычными и широко распространенными в нашей стране и приурочены к определенным местам обитания. При этом средняя бурозубка не регистрировалась на крайнем юго-востоке страны, мышовка лесная отлавливалась очень спорадически и единично. Очень редко регистрировалась водяная полевка, хотя известно, что этот вид в большом количестве обитал ранее в местах проведения учетных ловов на разнотипных низинных болотах и заболоченных лесах [12].

Как показали результаты исследования, в выборках долинных экосистем доминировали полевая мышь, рыжая полевка и обыкновенная бурозубка. В лесных экосистемах в годы проведения исследования, доминировала желтогорлая мышь и рыжая полевка.

Работа была поддержана БРФФИ на 2017–2019 гг. (проект Б17–121 «Распространение криптических видов рода Microtus в Беларуси по данным молекулярного и кариологического анализа»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Михолап, О.Н. Грызуны Полесской низменности и их хозяйственное значение: Автореф. дис… канд. биол. наук. – Мн., – 1954. – 11 с.
2. Терехович, В.Ф. Закономерности распространения мышевидных грызунов в лесах Белоруссии / В.Ф. Терехович // Клещевой энцефалит. – Минск: Беларусь, – 1965. – С. 284–290.
3. Гайдученко, Е.С. Численность биотопическое распределение мелких млекопитающих лесных массивов Гомельского Полесья / Е.С. Гайдученко // Diversitatea, valorificarea rationala si protectia animale lumii: Simpozion international consacrat celei de-a 70 a aniversari din ziua nasterii profesorului universitar Andrei Munteanu: colecţie de articole ştiinţifice/Institutul de Zoologieal ASM; resp. ed.: Mihai Papuc [şi alte]/ – Ch. – Stiinta, 2009 – H. 52–55.
4. Гайдученко, Е.С. Формирование комплексов мелких млекопитающих долинных лесных экосистем юго-востока Белорусского Полесья / Е.С. Гайдученко // Веснік Мазырскага дзяржаунага педагагічнага ун-та імя І.П. Шамякіна. – 2013. – № 1(38). – С. 9–14.
5. Машков, Е.И. Оценка плотности популяций видов рода Microtus долинных экосистем Беларуси / Е.И. Машков, Е.С. Гайдученко, И.А. Крищук, И.А. Соловей // Веснік Магілёўскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя А.А. Куляшова. – Серыя В. Прыродазнаўчыя навукі – Могилев. – 2019. – № 4 – С. 96–109.
6. Савицкий, Б.П. Млекопитающие Беларуси / Б.П. Савицкий, С.В. Кучмель, Л.Д. Бурко; под ред. Б.П. Савицкого. – Минск: Белорусский государственный университет, – 2005. – 317 с.
7. Шефтель Б.И. Методы учета численности мелких млекопитающих / Б.И. Шефтель // Russian Journal of Ecosystem Ecology. – 2018. – № 3. – С. 1–21.
8. Карасева, Е.В. Экологические различия двух близких видов – обыкновенной и восточноевропейской полевок / Е.В. Карасева, Н.В. Степанова, А.Ю. Телицына // Синантропия грызунов. – 1994. – М., – С. 60–76.
9. Окулова, Н.М. Краниометрическая диагностика трех близких форм обыкновенной полевки Microtus arvalis s.l. / Н.М. Окулова, М.И. Баскевич // Докл. РАН. – 2008. – Т.412. – № 3. – С. 427–429.
10. Соловей, И.А. Ландшафтно-биотопические различия и сезонно-межгодовая динамика ассоциации мелких грызунов в хвойно-мелколиственных комплексах Белорусского Поозерья: автореф… дисс. канд. биол. наук: 03.00.08 / И.А. Соловей; Нац. Акад. наук, ин т зоологии. – Минск, – 2005. – 21 с.
11. Зенина, И.М. Мелкие млекопитающие трансформированных территорий Центрального Полесья / И.М. Зенина // Фауна в антропогенному середовищі – Луганськ. – 2006. – Вып. 8. – С. 165–174.
12. Сидорович, В.Е. Пищевая ниша и диетическое совпадение у сов северной Беларуси / В.Е. Сидорович, В.В. Ивановский, С.Г. Адамович // Vogelwelt 124: – 2003. – С. 271–279.

УДК 628.355

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АКТИВНОГО ИЛА ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ ХИМИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Е.В. Перушкина[1], Е.Н. Семенова[2]

[1]Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Россия
[2] ПАО «Метафракс», Губаха, Россия

Наращивание производственных мощностей и расширение ассортимента предприятий химической и нефтехимической отраслей промышленности приводят к проблеме увеличения нагрузки на активный ил аэротенков. Модернизация существующих производств и их постоянное развитие несомненно отражаются на многокомпонентности и сложности состава загрязнителей сточных вод, которые во многом обуславливают недостаточную степень очистки и превышению предельно допустимых концентраций загрязняющих веществ, в том числе и токсичных.

Целью настоящей научно-исследовательской работы являлась оценка свойств биоценоза активного ила очистных сооружений ПАО «Метафракс» в условиях повышенных нагрузок по основным органическим токсичным компонентам производственных сточных вод.

Активный ил аэротенков биологических очистных сооружений ПАО «Метафракс» представляет собой мелкие хлопья от светло – до темно-коричневого цвета, которые состоят из большого числа многослойно расположенных или флоккулированных клеток. Биоценоз активного ила характеризуется большим видовым разнообразием. В различное время проведены наблюдения таких микроорганизмов как *Eospora najas, Dero furcata*, р. *Arcella*, р. *Tardigrada*, р. *Cyclopidae*, р. *Aelosoma*, р. *Tokophrya*, р. *Euplotes* и других.

Непостоянный состав и концентрации загрязняющих веществ производственных сточных вод влияют на развитие отдельных групп микроорганизмов. Экспериментально установлено, что действие других факторов – температуры, перемешивания, концентрации растворенного кислорода – практически не изменяет качественного состава илов, но влияет на количественное соотношение различных групп микроорганизмов.

Биологические очистные сооружения химического производства включают стадии усреднения промышленных и городских хозяйственно-бытовых сточных вод, их механическую очистку и первичное отстаивание. Экспериментально доказано, что стойкость пробы поступающего промышленного стока составляет 23 % и достигает 26 % в первичном отстойнике вследствие присутствия трудноокисляемых компонентов. С точки зрения биологической очистки высокая стойкость отходов с содержанием биоцидов, токсикантов и инертных примесей негативно сказывается на функционировании микроорганизмов активного ила.

Следует отметить, что в состав анализируемых производственных сточных вод входят метанол и формальдегид. Известно, что при значительных концентрациях указанные соединения способны оказывать токсичное действие на микроорганизмы. Результаты настоящих исследований проб активного ила на воздействие залповых нагрузок по загрязнителям отразили высокую адаптационную способность активного ила аэротенков к концентрациям метанола до 300 мг/л и формальдегида до 100 мг/л. Увеличение концентрации формальдегида до 300 мг/л оказало губительное действие на микроорганизмы, о чем свидетельствует обнаружение оторванных зооид прикрепленных инфузорий и инкапсулированных коловраток, нарушение структуры хлопка активного ила при удовлетворительном общем состоянии.

Таким образом, длительная эксплуатация очистных сооружений в условиях непостоянной концентрации токсичных органических загрязнителей сточных вод позволила адаптироваться биоценозу активного ила к высокому содержанию метанола. Залповые показатели формальдегида в составе отходов свидетельствует о наступлении неблагоприятных токсичных условий для развития микроорганизмов.

УДК 66.047

ВЛИЯНИЕ НИТРАТА СВИНЦА НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ

А.А. Празян, С.В. Битаришвили, Е.С. Макаренко, М.А. Лыченкова, М.С. Подлуцкий

Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии» Обнинск, Россия

В условиях роста техногенной нагрузки проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами приобрела особую актуальность. Свинец считается одним из наиболее токсичных тяжелых металлов и относится к первому классу опасности вредных веществ. Основными источниками его поступления в окружающую среду являются автомобильные выхлопы, выбросы заводов, добавки в пигменты, удобрения и пестициды, производство металлических покрытий, хранилища источников питания, отходы горной промышленности и др.

В почве катионы металла быстро связываются с образованием малорастворимых соединений, и прочно удерживаются почвенными коллоидами. Попадая в растения из почвы или в виде аэрозолей, свинец накапливается преимущественно в корнях [1]. В присутствии высоких концентраций свинца происходит выраженное ингибирование роста и снижение биомассы растений [3].

Повсеместное загрязнение тяжелыми металлами почв, в том числе и сельскохозяйственных угодий, создает потребность в исследованиях механизмов их действия на ценные культуры растений. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение действия $Pb(NO_3)_2$ на морфологические параметры проростков ячменя. Данная работа представляет собой первый этап комплексного исследования влияния свинца на сельскохозяйственные культуры, включающего биохимические и генетические показатели.

В качестве объекта исследования был выбран яровой ячмень (Hordeum vulgare L.) сорта Нур (первая репродукция, урожай 2019 г.). Ячмень является распространённой сельскохозяйственной культурой и хорошо изученным биологическим объектом.

Для оценки действия свинца использовали соль $Pb(NO_3)_2$, разведенную в концентрациях 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8 мг Pb^{2+}/мл. Семена ячменя проращивали в рулонах фильтровальной бумаги и полиэтиленовой пленки согласно ГОСТ 12038–84 [3] и рекомендациям Р.С. Бабаян [2]. В каждом рулоне в среднем по 100 семян. Рулоны ставили в стаканы с растворами $Pb(NO_3)_2$ (100 мл) и помещали в инкубатор (MIR-254, “Sanyo”, Япония) для проращивания при постоянной температуре 20 °С. На седьмой день оценивали длину побега и корня, массу корешков и также процент всхожести семян в соответствии с ГОСТ 12038–84 [3].

Экспериментальные данные проверяли на наличие значений, выходящих за пределы 95 % доверительного интервала. Результаты анализировали статистическими методами с использованием STATISTICA 6.0 и R. Статистическую значимость отличий оценивали с помощью критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни.

Исследование зависимости показателей длины побега и корня к действию свинца было проведено в трех повторностях с широким диапазоном концентраций от 1 до 8 мг/мл для выявления ингибирующего и стимулирующего эффекта. В результате эксперимента было показано, что применение свинца в данных концентрациях ведет к снижению длины корней и увеличению длины побегов у проростков ячменя сорта Нур.

Статистически значимое увеличение длины побега (112.37 мм) отмечали уже при концентрации 1.5 мг/мл, в то время как контрольные значения не превышали 95 мм (рис. 1). В дальнейшем с увеличением концентраций эффект сохранялся. Максимальное значение длины побега (118.65 мм) зафиксировано при концентрации 6 мг/мл.

В случае с корнями (рис. 2) наблюдался противоположный эффект: начиная с концентрации Pb 1 мг/мл, выявлено ингибирование роста корней (111.76 мм) относительно контроля (140.67 мм), которое сохранялось с увеличением концентрации свинца.

При повышении концентрации более 1,5 мг/мл наблюдалось изменение цвета корней, свидетельствующее о некрозе. С увеличением концентрации тяжелого метала, степень некротических повреждений усиливалась.

При использовании концентраций 1; 1.5; 2 мг/мл масса корней проростков ячменя незначительно увеличивалась (рис. 3). При концентрациях 2.5–8 мг/мл масса корней статистически значимо снижалась, при этом росла степень нектического поражения. Исключение составляет концентрация 6 мг/мл, при которой масса корней не отличается от контроля.

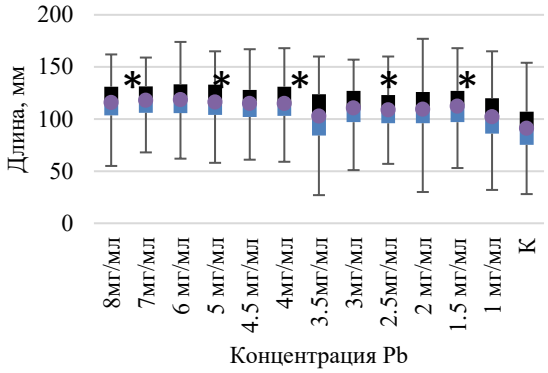


Рисунок 1. Зависимость длины побега от концентрации Pb.
* Различия статистически значимы по сравнению с контрольными значениями, $p < 0.05$.

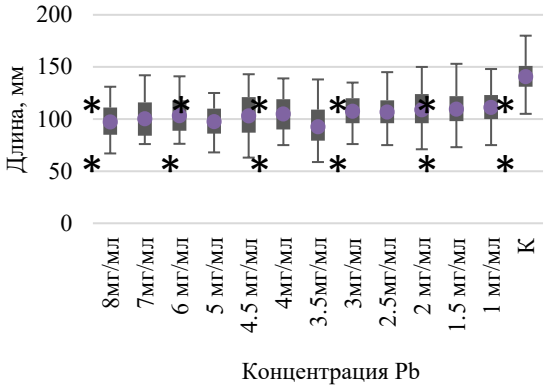


Рисунок 2. Зависимость длины корня от концентрации Pb
* Различия статистически значимы по сравнению с контрольными значениями, $p < 0.05$

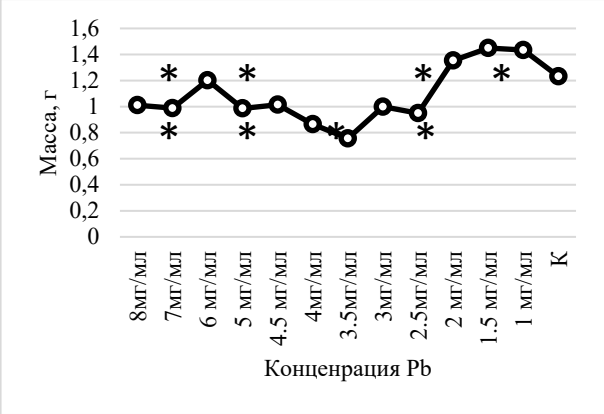


Рисунок 3. Зависимость массы корня от концентрации Pb
* Различия статистически значимы по сравнению с контрольными значениями, $p < 0.05$

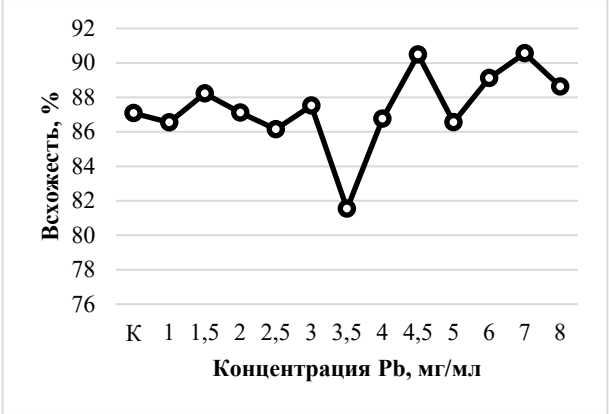


Рисунок 4. Зависимость процента всхожести семян от концентрации Pb

При анализе всхожести семян (рис. 4) исследовались 69 рулонов, в среднем по 100 семян в каждом. Было выяснено, что процент всхожести варьируется от 81 % до 91 %, наименьший процент обнаружен при концентрации 3.5 мг/мл.

В ходе исследования морфологических параметров проростков ячменя в результате действия свинца было выявлено уменьшение длины и массы корней и их поражение некрозом, и увеличение длины побегов. Вероятно, стимуляция роста побегов связана с перераспределением питательных веществ и энергии в проростках. Серьезные повреждения корневой системы, вероятно, приведут к ингибированию роста и развития растения в последующем ходе онтогенеза, т. к. корень выполняет важнейшие функции, такие как всасывание и проведение воды и минералов, синтез биологически активных веществ и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Ю.В. Тяжелые металлы в почвах и растениях. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 170 с.
2. Бабаян Р.С. Проращивание семян в рулонах из фильтровальной бумаги и полиэтиленовой пленки // Сельскохоз. биология. 1981. No 3.С. 473–475
3. ГОСТ 12038–84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Межгосударственный стандарт. Стандарты на методы контроля. М., 2002. 28 с Гуральчук, Ж.З. Механизмы устойчивости растений к действию тяжелых металлов / Ж.З. Гуральчук // Физиология и биохимия культурных растений. – 1994. – Т.26. – No2. – С. 107–117
4. Ильин Б.В. Тяжелые металлы в системе почва – растение. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. – 151 с.

УДК 66.047 УДК: 573.6:579.844

ЦИАНОБАКТЕРИИ КАК БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ ГЛОБАЛЬНОГО ПОТЕПЛЕНИЯ

В.Б. Сбойчаков[1], А.Л. Панин[2]

1 –«Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

2 –Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В двадцатые годы XXI века глобальное потепление климата стало уже главной экологической проблемой. Долгосрочное повышение средней температуры климатической системы Земли наблюдается уже более века. Основной причиной этого явления считается антропогенный фактор [22, 28]. Это признается и на правительственном уровне, и большинством ученых. Как отмечается в публикации B.D. Santer и соавт. [29] степень уверенности в том, что изменение климата вызвано деятельностью человека, достигла так называемого «золотого стандарта» в пять сигм (99,9999 % вероятности неслучайного результата).

Для объективной оценки изменения климата необходима разработка индикаторов. Наиболее оптимально использование биологических индикаторов, то есть живых организмов, реагирующих на изменения окружающей среды [1, 10]. Одними из таких биологических индикаторов могут служить цианобактерии, водные микроорганизмы, которые широко распространены в водоемах. За последние несколько десятков лет их численность резко увеличилась. С жизнедеятельностью цианобактерий связано цветение воды в озерах, водохранилищах и реках по всему миру. Это становится комплексной экономической и экологической проблемой, так как затрагивает вопросы очистки водных ресурсов, морской логистики и туризма [8, 19, 33].

Цель работы – изучение роли цианобактерий в составе цианобактериальных матов как биологических индикаторов глобального потепления в Антарктике.

Цианобактерии (сине-зелёные водоросли) являются крупными грамнегативными бактериями. Они близки к древнейшим микроорганизмам. Это единственные бактерии, способные к оксигенному фотосинтезу. Цианобактерии относятся к наиболее сложно организованным и морфологически дифференцированным прокариотам. Сам по себе факт их выживания в современной биосфере свидетельствует об их огромном адаптационном потенциале [6, 21, 27, 31].

Цианобактерии являются объектом тщательного изучения как альгологов (как организмы, схожие с эукариотическими водорослями), так и бактериологов (как прокариоты). Сравнительно крупные размеры клеток и сходство с водорослями и было причиной их рассмотрения ранее в составе растений («сине-зелёные водоросли»). За это время альгологически описано более 1000 видов в почти 175 родах. Бактериологическими методами в настоящее время подтверждено существование не более 400 видов. Биохимическое, молекулярно-генетическое и филогенетическое сходство цианобактерий с остальными бактериями в настоящее время объективно доказано [24, 31].

Способность к азотфиксации делает цианобактерии весьма перспективными продуцентами белка, что широко используется в сельскохозяйственной биотехнологии [3, 16]. Даже в симбиозе с другими организмами (грибы, мхи и т. д.), цианобактерии не теряют способности фиксировать азот. В странах Юго-Восточной Азии используют цианобактерии вида *Anaboena azollae* в качестве азотного удобрения рисовых полей. Азотфиксирующая функция цианобактерий позволит сэкономить энергию, затрачиваемую при химическом синтезе аммиака в производстве дорогостоящих химических удобрений [3].

Цианобактерии интенсивно используются в биотехнологии как модельные организмы для изучения фундаментальных биологических процессов: фотосинтез и его генетический контроль; фоторегуляция генной экспрессии; клеточная дифференцировка и фиксация азота; метаболизм азота, углерода и водорода; устойчивость к стрессовым факторам окружающей среды; биологические часовые механизмы в клетке, клеточное деление, молекулярная эволюция. Наличие эффективных генетических методов позволило использовать цианобактерии в биотехнологии для производства специфических продуктов, для биодеградации органических загрязнений и других целей [6, 12, 14].

Цианобактерии как древнейшие организмы первоначально существовали в виде симбиозов, прежде всего с бактериальной гетеротрофной микробиотой, выполняющей роль редуцентов и стабилизирующей существование первичного ценоза. Цианобактерии часто вступают в симбиоз с грибами (образуя самые выносливые лишайники), мхами, папоротниками.

Способность цианобактерий входить в симбиотические отношения с разнообразными представителями флоры и фауны развилась в процессе эволюции жизни на Земле. Это и послужила основой для их сохранения и широкого распространения в определенных экотопах [6, 11, 14, 20, 23, 32]. Благодаря миксотрофности и азотфиксации диапозон условий, в которых цианобактерии способны обитать, чрезвычайно широк. Они первыми заселяют обнаженные после вулканических извержений или ядерных взрывов скалы, создавая органическое вещество, формируя почвы. Цианобактерии способны длительное время сохранять жизнеспособность при засухе; выживать при очень низких и очень высоких температурах; противостоять сильной инсоляции; выдерживать радиоактивное излучение; быть толерантными к высоким концентрациям солей; выносить действие токсикантов; вегетировать в анаэробных восстановительных условиях и т. д. [7, 17].

В этом году исполняется ровно 100 лет со дня открытия русской экспедицией под руководством Фаддея Беллинсгаузена и Михаила Лазарева загадочного «шестого континента» или Антарктиды. Расширение российского присутствия на этом континенте отвечает как научным, экономическим, так и геополитическим интересам России. Однако в последнее время, глядя на Землю из космоса можно наблюдать, что Антарктида «зеленеет» [34]. Глобальное потепление вызывает цветение так называемых «снежных водорослей» по всей поверхности снега вдоль береговой линии. В действительности эти «снежные водоросли» являются цианобактериями. По мере увеличения температуры их общая масса будет только увеличиваться [18, 19].

Актуальность охраны Антарктиды связана с глобальным потеплением климата. Вначале при комплексном обследовании прибрежных территорий, характеризующихся наибольшим биоразнообразием в Антарктике, специальное внимание было уделено лишайникам, как индикаторам состояния полярных экосистем [2]. Однако в ходе последующих обследований было обнаружено, что в ряде районов Антарктиды, различающихся по климатическим условиям и степени антропогенной нагрузки, доминируют цианобактерии [13, 15, 18]. В отсутствие или слабо выраженной конкуренции со стороны более развитых форм жизни в Антарктиде формируются так называемые цианобактериальные маты. Это – высокоинтегрированные прокариотные сообщества, связанные синтрофическими отношениями. Основными компонентами этих матов являются фотосинтезирующие цианобактерии. Маты можно назвать автономным сообществом, где присутствуют и продукционная ветвь углеродного цикла, осуществляемая цианобактериями, и деструкционная ветвь, осуществляемая другими бактериями.

Маты заселяют грунты после освобождения пространства от ледников, участвуют в почвообразовании и первыми реагируют на экологические изменения. Приурочены они к местам таяния льда, концентрации птиц и постоянного антропогенного загрязнения, в том числе и на удалении от объектов антарктических экспедиций. Близость матов к полярным станциям позволяет предположить, что они реагируют на изменения условий обитания под влиянием человека и могут быть использованы в целях биоиндикации [1, 4, 13, 15].

Цианобактериальные маты также могут включать в себя соли тяжелых металлов и нефтепродукты. Однако, вопросы формирования разнообразия цианобактериальных матов и взаимодействия микроорганизмов различных трофических групп, остаются недостаточно исследованными.

На территориях постоянно действующих научных станций и сезонных полевых баз Российской антарктической экспедиции было проведено изучение цианобактериальных матов как биологических индикаторов глобального потепления в результате антропогенной деятельности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили образцы цианобактериальных матов и полученные из них субстраты, отобранные в районах полярных станций «Прогресс», Новолазаревская», «Беллинсгаузен», обсерватории «Мирный», полевой базы «Дружная-4». За период полевых работ исследовано 77 цианобактериальных матов в восточной и западной частях Антарктиды. Для привязки к местности применялся GPS-навигатор фирмы Garmin-60 CSx. Бурение льда на поверхности озер осуществлялось с помощью мотобура Hitachi (диаметр шнека 200 мм, толщина льда до 3 м). Отбор проб донных отложений производили трубчатым дночерпателем (стратометром) в соответствии с ГОСТ 31861–2012 [9].

Исследуемый материал забирали в стерильные контейнеры и пробирки с транспортной средой. Пробы в течение 24 ч доставляли в лабораторию научно-экспедиционного судна «Академик Фёдоров» и до проведения исследований в судовой лаборатории сохраняли при температуре +4°С. Часть материала сохраняли при –25°С в морозильной камере до завершения экспедиции для идентификации цианобактерий и других микроорганизмов классическими микробиологическими методами. Штаммы бактерий, которые не удалось идентифицировать с помощью биохимических тестов, были изучены с помощью технологии MALDI TOF на приборе Bruker Daltonics.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что количество обнаруженных цианобактериальных матов на загрязненных территориях заметно превышает их число на экологически чистых территориях Антарктики, а их контаминация посторонней микробиотой в нарушенных экосистемах возрастает в 1,5–3 раза. Обнаружение патогенных штаммов иерсиний *(Yersinia enterocolitica)*, а также условно-патогенных псевдомонад и микромицетов в составе матов, формирующихся вблизи полярных станций, является основанием для создания системы экологического мониторинга в местах присутствия человека в Антарктике [4].

Цианобактериальные маты состояли из нитчатых, колониальных и одноклеточных цианобактерий. В 77 % образцов обнаружены цианобактерии родов *Pseudanabaena, Leptolyngbya, Oscillatoria, Nostoc*. Они являлись основными компонентами микробных матов и выживали в широких диапазонах освещенности и колебаний температуры.

Для цианобактериальных матов характерно разнообразие окраски, зависящее от доминирования определенных групп организмов в их поверхностном слое и от состава субстрата, на котором развиваются данные сообщества. Чаще встречались маты сине-зеленого, черного, бурого, рыжего и сероватого цветов. Редко обнаруживали красную и пурпурную окраску.

Толщина цианобактериальных матов оказалась весьма изменчивой. Первичные маты были достаточно тонкими, а многолетние – имели значительную толщину и хорошо выраженную слоистость, образованную чередованием органических и минеральных слоев. Для всех этих образований характерно наличие нескольких основных зон, имеющих определенный набор микроорганизмов с присущим только им метаболизмом. Первая зона оксигенного фотосинтеза с цианобактериями характеризовались рыхлой структурой. В ней сосредоточено основное видовое многообразие микроорганизмов. Анаэробная зона достигала в озерных матах толщины нескольких десятков сантиметров. Для слоев с анаэробной деструкцией была характерна сложная последовательность реакций, осуществляемых различными функциональными группами организмов. Нижние слои цианобактериальных матов плавно переходили в полностью минерализованные осадки, в образовании которых принимали активное участие микроорганизмы.

В результате глобальных изменений климата, увеличения концентрации углекислого газа цианобактерии, изменяя механизмы жизнеобеспечения, приобретают токсические свойства [5, 12, 24, 25, 26]. Цианобактерии синтезируют широкий спектр токсинов (био- и цитотоксины). Токсины обладают нейротоксичностью, иммунотоксичностью, генотоксичностью и мутагенностью, канцерогенностью, эмбриотоксичностью и дерматотоксичностью [30]. Гепатотоксины продуцируют штаммы цианобактерий *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Nodularia, Nostoc, Cylindrospermopsis* и *Umezakia*. Нейротоксины производят штаммы *Aphanizomenon* и *Oscilatoria*. Цианобактерии вида *Cylindroapermopsis raciborski* могут также производить токсичные алкалоиды, поражающие желудочно-кишечный тракт и почки [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цианобактериальные маты в районах расположения полярных станций в Антарктике имеют двоякое значение. С одной стороны, они создают биологические субстраты, которые в Антарктиде представлены весьма скудно. Это своеобразные места концентрации микроорганизмов, что составляет основу антарктических экосистем. Маты обладают устойчивостью к высокому уровню ультрафиолетового излучения, препятствуют смыву потоком воды органических веществ, поскольку клейкие вещества скрепляют частицы грунта и тем самым защищают первичную почву от эрозии. С другой стороны, в цианобактериальных матах могут создаваться условия сохранения и размножения патогенных и условно патогенных микроорганизмов. Это способно привести к изменчивости микробиоты в окружающей среде прибрежных полярных станций и может потенциально представлять опасность возникновения заболеваний у людей и животных.

Некоторые виды цианобактериальных матов могут быть токсичны. С учетом наличия матов в русле водотоков и на дне водоемов, примыкающих к полярным станциям и используемых в качестве источников для хозяйственно-бытовых нужд и водоснабжения, необходимо изучать состав цианобактериальных матов и с токсикологической точки зрения. Кроме того, в этих образованиях могут накапливаться нефтепродукты и опасные для здоровья вещества.

Вполне вероятно, что глобальное потепление климата, в особенности проявляющееся в полярных зонах, будет способствовать более продолжительному и токсичному «цветению» воды в период планктонной стадии развития космополитных и эндемических видов цианобактерий. Сюда будут входить и теплолюбивые виды, ранее массово не развивались в исследуемых регионах. Увеличение или уменьшение количества термофильных видов цианобактерий является объективным биологическим индикатором изменения климата. Практическое значение изучения цианобактерий состоит в том, что они являются объективным индикатором санитарно-эпидемического состояния районов размещения полярных станций и полевых баз, что может быть использовано в целях мониторинга антропогенного воздействия на экосистемы Антарктики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абакумов Е.В. и др. Изменение микробных сообществ в первичных почвах и грунтах в районе антарктической станции Мирный при антропогенном влиянии // Гигиена и санитария. – 2017. – Т. 96, № 10. – С. 949–955.
2. Андреев, М.П. Современные ботанические исследования российских ученых в континентальной Антарктике / М.П. Андреев, Л.Е. Курбатова // Российские полярные исследования. – № 1. – 2012. – С. 23–24.
3. Баймаханова, Г.Б. и др. Создание консорциумов на основе цианобактерий для применения в агробиотехнологии // Известия НАН РК, Серия биологическая и медицинская. – 2014. – № 5. – С. 35–39.
4. Белов, А.Б. и др. Теория сапронозных инфекций: история развития и пути совершенствования в системе медико-биологических наук // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – № 97(1). – С. 91–101.
5. Волошко, Л.Н. Токсины цианобактерий (Cyanobacteria, Cyanophyta) / Л.Н. Волошко, А.В. Плющ, Н.Н. Титова // Альгология. – 2008. – № 18 (1). – С. 3–20.
6. Горелова, О.А. Растительные синцианозы: изучение роли макропартнера на модельных системах / О.А. Горелова: Автореф. дисс…докт. биол. наук. – М. 2005. – 47 с.
7. Громов, Б.В. Цианобактерии в биосфере // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 9. – С. 33–39.
8. Капков, В.И. Сукцессии цианобактерий в водоемах бореальной зоны / В.И. Капков, С.Г. Васильева, Е.С. Лобакова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 95(4). – С. 100–107.
9. Межгосударственный стандарт ГОСТ 31861–2012 «Вода. Общие требования к отбору проб» (введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1513 ст).
10. Неверова О.А. Применение фитоиндикации в оценке загрязнения окружающей среды / О.А. Неверова // Биосфера. – Том № 1. – № 1. – 2009. – С. 82–92.
11. Немцова, Н.В. Биомедицинский потенциал альго-бактериальных биоценозов / Н.В. Немцова, О.А. Гоголева, М.Е. Игнатенко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 94(4). – С. 82–87.
12. Поляк, Ю.М. Токсигенные цианобактерии: распространение, регуляция синтеза токсинов, способы их деструкции / Ю.М. Поляк, В.И. Сухаревич // Вода: химия и экология. – 2017. – № 11. – С. 125–139.
13. Панин, А.Л. Природно-техногенная очаговость инфекционных болезней на территории антарктических поселений / А.Л. Панин, В.Б. Сбойчаков, А.Б. Белов и др. // Успехи современной биологии. – 2016. – № 136 (1). – С. 53–67.
14. Панкратова, Е.М. Симбиоз как основа существования цианобактерий в естественных условиях и в конструируемых системах / Е.М. Панкратова, Л.В. Трефилова // Теоретическая и прикладная экология. – 2007. – № 1. – С. 4–14.
15. Сбойчаков, В.Б. Природно-очаговые инфекции шестого континента: ретроспективный взгляд в будущее / В.Б. Сбойчаков, А.Л. Панин, А.Б. Белов // Национальные приоритеты России. – 2014. – № (3). – С. 86–89.
16. Трефилова, Л.В. Использование цианобактерий в агробиотехнологии / Л.В. Трефилова: Автореф. дис… канд. биол. наук. – Саратов. – 2008. – 25 с.
17. Штина, Э.А. Экология почвенных водорослей / Э.А. Штина, М.М. Голлербах. – М.: Наука, 1976. – 143 с.
18. Bonnedahl, J. In search of human associated bacterial pathogens in Antarctic wildlife: report from six penguin colonies regularly visited by tourists / J. Bonnedahl, T. Broman, J. Waldenström et al. // Ambio. – 2005. – № 34(6). – P. 430–432.
19. Davis, T.W. et al. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of Microcystis during cyanobacteria blooms // Harmful Algae. – 2009. – V. 8. – P. 715–725.
20. De Morais, P. Cyanobacterium Microcystis aeruginosa response to pentachlorophenol and comparison with that of the microalga Chlorella vulgaris / P. De Morais, T. Stoichev, M.C.P. Basto et al. // Water Res. – 2014. – V. 52. – P. 63–72.
21. Harke, M.J. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, / M.J. Harke, M.M. Steffen, C.J. Gobler et al. // Harmful Algae. – 2016. – V. 54. – P. 4–20.
22. Key World Energy Statistics 2019. International Energy Agency. 26 September 2019. – P. 6–36.
23. Kuno, S. et al. Intricate interactions between the bloom-forming cyanobacterium Microcystis aeruginosa and foreign genetic elements, revealed by diversied clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) signatures // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78, № 15. P. 5353–5360.
24. Martins, J.C. Microcystin dynamics in aquatic organisms / J.C. Martins, V.M. Vasconcelos // J. Toxicol. Environ. Health Brit. Rev. – 2009. – V. 12, № 1. – P. 65–82.
25. Merel, S. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins / S. Merel, D. Walker, R. Chicana et al. // Environ. Int. – 2013. – V.59. – P. 303–327.
26. Miller, T.R. Cyanobacterial toxins of the Laurentian Great Lakes, their toxicological effects, and numerical limits in drinking water / T.R. Miller, L.J. Beversdorf, C.A. Weirich, S.L. Bartlett // Marine Drugs. – 2017. – V. 15, № 6. – P. 160.
27. Paerl, H.W. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls / H.W. Paerl, T.G. Otten // Environ. Microbiol. – 2013. – V. 65. – P. 995–1010.
28. Robock, A. Volcanic eruptions and climate // Rev. Geophys. – 2000. – № 38. – P. 191–219.
29. Santer, B.D. Celebrating the Anniversary of Three Key Events in Climate / B.D. Santer, C.J.W. Bonfils, Q. Fu et al. // Nature Climate Change. –2019. – № 9. – P. 180–182.
30. Sivonen, K. Cyanobacterial toxins / K. Sivonen, G. Jones // Toxic Cyanobacteria in Water / Eds. Chorus I., Bartram J. London: E&FN Spon, 1999. – P. 41–111.
31. The ecology of cyanobacteria II: their diversity in time and space / Ed.: B.A. Whitton. Netherands: Springer, 2012. – 760 p.
32. Wang, L.C. Allelopathic effects of Microcystis aeruginosa on green algae and a diatom: evidence from exudates addition and co-culturing / L.C. Wang, J.M. Zi, R.B. Xu et al. // Harmful Algae. – 2017. – V. 61. – P. 56–62.
33. Zaharia, A.M. First report of toxic Cylindrospermopsis raciborskii and Raphidiopsis mediterranea (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh water / A.M. Zaharia // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – V. 59. № 3. – P. 749–761.

УДК 640

МЕТАНОГЕННАЯ КОНСОРЦИЯ НА ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ: КОМПОНЕНТЫ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА И ИХ ВОЗМОЖНЫЕ ФУНКЦИИ

Е.М. Семенова, Д.С. Груздев, Т.П. Турова, Т.Н. Назина

Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия

Разработка нефтяных месторождений, содержащих легкую кондиционную нефть, приводит к биодеградации нефти и снижению ее качества [Head et al., 2003, 2014; Jones et al., 2008]. Нефть является основным источником органического вещества для микроорганизмов нефтяных пластов. Процесс микробной трансформации нефти может протекать как аэробно, так и анаэробно. В нефтяных месторождениях, эксплуатирующихся с применением заводнения, аэробное окисление нефти протекает наиболее интенсивно в призабойной зоне нагнетательных скважин, куда с нагнетаемой водой поступает растворенный кислород [Magot et al., 2000; Nazina et al., 2017]. Ряд аэробных микроорганизмов – деструкторов углеводородов нефти применяется в микробных биотехнологиях увеличения нефтеизвлечения и очистки от нефтяных загрязнений. Скорость процесса анаэробной трансформации нефти существенно ниже аэробной, однако анаэробный процесс протекает в пласте постоянно и не зависит от поступления кислорода. Возможными акцепторами электронов для микроорганизмов в пластах могут быть углекислота, сульфат и другие окисленные соединения серы, гидроксиды железа [Magot et al., 2000]. Нитрат и иные оксиды азота отсутствуют в пластовых водах. Целью настоящего исследования было получение метаногенного сообщества, анаэробного деградирующего нефть, изучение его разнообразия, метаболического потенциала и возможной экофизиологической функции в процессе биотрансформации нефти в пласте.

В работе исследовали микробное сообщество Черемуховского нефтяного месторождения (г. Нурлат, Россия). Нефтяные горизонты расположены на глубине 890–920 м, и имеют температуру около 20 °С. Плотность добываемой нефти составляет 0.932 г./см^3 при 25 °С, что позволяет отнести ее к группе тяжелой нефти. Месторождение разрабатывается с использованием нагнетания отделенной от нефти попутно добываемой воды, смешанной с поверхностной пресной водой. В июне 2016 г. проба нагнетаемой воды была отобрана на устье скважины 5600. Отобранная вода имела соленость 0.621 г./л, pH 7.9 и величину окислительно-восстановительного потенциала Eh –28.9 мВ.

Пластовую воду использовали для посева на минеральную среду, не содержащую акцепторов электронов, со стерильной тяжелой нефтью этого месторождения. Культивирование проводили анаэробно (аргон в качестве газовой фазы), в темноте, в стационарных условиях при комнатной температуре. Через 210 и 270 сут. культивирования в газовой фазе было зарегистрировано образование 15000 ppm и 17500 ppm метана, соответственно. Образование метана было исследовано в динамике (рис. 1). На начальных этапах культивирования было зарегистрировано образование молекулярного водорода, который в дальнейшем использовался метаногенами. Основным газообразным продуктом биодеградации нефти был метан, который образовывался со скоростью 12.4 микромоль/сут.

Через 270 сут. культивирования был определен состав метаногенной консорции НО-5600 методом высокопроизводительного секвенирования V3-V4 региона гена 16S рРНК. Состав сообщества не был разнообразным (табл. 1). Домен *Archaea* был представлен водород-использующими метаногенами рода *Methanobacterium* (1 % от выявленных последовательностей). Среди *Bacteria* преобладали представители родов *Sedimentibacter* (49 %) и *Actinotalea* (26 %).

Представители рода *Sedimentibacter* – анаэробные грамположительные бактерии, растущие на аминокислотах и пирувате и не использующие углеводы. Как правило, для роста требуется присутствие дрожжевого экстракта в среде. Некоторые бактерии рода *Sedimentibacter* способны использовать фенол, катехол и бензоат, являющийся центральным промежуточным соединением при разрушении ароматических соединений [Breitenstein et al., 2002; Imachi et al., 2016]. Представители этого рода были выявлены в нефтяных пластах, в накопительных культурах, разрушающих углеводороды [Kleinsteuber et al., 2012; Fowler et al., 2016], и в метаногенных накопительных культурах из морских осадков [Imachi et al., 2016]. Вероятно, в исследованной нами накопительной культуре бактерии рода *Sedimentibacter* осуществляли функцию синтрофных бактерий.

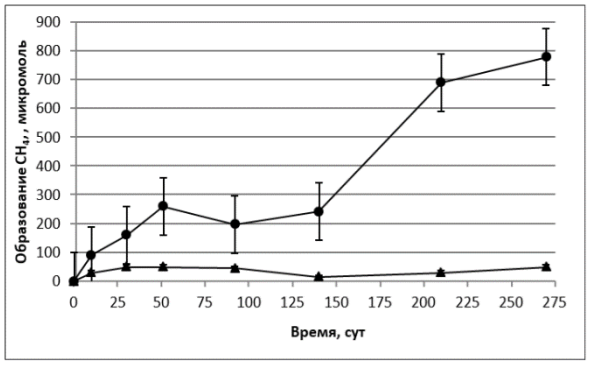


Рис. 1. Образование метана в среде с тяжелой нефтью накопительной культурой НО-5600 в динамике. ● – Накопительная культура НО-5600, ▲ – Контроль, стерильная среда.

Таблица 1. Состав метаногенной консорции НО-5600 после 270 сут. культивирования, определенный методом высокопроизводительного секвенирования V3-V4 региона гена 16S рРНК

Домен	Род	% от общего числа последовательностей
Archaea	*Methanobacterium*	1.0
Bacteria	*Sedimentibacter*	49.1
	Actinotalea	26.8
	Nocardioides	8.3
	Unclassified *Coriobacteriaceae*	6.8
	Acidovorax	2.8
	Paeniclostridium	2.2
	Other	3.0

Бактерии рода *Actinotalea* являются факультативно анаэробными мезофильными органотрофными микроорганизмами. Минорные компоненты сообщества принадлежали к родам *Pseudomonas, Tepidimonas, Paeniclostridium, Rhodoferax* и *Pusillimonas*, часто встречающимся в подземных экосистемах. Метаногенный и бродильный компоненты микробного сообщества были выделены в чистую культуру и исследованы.

Метаногенная архея, штамм НО-Met1, была выделена из культуры НО-5600 методом последовательных пересевов в среде с водород-углекислотной смесью. Ген 16S рРНК штамма НО-Met1 имел 100 % сходства с соответствующим геном *Methanobacterium aarhusense*, что позволило отнести штамм к этому виду. Ген 16S рРНК штамма НО-Ch2 имел 98.8 % сходства с геном 16S рРНК бактерии *Actinotalea ferrariae*, и вероятно, принадлежит к новому виду этого рода. Для уточнения таксономичесгого положения штамма НО-Ch2 был секвенирован его геном.

Геном штамма *Actinotalea* sp. НО-Ch2 содержал 4,027,363 п.н. Большинство выявленных генов отвечали за метаболизм углеводов (415 генов), синтез аминокислот и их производных (288), метаболизм белков (224) и образование кофакторов, витаминов и пигментов (198) (рис. 2). Выявлены гены, ответственные за образование биопленок, анаэробное дыхание, устойчивость к тяжелым металлам и кислороду.

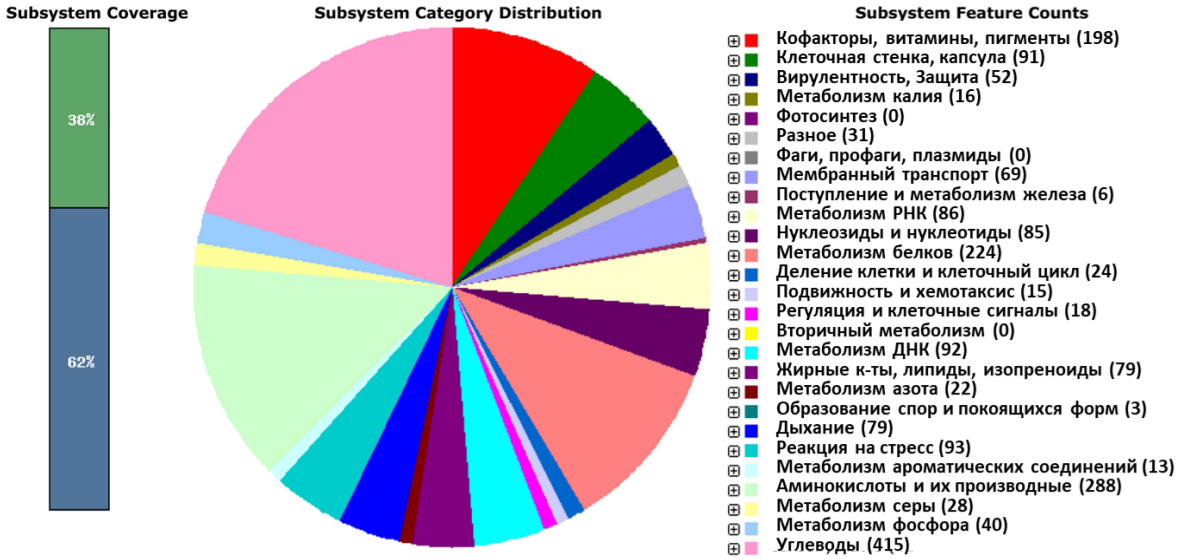


Рис. 2. Характеристика генома штамма Actinotalea sp НО-Ch2 согласно базе данных SEED

Вероятно, факультативные анаэробные бактерии рода *Actinotalea* могут использовать ароматические соединения и микробную биомассу с образованием низкомолекулярных соединений, используемых, в свою очередь, метаногенными археями рода *Methanobacterium* с образованием метана.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что аэробные и факультативно-анаэробные бактерии могут входить в состав сообществ, анаэробно деградирующих нефть, включающих также бродильные и метаногенные прокариоты, и быть метаболически активными в анаэробной зоне нефтяных пластов.

Секвенирование и анализ генома были выполнены при поддержке Российского Научного Фонда (грант 16–14–00028). Физиологические и таксономические исследования штаммов были проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

ЛИТЕРАТУРА

Breitenstein A., Wiegel J., Haertig C., Weiss N., Andreesen J.R., Lechner U. Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – V. 52. No. 3. P. 801–807.

Fowler S.J., Toth C.R., Gieg L.M. Community structure in methanogenic enrichments provides insight into syntrophic interactions in hydrocarbon-impacted environments. Front. Microbiol. – 2016. – V. 7. Article. 562.

Head I.M., Jones D.M., Larter S.R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. Nature. – 2003. – V. 426. No. 6964. P. 344–352.

Head I.M., Gray N.D., Larter S.R. Life in the slow lane; biogeochemistry of biodegraded petroleum containing reservoirs and implications for energy recovery and carbon management. Front. Microbiol. – 2014. – V. 5. Article 566.

Imachi H., Sakai S., Kubota T., Miyazaki M., Saito Y., Takai K. *Sedimentibacter acidaminivorans* sp. nov., an anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2016. – V. 66. No. 3. P. 1293–1300.

Jones D.M., Head I.M., Gray N.D., Adams J.J., Rowan A.K., Aitken C.M., Bennett B., Huang H., Brown A., Bowler B.F., Oldenburg T., Erdmann M., Larter S.R. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. Nature. – 2008. – V. 451. No. 7175. P. 176–180.

Kleinsteuber S., Schleinitz K.M., Vogt C. Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon-contaminated aquifers. Appl Microbiol Biotechnol. – 2012. – V. 94. No. 4. P. 851–873.

Magot M., Ollivier B., Patel B.K. Microbiology of petroleum reservoirs. Antonie van Leeuwenhoek. – 2000. – V. 77. No. 2. P. 103–116.

Nazina T.N., Shestakova N.M., Semenova E.M., Korshunova A.V., Kostrukova N.K., Tourova T.P., Min L., Feng Q., Poltaraus A.B. Diversity of metabolically active *Bacteria* in water-flooded high-temperature heavy oil reservoir. Front. Microbiol. – 2017. – V. 8. Article 707.

УДК 631.31

ЭФФЕКТ КОМПЛЕКСНОГО ВНЕСЕНИЯ СОРБЕНТОВ В ЗАГРЯЗНЕННУЮ ПОЧВУ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ ЯЧМЕНЯ ЯРОВОГО

Т.С. Дудникова, С.Н. Сушкова, Т.М. Минкина, Е.М. Антоненко, А.И. Барбашев, Н.П. Черникова

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Бенз(а)пирен (БаП) – представитель широко распространённых химических загрязнителей окружающей среды [1]. Данный поллютант рекомендуют к нормированию международное агентство по исследованию рака [2], агентство по охране окружающей среды США [3] и СанПин [4]. Предельно допустимая концентрация БаП в почве, согласно [5], составляет 20 нг/г. Загрязнение почв, а также сельскохозяйственной и естественной растительности БаП установлено для территорий, подверженных влиянию промышленных предприятий [6, 7], что создает необходимость в разработке приемов рекультивации почв. Использование сорбентов является одним из основных приемов ремедиации почв загрязненных полиаренами. В целом эффект от внесения углеродистых сорбентов заключается в снижении биодоступности полиаренов за счет хемосорбции [8]. Минеральный сорбент диатомит также обладает сорбционным потенциалом к неполярным органическим поллютантам [9], однако его основная функция, как мелиоранта, состоит в создании благоприятных условий для развития специфической микробиоты способной к деструкции ксенобиотиков, в том числе БаП [10].

Цель работы – оценить влияние комплексного внесения сорбентов в загрязненную БаП почву на рост и развитие тест-культуры – ячменя ярового в условиях модельного эксперимента

Почва для опыта представляла собой чернозем обыкновенный, отобранный с особо охраняемой природной территории «Персиановская заповедная степь», со следующими свойствами: содержание физической глины – 48,1 %, ила – 28,6 %, С орг – 3,7 %, pH – 7,5, ЕКО – 36 мМ/100. Полиэтиленовые сосуды объемом 4 л, заполнили почвой, просеянной через сито 2 мм. Вес почвы в сосудах составил 2 кг. Почву модельного эксперимента искусственно загрязняли БаП. Раствор поллютанта в ацетонитриле вносили на поверхность почвы. Схема опыта включала следующие варианты: контроль (исходная почва без загрязнителя), контроль с добавлением 4 % ГАУ от массы почвы, контроль с добавлением смеси ГАУ (4 % от массы почвы) и диатомита (1 % от массы почвы), а также варианты с внесением сорбентов в загрязнением 50 ПДК БаП почвы. Внесенная доза поллютанта соответствует его содержанию в почвах территории бывшего накопителя жидких промышленных стоков [11]. Выбор оптимальных доз внесения сорбентов основан на работах [12, 13]. Для лучшего взаимодействия с внесённым БаП почву постоянно увлажняли до состояния наименьшей полевой влагоёмкости. Инкубация проведена в условиях близких к естественным. Через 1 месяц после начала инкубации сосуды засевали тест-культурой. В качестве тест-культуры использовали ячмень яровой сорта «Ратник». Высев растений произвели в количестве 20 зерен на сосуд. Полив осуществляли дистиллированной водой по рассчитанной норме полива для ячменя на заданный объем почвы. Соблюдали равные условия освещенности всех вариантов модельного эксперимента.

По достижению фазы выхода в трубку произвели отбор проб растений, измерили длину корня и высоту стебля ячменя. Экстракция ПАУ из образцов проводилась методом омыления, где мешающая фракция почвенных липидов была удалена с помощью кипячения образца 2-% спиртовом растворе гидроксида калия с последующей трехкратной экстракцией образца гексаном [14]. Экстракт БаП в гексане помещали в круглодонную колбу на 100 мл и выпаривали на роторном испарителе. Оставшийся осадок в колбе растворяли в 1 мл ацетонитрила и переносили растворенный в ацетонитриле БАП в виалы. Концентрацию БаП в растворе ацетонитрила определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent 1260 с флуориметрическим детектированием не позднее трёх суток с момента переноса концентрата БаП в виалу. Обработку результатов массовой концентраций БаП в пробе выполнили с помощью компьютера в соответствии с градуировочной характеристикой с учетом концентрирования и потерь при пробоподготовке.

На незагрязненной почве содержание БаП в корне ячменя отмечено на уровне 2,7 нг/г., а длина корня при этом составила 38,7 см. Внесение 50 ПДК БаП в почву приводит к повышению содержания поллютанта в корневой части растения более чем в 30 раз. С увеличением содержания БаП в корне уменьшается длина корней растений в 2 раза. Внесение 4 % ГАУ в загрязнённую почву способствует снижению содержания поллютанта в корневой части ячменя в 1,6 раз, а совместно с 1 % диатомита в 2,7 раз по сравнению с растениями без внесения сорбентов. При этом длина корней растения увеличивается в 1,3–1,4 раза (рис. 1).

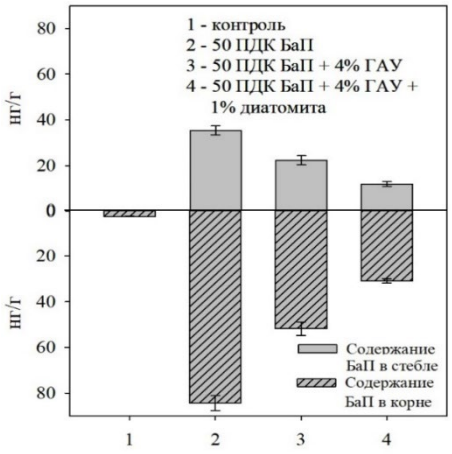


Рисунок 1. Содержание БаП в различных частях ячменя ярового в различных вариантах опыта

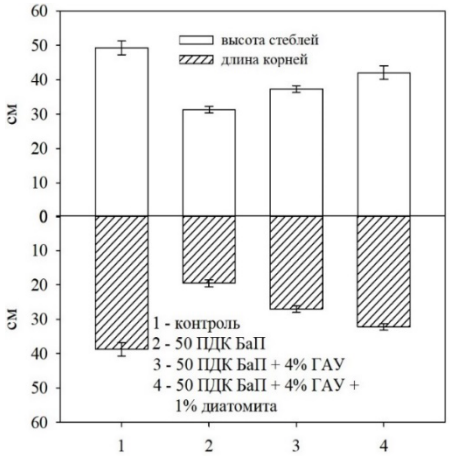


Рисунок 2. Высота стебля и длина корня ячменя в различных вариантах опыта

В стеблевой части растения БаП накапливается в меньшей степени, чем в корнях. На незагрязненной почве в стеблях ячменя содержание БаП составило 0,5 нг/г, а длина стебля достигала 49,3 см. При загрязнении почвы 50 ПДК БаП содержание поллютанта в стеблях ячменя стало выше в 70 раз, а высота стеблей снизилась в 1,7 раз. Внесение 4 % ГАУ в загрязненную почву способствует уменьшению содержания БаП в стебле в 1,6 раз по сравнению при этом увеличивая высоту стеблевой части в 1,2 раза, а при внесение смеси 4 % ГАУ с 1 % диатомита содержание поллютанта в надземной части снижается в 2,7 раза, что увеличивает высоту надземной части ячменя в 1,3 раза (рис. 2).

Содержание БаП в корнях ячменя выше, чем в стеблевой части. Внесение 4 % ГАУ в почву загрязненную 50 ПДК БАП снижает содержание поллютанта в корневой и стеблевой частях растения, что позволяет, что способствует увеличению длины корня и высоты стебля ячменя. Совместное внесение 4 % ГАУ и 1 % диатомита более эффективно, что сказывается на содержании БаП в корневой и надземной части ячменя, и соответственно на размере растения. Несмотря на положительный эффект от внесения сорбентов, размер растений остается ниже, чем в контрольном варианте.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ 19–29–05265 мк

ЛИТЕРАТУРА

1. Ровинский Ф.Я., Теплицкая Т.А., Алексеева, Т.А. Фоновый мониторинг полициклических ароматических углеводородов. Гидрометеоиздат. Л. – 1988. – 20 с.
2. International Agency for Research on Cancer. (2016). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: list of classifications, volumes 1–116. International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon, France.
3. Office of the Federal Registration (OFR) Appendix A: priority pollutants. Fed Reg. 1982; 47:52309.
4. СанПиН 1.2.2353–08 Канцерогенные факторы и основные требования к профилактике канцерогенной опасности Постановление главного государственного врача РФ от 21 апреля 2008 г. № 27
5. ГН 2.1.7.2041–06. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве
6. Idowu O., et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their polar derivatives in soils of an industrial heritage city of Australia // Science of The Total Environment. 2020. Vol. 699. P. 134303.
7. Gabov D.N., Yakovleva Y.V., Vasilevich R.S., Kuznetsov O.L., Beznosikov V.A. (2019). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Peat Mounds of the Permafrost Zone // Eurasian Soil Science. – 2019. – Vol. 52(9), 1038–1050.
8. Ravenni G., et al.Activity of chars and activated carbons for removal and decomposition of tar model compounds–A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – Vol.94. – 2018. – P. 1044–1056.
9. Achten C., Cheng S., Straub K.L., Hofmann T. The lack of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal-rich soils // Environmental pollution. – 2011. – Vol.159(2). – P 623–629. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.035
10. Sigmund G.,et al. Influence of compost and biochar on microbial communities and the sorption/degradation of PAHs and NSO-substituted PAHs in contaminated soils // Journal of hazardous materials. – 2018. – Vol. 345. – P. 107–113.
11. Sushkova S. et al. PAHs accumulation in soil-plant system of Phragmites australis Cav. in soil under long-term chemical contamination // Eurasian journal of Soil Science. – 2020. – Vol 9(3). – P. 242–253
12. Васильева Г.К., Зиннатшина Л.В., Ахметов Л.И., Сушкова, С.Н. Биорекультивация загрязненных углеводородами нефти почв с использованием метода сорбционной биоремедиаци // Сборник научных трудов по материалам конф. «Отходы, причины их образования и перспективы исспользования. – 26–27 марта. – 2019. – С. 345–348.
13. Васильева Г.К., и др. Метод сорбционно-биологической очистки почв от органических загрязнителей // Сборник материалов конференции «Почвенные ресурсы Сибири: вызовы XXI века. – 4–8 декабря. – 2017. – С. 22–27.
14. ПНД Ф 16.1:2.2:2.3:3.62–09 Количественный химический анализ почв // Методика выполнений измерений массовых долей полициклических ароматических углеводородов в почвах, донных отложениях, осадках сточных вод и отходах производства и потребления методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Стандартинформ. М. – 2009. 11 с

УДК 577.60

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАККАЗ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОКАТОДОВ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ.

С.В. Алферов, В.И. Голикова, Т.А. Гордеева

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Постоянно увеличивающиеся истощение запасов ископаемого топлива и необходимость в «чистых» методах производства электроэнергии поспособствовали появлению новых источников устойчивой и возобновляемой электроэнергии без выбросов парниковых газов или загрязнения окружающей среды. Среди этих альтернативных источников производство электроэнергии с использованием биотопливных элементов (БТЭ) представляет собой перспективное направление современной энергетики.

Биотопливный элемент является подклассом топливных элементов, где используются окислительно-восстановительные реакции в биологических объектах для специфического окисления субстратов (спиртов, водорода, лактата, сахаров, таких как глюкозы, фруктозы, лактозы или целлобиозы) на аноде и восстановления окислителей (O_2, H_2O_2) на катоде с целью получения электроэнергии [1]. Подавляющее большинство этих биотопливных элементов вырабатывают электроэнергию за счет ферментного расщепления глюкозы и восстановления кислорода. Однако реакция восстановления кислорода на графитовом электроде имеет высокое значение перенапряжения, в связи с чем, протекает достаточно неэффективно. Это обстоятельство формирует необходимость использования кислород-восстанавливающего биокатода. Подавляющее большинство таких электродов базируется на ферментах лакказах или билирубиноксидазах (БОД).

Лакказа – фермент, относящийся к классу голубых медьсодержащих оксидаз, преимущественно распространённых среди растений и грибов. Впервые этот фермент был обнаружен в японском лаковом дереве *Rhus vernicifera* [2]. С тех пор эти ферменты идентифицировали в различных видах растений, насекомых и бактерий [3, 4]. Большинство детально изученных в настоящее время лакказ выделены из различных грибов [5, 6]. Основными функциями грибных лакказ считаются участие в процессах образования и деградации лигнина, в морфогенезе гриба, во взаимодействии паразит / хозяин, а также в защите от стресса. Большинство грибов продуцируют несколько изоформ и изоферментов лакказ. Хотя большинство грибных лакказ являются мономерными белками, в литературе описаны ферменты, состоящие из нескольких субъединиц. Молекулярный вес мономера варьируется от 50 до 130 кДа. Лакказы являются гликопротеинами. Содержание углеводной части, состоящей, как правило, из маннозы, N-ацетилглюкозамина и галактозы, составляет от 10 до 45 % от массы белка. Считается, что углеводная часть отвечает за стабильность фермента [7, 8].

Активный центр лакказы содержит четыре иона меди. Один из медных центров относится к первому типу (T1), а остальные образуют трехъядерный T2/T3 кластер, содержащий один ион меди второго типа (T2) и два иона меди третьего типа (T3) [9, 10]. Ион меди T1 отвечает за интенсивную голубую окраску фермента и имеет ярко-выраженное электронное поглощение, приблизительно 600 нм (ЭПР). Ион меди T2 бесцветен, но обнаруживается с помощью ЭПР; ион меди T3 состоит из пары атомов меди, которые характеризуются слабым поглощением вблизи УФ-спектра и отсутствием сигнала ЭПР [11]. T1 центр лакказ является первичным акцептором электронов от субстратов-доноров. Для некоторых лакказ определён редокс-потенциал T1 центра, который для большинства грибных лакказ составляет ~750–780 мВ (отн. НВЭ), а для растительных лакказ 420–440 мВ (отн. НВЭ) [12]. Значение редокс-потенциалов T1 центра лакказ имеет большое значение при каталитическом окислении различных субстратов.

Лакказы, в зависимости от продуцирующего их организма – бактерий, грибов или растений, характеризуются удивительно широкой субстратной специфичностью и богатым диапазоном окисляемых субстратов [13]. Так, в качестве неорганических субстратов могут выступать, например, цианокомплексы Fe, Mo, Ir, W (с формулой $[Me(CN)^x]^{y-}$), соединения Mn^{2+} [13]. В тоже время эти ферменты могут катализировать окисление различных органических соединений, среди которых орто- и пара-фенолы, полифенолы, аминофенолы, полиамины, лигнины, арилдиамины и другие.

Важно заметить, что неорганические субстраты выступают в качестве доноров электронов, в то время как органические – доноров атомов водорода, которые при ферментативном катализе отщепляются от органической молекулы с образованием радикала.

В последнее время повышенное внимание уделяется биоэлектрохимическим аспектам применения лакказ, в частности для создания биосенсоров для детекции фенолов и полифенольных соединений в сточных водах пищевой промышленности и для разработки биокатодов топливных элементов.

Основным преимуществом использования лакказ для разработки биоанодов является возможность низкопотенциального восстановления кислорода в воде при нейтральном значении pH. В нормальных условиях при использовании металлических и углеродных электродов при pH=5 термодинамический редокс потенциал пары O_2/H_2O находится в области +0,93 В (отн. НВЭ). Иммобилизованные на электроде медьсодержащие оксидазы, такие как лакказы и билирубиноксидазы, демонстрируют возможность восстановления кислорода при среднем значении pH [14]. При эффективной иммобилизации лакказы на поверхности электродов из таких организмов, как *Trametes versicolor* или *Trametes hirsuta*, электрокаталитическое восстановление O_2 достигается при значении pH=4–7 при низком перенапряжении в 30–70 мВ [15–17]. Связывание и разрывание связей кислород-кислород происходит в медном кластере Т2/Т3. Для доставки электронов в этот каталитический центр возможны 2 механизма – медиаторный и прямой перенос электронов.

Прямой перенос электрона (ППЭ) реализуется в случае если активные медные центры фермента находятся достаточно близко к поверхности электрода. Поскольку электрон может быть транспортирован лишь на расстояние около 2,5 нм [18], ППЭ между поверхностью электрода и лакказой возможен только в том случае, если фермент удачно ориентирован относительно поверхности электрода. Фермент считают удачно ориентированным, если его активный центр Т1 находится достаточно близко к электроду для осуществления прямого переноса [19]. Медиаторный перенос электронов предполагает использование особых химических соединений – челноков, которые облегчают перенос электронов к иону меди Т1 центра. Использование редокс-медиаторов позволяет проводить окисление соединений, которые не подвергаются окислению с участием только индивидуальных лакказ. Редокс-медиаторы являются низкомолекулярными субстратами лакказ, в результате ферментативного окисления которых образуются высокореакционные продукты, способные неферментативно окислять различные соединения, не являющиеся субстратами фермента [20]. С практической точки зрения, отсутствие окислительно-восстановительных посредников упрощает процесс изготовления биокатодов и устраняет их токсичное влияние, возникающие в результате возможного выделения дополнительных редокс-соединений.

Таким образом, кроме характеристик самого фермента, важным является способ его иммобилизации на поверхности электрода. Не существует универсального метода иммобилизации ферментов и не может быть назван универсальный носитель для всех возможных способов применений [21]. Выбранный носитель должен быть нерастворимым и совместимым с лакказой, а также обязан поддерживать стабильность фермента в экспериментальных растворах. Следует также учитывать возможное неблагоприятное взаимодействие лакказы с поверхностью носителя [22]. Кроме того, для проведения биокаталитической реакции носитель не должен замедлять диффузию субстрата к активным центрам фермента. Непористые материалы имеют минимальное ограничение диффузии, но достигают ограниченной иммобилизации ферментов. Напротив, пористые материалы могут содержать большое количество фермента, но субстраты с большой молекулярной массой будут страдать от диффузионных ограничений [23]. Иммобилизация лакказы потенциально выгодна по сравнению со свободным ферментом, поскольку такая система проще и практичнее в эксплуатации и может обеспечить значительное снижение потерь фермента [24]. Кроме того, к преимуществам иммобилизации лакказы можно отнести термостабильность фермента, устойчивость фермента к экстремальным условиям и химическим реагентам, а также иммобилизованные лакказы могут быть легко отделены от продуктов реакции, что позволяет использовать ферменты в биореакторах непрерывного режима [23]. Для достижения оптимальной ориентации фермента при изготовлении биокатодов в БТЭ используют такие методы иммобилизации как адсорбция и ковалентное связывание.

Необходимо отметить, что даже несмотря на то, что лакказа может необратимо адсорбироваться на поверхности графита, данный метод иммобилизации основан на случайной адсорбции молекул на поверхности электрода, что может привести к полному отсутствию правильной ориентации фермента, и, как следствие, снижению эффективности транспорта электронов. Именно поэтому перед закреплением фермента проводят модификацию электродов с помощью наноструктурированных материалов. В частности, углеродные нанотрубки (УНТ) могут использоваться для электрохимического контакта с ферментами через их внутреннюю проводимость или через перенос электронов к ферментам, обеспечивающий скачкообразное перемещение электронов между иммобилизованными окислительно-восстановительными центрами. УНТ могут находиться в непосредственной близости к простетическому участку ферментов и, следовательно, добиваться прямого электронного переноса между ферментами и основной частью электродов [25].

Электроды также могут модифицированными различными полициклическими ароматическими соединениями. В качестве таких соединений могут использоваться аналоги субстрата лакказ (антрацен, антрахинон, нафталин), которые связываются с активными центрами ферментов, способствуя их правильной ориентации на поверхности электрода. Пример последнего – модификация графитовых поверхностей антраценовыми соединениями, которые эффективно связываются с лакказами [26]. Однако в приведенном примере электрохимический сигнал был низок из-за потери белка вследствие его денатурации или десорбции. Решением последней проблемы может быть использование ковалентной иммобилизации белка на поверхности.

Ковалентное прикрепление к электродам возможно путем формирования слоя карбоксильных (амино) групп и взаимодействием с амино (карбоксильной) группой биомалекулы с образованием амидной связи [27 – 29].

Термическое амидирование через прямую конденсацию карбоновых кислот и аминов, как правило, требует очень жестких условий (T> 180 °C). Чтобы избежать денатурации белков используют активаторы карбоксильных групп. В качестве такого активатора чаще всего используют 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид – водорастворимый карбодиимид.

Другой способ ковалентного связывания лакказ с поверхностью электродов основан на образование имино-связей между окисленными периодатом углеводным компонентом на поверхности молекулы лакказы и аминогруппами на поверхности электрода [27, 30].

Предполагается, что такой подход приведет к иммобилизации фермента с меньшим расстоянием между активным центром Т1 и электродом для осуществления переноса электронов, чем при использовании водорастворимого карбодиимида (рис. 1).

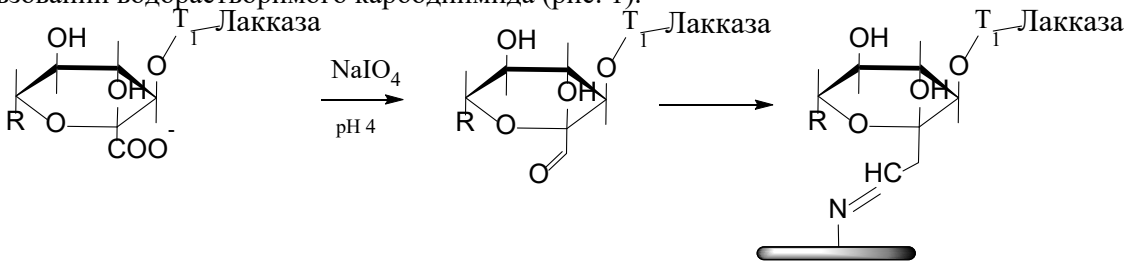


Рис. 1. Химическая модификация углеводных остатков в лакказе с последующей иммобилизацией на поверхности электродов

Кроме этих методов выделяют также механическое включение (захват) фермента на поверхности носителя, микрокапсулирование, при котором биоактивный агент заключается в ядре сфер микронного размера, изготовленных из полупроницаемого материала и самоиммобилизация фермента с формированием биопленки [31–34]

Ферменты лакказы имеют большой биотехнологический потенциал и перспективы применения для разработки биокатодов топливных элементов. Следует, однако, отметить, что их применение в качестве биокатализаторов восстановления кислорода ограничивается необходимостью разработки эффективных методов иммобилизации на поверхности электродов. Как уже было отмечено, не существует универсального метода иммобилизации лакказ. Выбранный метод должен обеспечивать стабильность фермента в течение длительного времени, и, что особенно важно, способствовать правильной ориентации фермента относительно поверхности проводника таким образом, чтобы обеспечить эффективный прямой перенос электронов к активным центрам фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meredith M.T., Minteer, S.D. Biofuel cells: enhanced enzymatic bioelectrocatalysis. // Annu. Rev. Anal. Chem. 2012. V. 5. P. 157–179. doi:10.1146/annurev-anchem062011–143049;
2. Yoshida H. Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the chemical society of Tokio // J. Chem. Soc. Trans. 1883. V. 43. P. 472–486;
3. Laccases. Anonymous Advances in Agricultural and Food Biotechnology. / Loera O., Pérez Pérez M., Irma Cristina. [et al]. // Research Signpost. 2006. P. 323–40;
4. Madhavi V., Lele S.S. Laccase: properties and applications. // BioResour 2009. V. 4. P. 1694–717;
5. Baldrian P. Fungal Laccases – Occurrence and Properties // FEMS Microbiology Reviews. 2006. V. 30. P. 215–242.
6. Thurston C.F. The Structure and Function of Fungal Laccases // Microbiolodgy. 1994. V. 140. P. 19–26;
7. Claus H. Laccases: structure, reactions, distribution // Micron. 2004. V. 35. P. 93–96;
8. "Голубые" лакказы (обзор) / Морозова О.В., Шумакович Г.П., Горбачева М.А. [и др.] // Биохимия. 2007. Т. 72. Стр. 1136–1150;
9. Purification and preliminary crystallographic study of Trametes versicolor laccase in its native form / Bertrand, T., Jolivalt, C., Caminade, E., [et al]. // Acta Cryst. 2002. V.58. P. 319–321;
10. Structure of native laccase from Trametes hirsuta at 1.8 A resolution / Polyakov K.M., Fedorova T.V., Stepanova E.V. // Acta Cryst. 2009. V. 65. P. 611–617;
11. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. / Durán N., Rosa M.A., D'Annibale A. [et al]. // Enzyme Microb Technol. 2002. V. 31. P. 907–31;
12. Лакказа-медиаторные системы и их использование (обзор) / Морозова О.В., Шумакович Г.П., Шлеев С.В. [и др.] // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. Стр. 583–597;
13. Morozova, O.V. «Blue» laccases / O.V. Morozova // Biochemistry. – 2007. – V. 72. – № 10. – P. 1136–1128;
14. Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. / Solomon E.I., Chen P., Metz M. [et al]. // Angew Chem Int. Ed. 2001. V. 40. P. 4570–4590;
15. High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix. / Reuillard B., Le Goff A., Agne`s C. [et al]. // Phys Chem. 2013. V. 15. P. 4892–4896;
16. Gold nanoparticles as electronic bridges for laccase-based biocathodes. / Gutie´rrez-Sa´nchez C., Pita M., Vaz-Domı´nguez C. [et al]. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 17212–17220;
17. Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrenefunctionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes. / Lalaoui N., Elouarzaki K., Le Goff A. et al. // Chem. Commun. 2013. V. 49. P. 9281–9283;
18. Improved chemical and physical stability of laccase after spherezyme immobilisation. / Jordaan J., Mathye S., Simpson C., Brady D. [et al]. // Enzyme Microb Technol. 2009. V. 45. N.432. P.5.
19. Application of eukaryotic and prokaryotic laccases in biosensor and biofuel cells: recent advances and electrochemical aspects. / Zhang, Y., Lv, Z., Zhou, J. [et al]. // Applied Microbiology and Biotechnology. 2018;
20. Bourbonnais, R., Paice, M.G. // FEBS. 1990. V. 267. P. 99–102; Fabbrini, M., Gall, i C., Gentili, P. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2002. V. 16. P. 231–240;
21. De Stefano L., Rea I., De Tommasi E., Rendina I., Rotiroti L., Giocondo M, et al. Bioactive modification of silicon surface using self-assembled hydrophobins from Pleurotus ostreatus. // Eur Phys J.E. 2009. V. 30. P. 181–5;
22. Silva C., Silva C.J., Zille A., Guebitz G.M., Cavaco-Paulo A. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres. // Enzyme Microb Technol. 2007. V. 41. P. 867–75;
23. Arica M.Y., Altintas B., Bayramoglu G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: application for textile dye degradation. // Bioresour Technol. 2009. V. 100. P. 665–9;
24. T. Beneyton, A. El Harrak, A.D. Griffiths. Immobilization of CotA, an extremophilic laccase from Bacillus subtilis, on glassy carbon electrodes for biofuel cell applications // Electrochemistry Communications 2011 V. 13 P.24–27;
25. Holzinger, M., Le Goff, A., and Cosnier, S. Carbon nanotube/enzyme biofuel cells. // Electrochim. Acta. 2012. V. 82. P. 179–190;
26. Blanford C.F., Heath R.S., Fraser A. A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O2 reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface // Chem. Commun. 2007. P. 1710–1712;
27. C. Gutiérrez-Sánchez. Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods // Electrochimica Acta 2012. V. 82 P.218–223;
28. M. Bandapati, B. Krishnamurthy, S. Goel. Fully assembled Membraneless Glucose Biofuel Cell with MWCNT Modified Pencil Graphite leads as Novel Bioelectrodes. IEEE Trans NanoBioscience 2019;
29. Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O2 to H2O with highoperational stability and resistance to chloride inhibition / Vaz-Dominguez C., Campuzano S., Rüdiger O. [et al]. // Biosens Bioelectron 2008. V. 24 P. 531–537;
30. G. Gupta, V. Rajendran, P. Atanassov. Bioelectrocatalysis of Oxygen Reduction Reaction by Laccase on Gold Electrodes // Electroanalysis 2004. V. 16 N. 13–14 P. 1182–1185;
31. Brady D., Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. // Biotechnol Lett. 2009. V. 31. P. 1639–50;
32. Rochefort D., Kouisni L., Gendron K. Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly(ethyleneimine) microcapsules. // J. Electroanal Chem. 2008. V. 617. P. 53–63;
33. Crestini C., Perazzini R., Saladino R. Oxidative functionalisation of lignin by layer-bylayer immobilised laccases and laccase microcapsules. // Appl. Catal. Gen. 2010. V. 372. P. 115;
34. Jordaan J., Mathye S., Simpson C., Brady D. Improved chemical and physical stability of laccase after spherezyme immobilisation. // Enzyme Microb Technol. 2009. V. 45. N.432. P.5.
35. Исследование выполнено в рамках проекта по Государственному заданию МИНОБРНАУКИ (№ FEWG 2020–008).

УДК 602.4:628.35:664

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ РЕДОКС-АКТИВНЫХ ПОЛИМЕРОВ НА ОСНОВЕ УНТ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ МАТРИЦ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО БПК-БИОСЕНСОРА

В.А. Арляпов, А.С. Харькова, С.К. Курбаналиева, Л.С. Кузнецова

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Экспресс-оценка загрязнения объектов окружающей среды, в частности, определение органических примесей в поверхностных, грунтовых и сточных водах, является актуальной задачей. Важной характеристикой степени загрязненности окружающей среды, в частности воды, органическими веществами является индекс биохимического потребления кислорода (БПК). Продолжительность стандартного метода определения БПК составляет минимум 5 суток (для определения $БПК_5$), что может стать причиной попадания загрязняющих веществ в природные водоёмы, их эвтрофикации и гибели полезных гидробионтов [1]. Существует несколько методов, обеспечивающих высокую точность измерения БПК, однако их использование затруднено в силу высокой стоимости специализированного оборудования, необходимости привлечения обученного персонала и значительной длительности анализов [2].

Альтернативой стандартному методу являются кислородные и медиаторные микробные биосенсоры. Наиболее перспективными являются медиаторные биосенсоры, так как при измерении их аналитический сигнал не зависит от концентрации растворенного кислорода, позволяя тем самым проводить анализ в анаэробных условиях. Кроме того, их использование позволяет изменять рабочий потенциал, тем самым снижая шумовые помехи, связанные с окислительно-восстановительными реакциями на электроде окислителей или восстановителей, присутствующих в пробе. Современным и эффективным подходом к созданию медиаторных биосенсоров является использование редокс-активных полимеров, полученных на основе сшивки медиатора с полимерами, применяющимися для иммобилизации микроорганизмов [3]. Интерес к подобным разработкам вызван преимуществами данных материалов при создании биосенсоров на их основе. Редокс-активные полимеры достаточно эффективны, обеспечивают стабильность сенсора, безреагентность анализа, отсутствие вымывания медиатора в процессе работы и могут использоваться для создания биосенсоров на основе клеток микроорганизмов.

Несмотря на множество преимуществ синтезированных и описанных в литературе гидрогелей, они имеют несколько серьезных недостатков. Главными из них являются низкая чувствительность из-за сложности сопряжения биоматериала с электродом, большая длительность измерений из-за плохой проницаемости матриц и невысокая долговременная стабильность, обусловленная плохой биосовместимостью используемых проводящих систем. Поэтому целью данной работы стало исследование возможности создания биоэлектродов на основе бактерий *P. yeei* и редокс-активных полимеров на основе бычьего сывороточного альбумина и хитозана, модифицированных медиаторами электронного транспорта и углеродными нанотрубками для создания высокочувствительного БПК-биосенсора.

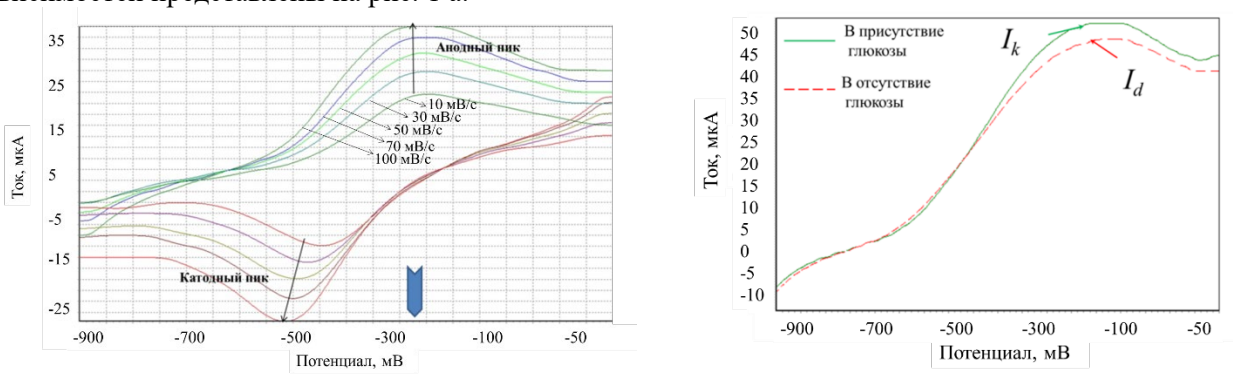
В качестве медиаторов для получения проводящих систем за счет наличия необходимых функциональных групп и медиаторных свойств использовали нейтральный красный (НК) и ферроценкарбоксальдегид (ФЦ). Выбор бычьего сывороточного альбумина (БСА) и хитозана (ХИТ) для синтеза редокс-активных полимеров обусловлен их высокой биосовместимостью и нетоксичностью. Данные свойства необходимы при использовании разработанных редокс-активных полимеров в качестве матриц для иммобилизации микроорганизмов при создании биосенсоров. Как было показано в работе [4], бактерии *Paracoccus yeei* ВКМ *B-3302* обладают способностью окислять широкий спектр органических соединений; в этой связи они были использованы и данном исследовании как основа биорецепторного элемента. Для обеспечения облегченного переноса электронов между медиатором и электродом в систему вводили одностенные углеродные нанотрубки.

Процесс синтеза полимерных матриц протекал по механизму нуклеофильного присоединения, в котором глутаровый альдегид играл роль сшивающего реагента. Химическую структуру полученных матриц, модифицированных медиатором, изучали с помощью ИК-спектроскопии. Физическая структура исследуемых проводящих гидрогелей была изучена методом сканирующей электронной микроскопии.

Показано, что полученные гидрогели имеют размер пор около 10 мкм. Таким образом, при нанесении полученного геля на электрод существенно увеличивается площадь рабочей поверхности, пористая структура позволяет бактериям *P. yeei* встраиваться в данный полимер. При использовании углеродных нанотрубок происходит их равномерное распределение в структуре синтезированных матриц.

Электрохимические свойства полученных проводящих гелей исследовали методом циклической вольтамперометрии. В исследуемой электрохимической системе в отсутствие углеродных нанотрубок можно выделить две стадии: прыжковый механизм (ПМ) – процесс переноса электронов между ковалентно связанными молекулами медиатора и поверхностную реакцию (ПР) – перенос электронов от медиатора на электрод. В случае, если расстояние между ковалентно-связанными медиаторами большое, то скорость прыжковой составляющей переноса электронов может снижаться. За счет внедрения углеродных нанотрубок в структуру полимера эффективное расстояние между молекулами медиаторов уменьшается; УНТ играют роль мостиков, по которым электроны переносятся по редокс-активному полимеру на электрод. Кроме того, введение нанотрубок увеличивает площадь контакта проводящей матрицы с поверхностью электрода.

Метод циклической вольтамперометрии удобен для нахождения лимитирующих стадий электрохимических процессов, так как в случае «прыжкового механизма» предельный анодный ток прямопропорционален квадратному корню из скорости развертки. В случае, если прыжковый механизм осуществляется достаточно быстро и процесс лимитируется поверхностной реакцией на электроде – ток пропорционален скорости развертки. Типичные виды изучаемых циклических зависимостей представлены на рис. 1 а.



А Б

Рис. 1. Типичный вид вольтамперных зависимостей для исследования электрохимических свойств полученных матриц: а) вольтамперограмма редокс-активного полимера БСА-НК при увеличении скорости развертки от 10мВ/с до 100 мВ/с; б) изменение предельного анодного тока в результате окисления глюкозы бактериями P. yeei, иммобилизованными в редокс-активный полимер на основе БСА-НК при скорости развертки 10 мВ/с.

Определенные лимитирующие стадии электрохимического процесса для полученных матриц представлены в таблице 1. Выявление лимитирующей стадии позволило применить модель Николсона [5] и модель Лавирона [6] для нахождения гетерогенной константы переноса электрона. Для исследования возможности применения редокс-активных полимеров для иммобилизации микроорганизмов были найдены константы взаимодействия микроорганизмов с ковалентно связанными медиаторами электронного транспорта с использованием моделирования Николсона-Шайна [7], которое широко используется для анализа константы скорости взаимодействия медиаторов, в том числе и модифицированных, с различными ферментами, в наших предыдущих исследованиях было показано возможность использования данной модели с клетками микроорганизмов [8]. В данной модели рассматривается изменение предельного анодного тока до и после введения в систему окисляемого субстрата. При избытке концентрации субстрата и низкой концентрации медиатора скорость биохимической стадии взаимодействия медиатора с биоматериалом имеет псевдопервый порядок, а константа взаимодействия связана с изменением предельного анодного тока уравнением Николсона и Шайна.

Таблица 1. Гетерогенные константы скорости переноса электронов для исследуемых матриц и константы взаимодействия бактерий P. yeei с ковалентно связанными медиаторами.

Редоксактивный полимер	Лимитирующая стадия переноса электронов	Гетерогенная константа переноса, см/с	Константы взаимодействия бактерий *P. yeei* с ковалентно связанными медиаторами, ($дм^3$/(мг·с))
БСА-НК	ПР	0,0119±0,0006	36±2
БСА-НК-УНТ	ПР	0,041±0,001	73±3
ХИТ-НК	ПМ	0,054±0,003	43±2
ХИТ-НК-УНТ	ПР	0,14±0,01	51±2
БСА-ФЦ	ПР	0,45±0,01	51±4
БСА-ФЦ-УНТ	ПР	0,55±0,01	55±1
ХИТ-ФЦ	ПР	0,44±0,02	52±3
ХИТ-ФЦ-УНТ	ПР	0,55±0,03	57±2

Наибольшая скорость электродного обмена достигается при использовании матриц на основе БСА, модифицированного ферроценом. Следует отметить, при модификации матриц наноматериалами предполагается увеличение скорости переноса электрона на электрод, а, следовательно, увеличение гетерогенной константы переноса электронов, что подтверждается полученными результатами. Предположительно это происходит за счет увеличения общей проводимости геля, в частности увеличивается эффективность прыжковой составляющей переноса электронов. Наилучшие константы скорости взаимодействия клеток бактерий с медиатором так же достигаются при добавлении углеродных нанотрубок, что подтверждает перспективу их внедрения в матрицу. В целом, константы скорости взаимодействия ковалентно связанных медиаторов с бактериями *P. yeei* выше, чем при использовании немодифицированных медиаторов [8]. Следует отметить, что наибольшая константа скорости взаимодействия достигается в системе на основе БСА-НК-УНТ, однако для этой же системы характерны самые низкие константы скорости гетерогенного переноса электронов на электрод, что в последствии может негативно отразится на чувствительности биосенсора. Таким образом, полимеры на основе ковалентно-связанного медиатора ферроцена более предпочтительны как по константе гетерогенного переноса электронов, так и по константе скорости взаимодействия с бактериями *P. yeei*.

Для проведения анализа $БПК_5$ необходимо, чтобы разработанный биосенсор мог регистрировать биохимическое окисление широкого спектра органических субстратов, поэтому была исследована субстратная специфичность биосенсоров на основе созданных проводящих систем. Анализ субстратной специфичности позволяет сделать вывод о том, что характер окисления субстратов меняется в зависимости от используемой матрицы. В целом, все разработанные биосенсоры позволяют зарегистрировать окисление бактериями *P. yeei* достаточно широкого спектра органических соединений, что обеспечивает правильность результатов анализа $БПК_5$.

Для количественного определения содержания анализируемых веществ в образце были изучены гиперболические зависимости ответа сенсора от $БПК_5$, которые были аппроксимированы уравнением Михаэлиса-Ментен. Для анализа стабильности и устойчивости ответа сенсора при длительном использовании были исследованы такие характеристики, как долговременная и операционная стабильность. В таблице 2 представлены все характеристики разработанных медиаторных биосенсоров на основе бактерий *P. yeei* и аналогов.

Таблица 2. Сравнительные характеристики аналитических и метрологических характеристик медиаторных биосенсоров

Биоматериал/проводящая система	Долговременная стабильность, сутки	Относительное стандартное отклонение, % (n=15)	Линейный диапазон $БПК_5$, мг/дм^3	Время анализа, мин	Ссылка
P. yeei /БСА-ФЦ	38	5,7	2,5–47	5	
P. yeei / БСА-ФЦ-УНТ	25	5,9	0,1–2	5	Данная
P. yeei / ХИТ-ФЦ	49	6,6	2,5–18,9	5	работа
P. yeei / ХИТ-ФЦ-УНТ	50	5	0,1–4,5	5	
B. subtilis / ГЦК/ГФ/ПП	60	1,8	4–60	15	[9]
Активный ил/МС/ХИТ/ГФ	65	2,9	1–100	9	[10]

ГЦК – гексацианоферрат (III) калия; ГФ – графен; ПП – полипирол; МС – метиленовый синий

По полученным данным можно отметить, что нижняя граница определяемых концентраций $БПК_5$ разработанных биосенсоров с использованием гелей на основе ферроцена и УНТ превосходит многие известные аналоги. УНТ позволяют увеличить эффективность переноса электронов за счет повышения константы гетерогенного переноса электронов на электрод. Исходя из полученных результатов, биосенсор на основе бактерий *P. yeei* и проводящей системы ХИТ-ФЦ-УНТ по селективности, долговременной стабильности и диапазону определяемых концентраций является перспективной для создания БПК-биосенсора.

Апробация биосенсора на основе бактерий *P. yeei* и проводящей системы ХИТ-ФЦ-УНТ была проведена на четырнадцати образцах поверхностных вод. Отбор проб и определение $БПК_5$ стандартным методом проводилось согласно действующим нормативным документам. Статистическая обработка (Модифицированный тест Стьюдента) полученных результатов показала, что данные, полученные обоими методами, отличаются незначимо. Разработанный биосенсор можно использовать в качестве альтернативы стандартному анализу.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 20–33–70078 Стабильность).

ЛИТЕРАТУРА

1. Готовцев А.В., Данилов-Данильян В.И., Никаноров А.М. Проблемы мониторинга БПК // Водные ресурсы. – 2012. – Т. 39. – №. 5. – С. 510–510.
2. Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алферов В.А., Решетилов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т.47. – № 1. – С. 5–15.
3. Faezeh Ghorbani Zaman, Hichem Moulahoum, Metin Ak, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur. Current trends in the development of conducting polymers-based biosensors. // Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – V. 118 – P. 264–276
4. Харькова А.С., Арляпов В.А., Туровкая А.Д., Автух А.Н., Стародумова И.П., Решетилов А.Н. Медиаторный БПК-биосенсор на основе клеток микроорганизмов, выделенных из активного ила. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – № 2. – С. 199–209.
5. Nicholson R.S. Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics //Analytical Chemistry. – 1965. – V. 37. – I. 11. – P. 1351–1355.
6. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems //Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. – 1979. – V. 101. – I. 1. – P. 19–28.
7. Nicholson R.S., Shain I. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems //Analytical Chemistry. – 1964. – V. 36. – №. 4. – P. 706–723.
8. Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Turovskaya A.D., Shvets V.I., Reshetilov A.N. A mediator microbial biosensor for assaying general toxicity. // Enzyme and Microbial Technology. – 2020. – V. 132.
9. Hu J., Li Y., Gao G., Xia S. A Mediated BOD Biosensor Based on Immobilized B. Subtilis on Three-Dimensional Porous Graphene-Polypyrrole Composite //Sensors. – 2017. – V. 17. – №. 11. – P. 2594.
10. Niyomdecha S., Limbut W., Numnuam A., Asawatreratanakul P., Kanatharana P., Thavarungkul P. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2017. – V. 241. – P. 473–481.

УДК 58.084.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА МЕХАНИЗМ ФИТОЭКСТРАКЦИИ РАСТЕНИЙ

Т.С. Авдеенкова, А.С. Макарова, А.В. Матасов, В.В. Челноков

Российский химико-технологический университет Д.И. Менделеева», Москва, Россия

Антропогенное загрязнение воды тяжелыми металлами является одной из основных проблем в современном мире, и необходимо отметить постоянный рост степени загрязнения водных объектов, который, в свою очередь, является вызвано ежегодным увеличением производства [1–3]. Источниками тяжелых металлов в окружающей среде в результате деятельности человека являются выбросы от промышленности, транспортных средств и мусоросжигательных заводов. К отраслям, загрязняющим окружающую среду тяжелыми металлами, относятся черная и цветная металлургия, производство топлива, горнодобывающие комплексы, стекло, керамика, электротехника и т. д. [4].

Тяжелые металлы, попадающие в водоемы, приводят к изменениям физических свойств воды, в частности к изменению органолептических и химических показателей воды [5]. Поступающие в водоемы металлы препятствуют естественным процессам самоочищения воды. Загрязненные водоемы становятся непригодными для питьевого, промышленного водоснабжения, а также теряют ценность для рыбопромысла. Кроме того, загрязненная вода может вызывать нарушения в росте и развитии растений и организмов, являющихся частью водной биоты [6]. Одним из эффективных способов очистки водоемов является механизм фиторемидиации. Благодаря данному способу тяжелые металлы извлекаются из воды, что делает ее пригодной для потребления и использования [7]. Целью этой работы было определение наиболее эффективных элементов в инженерных сооружениях, обеспечивающих механизм фитоэкстракции для удаления тяжёлых металлов из водоёмов.

Одним таким биологическим способом очистки с помощью высших водных растений (макрофитов) является использование биоплато. Данное биологическое инженерное сооружение, представляет собой мат-платформу с посадкой высших водных растений. Корни растений с аборигенными микроорганизмами-деструкторами полностью погружены в воду и играют главную роль в очистке – поглощают загрязняющие вещества из воды. Для интенсификации процессов очистки используются искусственные корни из полимерных материалов, которые создают большую единую площадь поверхности. В частности, искусственные корни из углеродных волокон являются привлекательным местом для водных микроорганизмов. Микробиота, оседая на поверхности нитей, образует биоплёнку, способную к разложению попавших в воду загрязняющих веществ. При этом создается особая среда обитания, в которой интенсивно происходят процессы разложения [8].

В ходе исследований были проведены лабораторные опыты, направленные на получение результатов о работоспособности предлагаемых биоплато, создание нескольких видов биоплато для сравнения и выявления более результативного, эффективности очистки воды с помощью высших водных растений в симбиозе с добавленными микроорганизмами от тяжёлых металлов (свинец (II) уксуснокислый) с использованием разных конструкций углеродных волокон

Экспериментальная установка представляет собой имитацию закрытого водоема. В несколько емкостей на 20 л были помещены маты-платформы с посаженными в них высшими водными растениями Ириса болотного. Температуры воздуха (Твозд.) и воды (Тводы) составляют 23˚С и 19˚С соответственно. Также были добавлены разные навески свинца (II) уксуснокислого.

Для эксперимента были использованы разные конструкции углеродных волокон. Форма № 1 представляет собой кистеобразную конструкцию углеродных волокон, свободно висящую в толще воды вблизи корней растений. Форма № 2 представляет собой упорядоченные пучки, связанные в конструкцию лестничного типа.

Данные о концентрации свинца в воде экспериментальных контейнеров представлены в табл. 1.

Таблица 1. Данные о содержании в воде Pb^{2+}

Макрофит	Наличие углеродного волокна (у/в)	Концентрация, мкг/л			
		День 1	День 2	День 5	День 8
Ирис болотный	Без у/в	3,1 ± 0,3	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,81 ± 0,08
	С у/в формы № 1	147 ± 14	18 ± 1	14 ± 1	8,9 ± 0,9
	С у/в формы № 2	39 ± 4	12 ± 1	11 ± 1	11 ± 1

По данным таблицы видно, что в результате проведения эксперимента с течением времени концентрация свинца в воде стремительно снижается. Обработанные результаты оставшегося количества в воде свинца в течение 8 с Ирисами болотными (рис. 1) в виде процентного содержания.

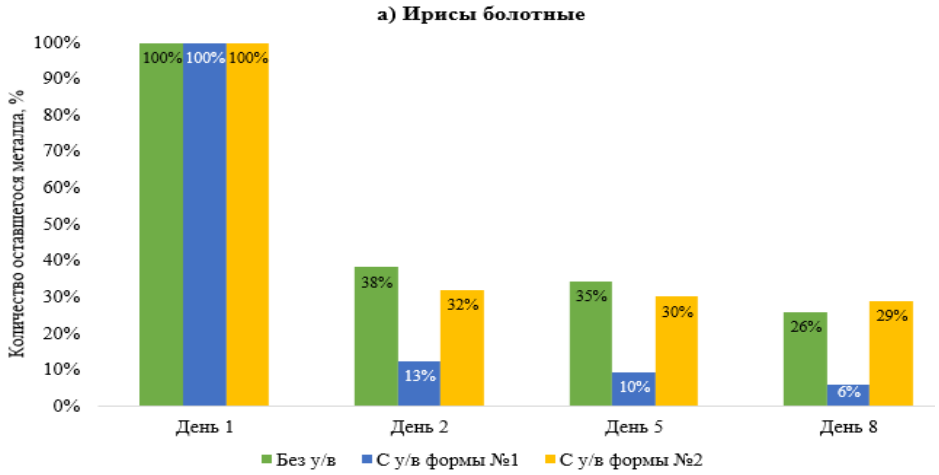


Рис. 1. Количество оставшегося свинца в воде

По гистограммам видно, что ирисы болотные поглотили большее количество свинца (74 %). А добавление углеродного волокна формы № 1 способствовало наибольшему поглощению тяжёлого металла и очистке воды (94 %). Это говорит о том, что углеродное волокно формы № 1 можно в дальнейшем применять в конструкции биоплато в очистке воды от свинца.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18–29–25068.

ЛИТЕРАТУРА

1. Walker D.B., Baumgartner D.J., Gerba C.P., Fitzsimmons K. Surface Water Pollution. Environmental and Pollution Science, 2019. P. 261–292.
2. Аринжанов А.Е., Сарычева А.В. Загрязнение водоемов тяжелыми металлами. Материалы Всероссийской научно-методической конференции; Оренбургский государственный университет – Оренбург, 2017. С. 1494–1499.
3. Теплая Г.А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды (обзор литературы). Астраханский вестник экологического образования, № 1 (23), 2013. С. 182–192.
4. Dhir, Phytoremediation: Role of aquatic plants in environmental clean-up (Springer India, 2013).
5. Owa F.W. Water Pollution: Sources, Effects, Control and Management International Letters of Natural Sciences, 2014. P. 2–5.
6. Jatin K. Srivastava, Harish Chandra, Swinder J.S. Kalra, Pratibha Mishra, Hena Khan, Poonam Yadav. Plant–microbe Interaction in Aquatic System and Their Role in the Management of Water Quality: a Review, Applied Water Science, vol. 7, 2016. P. 1079–1090.
7. Зайнутдинова Э.М., Ягафарова Г.Г. Очистка сточных вод от ионов тяжелых металлов с использованием водных растений. Башкирский химический журнал. 2013. Том 20. № 3
8. Kojima, A., 1999. Carbon fiber-based artificial seaweed bed and carbon fiber-based artificial seaweed bed system made by combining plural kinds of carbon fiber-based artificial seaweed. Patent № JP2001136861A. Japan.

Актуальная биотехнология
№3 (34), 2020
УДК 581.14

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРА КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ НА СКОРОСТЬ РОСТА РАСТЕНИЙ

Н.В. Будаговская

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

Представлены результаты экспериментов, связанных с исследованием влияния блокатора кальциевых каналов верапамила на динамику скорости роста растений в коротких временных интервалах (мин, ч). Измерение скорости роста растений осуществляли с помощью лазерного интерференционного ауксанометра ЛИНА – ЭМЗД (Россия). В экспериментах использовали растения гречихи сорта Молва, пшеницы сорта Янгмэй и риса сорта Суксианген. Растения выращивали в песке. Верапамил вносили в субстрат в зоне корней до конечной концентрации 7,0 мМ. Измерение скорости роста стеблей и листьев проводили до и после добавления верапамила при температуре 25ºС и влажности воздуха 64 %. На Рис. 1 представлены результаты измерения скорости роста стебля гречихи до и после добавления блокатора кальциевых каналов верапамила в корневую зону. График отражает динамику скорости роста стебля в течение 6 ч после внесения верапамила с дискретностью отсчета в 30 мин. Можно видеть, что скорость роста стебля снижалась на протяжении 1,5 ч до уровня в 6 раз ниже исходной скорости роста, до внесения верапаила, и затем возрастала в течение 1 ч до установления стационарного уровня, который превышал более, чем в три раза, минимальный уровень скорости. На следующий день концентация верапамила в корневой зоне этого же растения была увеличена вдвое и это вызвало снижение скорости роста стебля. Аналогичные закономерности наблюдались в экспериментах с растениями пшеницы и риса при измерении скорости роста листьев. Однократное добавление верапамила в той же концентации, что и для растений гречихи, вызывало снижение и последующее частичное восстановление скорости роста листьев.

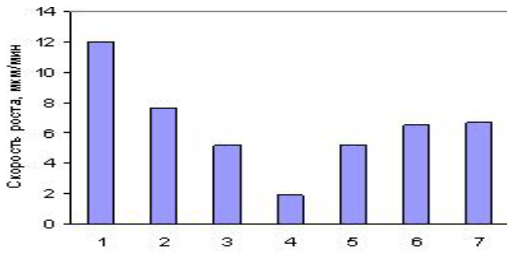


Рис. 1. Влияние верапамила (7 мМ) на скорость роста стебля 12-дневного растения гречихи. 1 – скорость роста стебля до добавления верапамила в корневую зону, 2–7 – скорость роста стебля после добавления верапамила. Представлены значения скорости роста стебля с интервалом в 30 мин

Дальнейшее повышение концентрации верапамила в корневой зоне приводило к падению скорости роста листьев. Восстановление скорости роста растений после вызванного верапамилом снижения начиналось у гречихи и пшеницы через 2 ч, у риса через 3 ч от момента внесения верапамила. По-видимому, это время было необходимо для развития адаптивного ответа на добавление верапамила, сопровождаемого экспрессией генов и синтезами *de novo*, компенсаторными перестройками в системах проведения сигналов в условиях угнетения кальций-зависимой сигнальной системы. Повышенные концетрации верапамила вызывали более серьезные нарушения в растениях, которые не компенсировались адаптивными процессами: увеличивался дефицит кальция в тканях, усиливались процессы свободнорадикального окисления, которые приводили к нарушению структурной целостности корней и снижению их водонагнетающей активности, нарушению водного обмена в целом растении и угнетению роста как надземной части, так и корней (1). Таким образом, внесение блокатора кальциевых каналов в корневую зону в невысокой концентрации вызывает снижение и последующее частичное восстановление скорости роста растений в течение нескольких часов. При высоких концентрациях блокатора происходят деструктивные процессы в тканях, что приводит к значительному снижению скорости роста растений без дальнейшего восстановления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Будаговская Н.В. Снижение водонагнетающей активности корней и скорости роста растений кукурузы при блокировании кальциевых каналов // Актуальная биотехнология. № 2, – 2017, С. 131–133.

УДК 579.66

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *PSYCHROBACTER* К ТРАНСФОРМАЦИИ СТЕРИНОВ И ХОЛЕВЫХ КИСЛОТ

Н.О. Дещеревская, М.В. Донова

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, г. Пущино, Россия

Микробная деградация стероидов играет важную экологическую роль в качестве одного из ключевых процессов разложения биомассы, а также удаления или детоксификации стероидных поллютантов, а образуемые интермедиаты деградативного пути могут представлять ценность в качестве биоактивных соединений.

В высших организмах желчные кислоты образуются из стеринов путем структурных модификаций стероидного ядра и боковой цепи. Попадающие в окружающую среду при разложении биомассы или экскреции эукариотическими организмами стерины и желчные кислоты являются источниками углерода и энергии для микроорганизмов.

В литературе имеются сведения о способности некоторых галотолерантных бактерий к продукции желчных кислот из холестерина. Описана способность штамма *Psychrobacter* sp., выделенного из морских глубоководных губок, синтезировать биоактивные производные дезоксихолевой кислоты [1]. Однако, в целом, способность осмотолерантных и психрофильных аэробных протеобактерий рода *Psychrobacter* к структурной модификации стероидов практически не изучена.

Ранее при исследовании штаммов микроорганизмов, выделенных из образцов мерзлых отложений в районе п. Баренцбург архипелага Шпицберген, нами выявлен штамм рода *Psychrobacter* sp., обладающий высокой стероидтрансформирующей активностью в отношении холевых кислот [2].

В настоящей работе была исследована биокаталитическая активность десяти штаммов рода *Psychrobacter* из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН) в отношении стеринов (холестерин, фитостерин) и желчных кислот (холевой и дезоксихолевой).

Штаммы растили на минимальной среде в аэрируемых условиях [2]. Биоконверсию стероидов (1 г/л) проводили растущими клетками в течение не менее 120 часов в тех же условиях. Стероиды анализировали хроматографическими методами как описано ранее [3].

Штаммы росли в присутствии стеринов, однако, не были способны к утилизации или биоконверсии стеринов, а также не проявляли деградативной или трансформирующей активности в отношении деоксихолевой кислоты. Наиболее предпочтительным субстратом для большинства штаммов являлась холевая кислота. Штамм *Psychrobacter muriicola* ВКМ В-2270 специфически окислял холевую кислоту до 7-кетохолевой кислоты, что свидетельствовало о наличии 7-гидроксистероиддегидрогеназной активности. Эффективная биоконверсия холевой кислоты (до 95 %) отмечалась для *Ps.immobilis* ВКМ В-2835, при этом в среде накапливались кетопроизводные холевой кислоты и хенодеоксихолевая кислота. Штаммы *Ps.maritimus* ВКМ В-2838, *Ps.aquamaris* ВКМ В-2839, *Ps.vallis* ВКМ В-2836 и *Ps. maritimus* ВКМ В-2360 проявляли 12-гидроксистероиддегидрогеназную активность в отношении холевой кислоты.

Результаты расширяют представления о глобальном распространении и разнообразии стероидтрансформирующих бактерий.

Работа проводилась в рамках государственного задания АААА-А16–116062110077–6.

ЛИТЕРАТУРА

1. II. Li, P.B. Shinde, H.J. Lee, E.S. Yoo, C.O. Lee, J. Hong, S.H. Choi, J.H. Jung. Derivatives from as sponge-associated bacterium *Psychrobacter* sp. Arch. Pharmacal Res. 2009. V. 32. № 6. P. 857–862. DOI 10.1007/s12272–009–1607–1.
2. Замалутдинова С.В., Трубицын В.Э., Дещеревская Н.О., Донова М.В., Щербакова В.А. Новые психрофильные бактерии и определение их способности к трансформации стеринов и холевых кислот. V Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Сборник тезисов. 2018. С. 93.
3. Deshcherevskaya N.O., Lobastova T.G., Kollerov V.V., Kazantsev A.V., Donova M.V. Search and discovery of actinobacteria capable of transforming deoxycholic and cholic acids. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2016. V. 133. S1. P. 157–165. DOI 10.1016/j.molcatb.2016.12.010.

УДК 574/577

ЕДИНИЧНЫЕ ЗАМЕНЫ ПРОТИЯ НА ДЕЙТЕРИЙ В МОЛЕКУЛЕ ДНК ИЗМЕНЯЮТ ВЕРОЯТНОСТЬ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОТКРЫТЫХ СОСТОЯНИЙ

А.А. Свидлов [1], М.И. Дроботенко [2], С.С. Джимак [1, 2], А.А. Елкина [1, 2]

[1] Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону, Россия
[2] Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

Возникновение открытых состояний в молекуле ДНК является облигатным условием, обеспечивающим ее функциональную активность, в том числе облегчающим специфические межмолекулярные ДНК-белковые взаимодействия в процессе транскрипции, фолдинга и репликации. Учитывая, что значительная часть ДНК в эукариотической клетке находится в конденсированном состоянии и связана с гистонами, исследование ее молекулярной динамики *in vivo* существенно затруднено, поэтому целесообразным представляется изучение открытых состояний в молекуле ДНК с помощью математического моделирования. Последнее удобно для аналитического исследования, так как позволяет изучать ДНК в значительно более длительные временные периоды по сравнению с ее молекулярной динамикой *in vivo*.

Кроме того, особую актуальность исследования молекулярной динамики ДНК можно обосновать также тем, что именно возникающие участки с различными по длине открытыми состояниями в первую очередь могут инициировать, например, переходы типа спираль-клубок с частичным сбросом суперспирализованного напряжения (или иные этапы фолдинга), а также изотопный обмен (в том числе D/H-ротацию) или окислительную модификацию азотистых оснований, что в целом играет ключевую роль при активном функционировании ДНК, а также ее репарации после воздействия неблагоприятных факторов, или же в свою очередь являться пусковым механизмом в процессах онко- и мутагенеза.

Произведенные расчеты показали, что в физиологическом диапазоне атом дейтерия увеличивает вероятность разрыва связи между комплементарными азотистыми основаниями на 0,22–0,60 %, что отражает его способность замедлять скорость считывания генетической информации в процессах транскрипции, сужая при персистентном воздействии в течение клеточного цикла низкоинтенсивного неблагоприятного фактора диапазон регуляторных механизмов и приводя к снижению адаптационного потенциала у клетки. В то же время, при возникновении условий, ослабляющих силу межспиральных водородных связей в молекуле ДНК, наличие атома дейтерия увеличивает частоту возникновения открытых состояний, повышая, таким образом, риск мутаций за счет большей доступности азотистых оснований к повреждающим воздействиям неблагоприятных внешних факторов. Последнее подтверждает возможность возрастания частоты спонтанных мутаций, опосредованных влиянием атомов дейтерия на молекулярную динамику двухцепочечной ДНК, что может играть существенную роль в процессе эволюции живых организмов. Полученные результаты также показывают неравноценность отдельных термодинамических / кинетических эффектов, связанных с заменой дейтерия на протий в молекуле ДНК, что указывает на способность реакций D/H обмена регулировать скорость жизненно важных процессов биологически активных систем (например, считывание генетической информации). Таким образом, не исключается вероятность наличия у живых организмов особых механизмов различного уровня организации, осуществляющих долговременную адаптацию к выраженным колебаниям D/H соотношения в окружающей среде.

При этом стоит отметить, что на основании полученных решений задачи Коши (системы n нелинейных дифференциальных уравнений) можно сделать вывод о том, что даже при замене в молекуле ДНК всего одного атома протия на дейтерий и одинаковой средней скорости репликации ДНК могут возникать отдельные периодические замедления и эквивалентные им в таком случае по суммарной выраженности ускорения, хотя в целом и нивелирующие друг друга, но способные за счет изменения внутритактового паттерна считывания генетической информации приводить к общему накоплению ошибок воспроизведения генетической информации, сопровождающихся на определенном этапе переходом количественных изменений (число сбоев репликации) в качественные дефекты (мутации), приводящие к стойким, в том числе наследуемым, нарушениям генома у живых существ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19–44–230026), а также государственного задания ЮНЦ РАН (№ АААА-А19–119040390083–6).

УДК 577.3.0

МЕХАНИЗМЫ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ ПРИ ФРАКЦИОНИРОВАНИИ ИЗОТОПОВ

С.С. Джимак [1, 3], А.А. Басов [2], А.А. Елкина [1, 3]

[1] Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия
[2] «Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия
[3] Южный научный центр РАН, Ростов-на-Дону, Россия

Известно, что многие физические и химические процессы в живых системах сопровождаются изотопным фракционированием атомов биологически значимых элементов, прежде всего H, C, O и N [1]. Изменения соотношения тяжелых и более легких изотопов биогенных элементов являются основой для возникновения как квантовых (туннельных), так и термодинамических и, как следствие, кинетических изотопных эффектов, проявляющихся в естественных условиях ускорением, замедлением или разветвлением метаболических реакций, а также изменением скорости поступления метаболитов по транспортным каналам, приводящих к локальному флуктуационному увеличению пула биологически активных веществ [2] в отдельных компартментах или органоидах клетки. Кроме того, изменение естественного изотопного соотношения в некоторых структурных компонентах живых систем сопровождается модификацией механизмов отдельных биохимических реакций, что обусловлено у животных и растений, например, компартментализацией [3] и в целом может приводить, в том числе к более быстрому возникновению адаптации при воздействии различных стрессовых факторов.

В работе представлено оригинальное объяснение некоторых физических механизмов (основанных на термодинамических, кинетических и квантовых туннельных эффектах), обеспечивающих стабильное фракционирование изотопов, что приводит к накоплению определенных изотопных форм в интрацеллюлярном и межклеточном пространстве, включая молекулярные эффекты изотопного обмена $^{2}H/^{1}H$, $^{18}O/^{16}O$ и других пар атомов, проявление их эффектов *in vivo* на органоидном и организменном уровнях. Также обсуждается новая гипотеза фракционирования тяжелых нерадиоактивных изотопов в живых системах посредством реализации нейтронного эффекта. Сравнительный анализ результатов некоторых экспериментальных исследований показал следующую особенность: весьма вероятно, что развитие «изотопного шока» у живых существ наблюдается в основном, при наличии ковалентных связей между атомами с нечетным числом нейтронов, т. е. имеющих нескомпенсированный нейтрон. Установлены следующие условия возникновения нейтронного эффекта в биологических системах:

1. Возникновение нейтронного эффекта в биологических системах наблюдается при наличии химических связей между атомами, у которых имеется суммарное преобладание нейтронов над протонами, выражаемое нечетными положительными числами (1, 3, 5, 7 и т. д.): Nn-Np=2k+1, где k ϵ Z, n – нейтрон, p – протон.
2. Возникновение нейтронного эффекта в биологических системах наблюдается при наличии химических связей между атомами, у которых имеется дробный результирующий спин ядер: 2k ≠ A-спин+ A'-спин ≠ 2k+1, где k ϵ Z, A-спин – спин атома;
3. Возникновение нейтронного эффекта в биологических системах наблюдается при наличии химических связей между атомами, у которых имеется противоположный знак спина ядер: R-спин $^{-+}$, где «+» и «–» представляют собой четность ядра атома.
4. Усиление изотопного резонанса возрастает в следующем ряду условий (постулатов):

Nn-Np=2k+1 >> 2k ≠ A-спин+ A'-спин ≠ 2k+1 >> R-спин $^{-+}$, где k ϵ Z, n – нейтрон, p – протон, «+» и «–» представляют собой четность ядра атома.

5. Неаддитивное усиление изотопного резонанса ожидается при парном сочетании любых двух условий (постулатов) из трех первых перечисленных (1–2, 1–3, 2–3).
6. Наиболее благоприятные условия для возникновения максимального изотопного резонанса в биологических системах наблюдаются при сочетании всех трех первых условий (постулатов 1–3), что подтверждается экспериментальными данными.
7. В атомах металлов при отсутствии ковалентных или координационных связей величина изотопного резонанса пропорциональна свойствам атома металла: разнице нейтронов и протонов его образующих, спину ядра и четности ядра.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19–44–230026 р_а и государственного задания ЮНЦ РАН № АААА-А19–119040390083–6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schmidt H.L., Robins R.J., Werner R.A. Multi-factorial in vivo stable isotope fractionation: causes, correlations, consequences and applications // Isotopes in Environmental and Health Studies, 2015, Vol. 51, № 1, P. 155–199.
2. Galimov E.M. On an erroneous "experience" of isotope fractionation in enzymatic reaction // Russian Journal of Physical Chemistry A, 2007, Vol. 81. № 5, P. 831–835.
3. Brenna J.T. Natural intramolecular isotope measurements in physiology: elements of the case for an effort toward high-precision position-specific isotope analysis // Rapid Communicat. in Mass Spectrometry, 2001, Vol. 15, P. 1252–1262.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

УДК 539.1.047: 582.475.4: 574.24

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХВОИ СОСНЫ В РАЙОНЕ АВАРИИ ФУКУСИМСКОЙ И ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС

Е.С. Макаренко[1], С.А. Гераськин[1], М.А. Лыченкова[1]

[1]Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, Россия

ВВЕДЕНИЕ

С начала XX в. и по настоящее время не утрачивают актуальность исследования влияния хронического действия ионизирующего излучения на природные популяции растений и животных, которые приобрели особое значение на территориях, пострадавших в результате радиационных аварий на ПО «Маяк», Чернобыльской и Фукусимской АЭС.

Большой размер генома сосны по сравнению с большинством других растений, достигающий 24.6 Гб (Ahuja, Neale, 2005) и большие интерфазные хромосомы объёмом до 61.1 мкм^3 (Conger et al., 1982) обусловили повышенную её чувствительность к ионизирующему излучению (LD_{50} 5–20 Гр) (Сарапульцев, Гераськин, 1993). Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – основной лесообразующий вид Северной Евразии, являющийся видом-эдификатором и ценной породой в лесоводстве. Сосна красная японская или густоцветковая (*Pinus densiflora* Siebold et Zucc) формирует монодоминантные леса, в значительной степени определяя структуру и функции лесной экосистемы, имеет широкий ареал произрастания в Японии и важное хозяйственное значение. Сосна внесена в список референтных растений и животных, рекомендованных Международной комиссией по радиационной защите (МКРЗ) для проведения оценки радиационного воздействия на окружающую среду в условиях хронического облучения (ICRP, 2008).

После аварии на Чернобыльской АЭС на облучённой сосне обыкновенной наблюдали различные нарушения вегетативных органов: образование морфозов, угнетение прироста побегов, опадение хвои, изменение её размеров, усиленное почкование на верхушках годовых побегов, «израстание почечных чешуй», изменение ультраструктуры хвои и т. д. (Козубов, Таскаев, 2002). На радиоактивно загрязнённых после аварии на АЭС Фукусима территориях у красной японской сосны (Yoschenko et al., 2016) было обнаружено увеличение частоты подавления апикального доминирования, однако морфологические показатели хвои не были изучены. Поэтому представляют интерес морфометрические параметры сосны, произрастающей в условиях реально встречающихся в современной биосфере уровней хронического облучения. Целью настоящей работы являлась оценка морфометрических показателей хвои сосны обыкновенной и японской красной сосны в условиях хронического радиационного воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Радиационная обстановка на экспериментальных участках. Исследование проводили на сосне обыкновенной с 2 референтных и 4 импактных участков, расположенных приблизительно на 200–250 км северо-восточнее ЧАЭС, с 2011 по 2014 гг. на наиболее пострадавшей в Российской Федерации в результате аварии на Чернобыльской АЭС территории Брянской области. В 2016 г. измерения провели ещё на 3 участках, расположенных на расстоянии 12–45 км от ЧАЭС, в Полесском государственном радиационно-экологическом заповеднике (ПГРЭЗ) в Гомельской области Республики Беларусь. В 2019 г. материал отобрали с красной японской сосны на 1 контрольном и 4 участках, загрязнённых радионуклидами в результате аварии на АЭС Фукусима из 30-км зоны.

Основным дозообразующим радионуклидом на изучаемых территориях Брянской и Гомельской областей является ^{137}Cs, удельные активности которого на наиболее загрязнённых участках достигают в почве 66 кБк/кг, а в шишках – 14 кБк/кг. Согласно проведённым в 2016 г. измерениям, средняя МЭД на радиоактивно загрязнённых участках меняется в пределах 35–360 мкР/ч. Расчетные значения годовой поглощённой дозы в кронах сосновых деревьев, полученные с помощью разработанной ранее дозиметрической модели (Спиридонов и др., 2008) в Брянской области достигают 39 мГр, а в Гомельской области – 129 мГр, на контрольных площадках – 0.03 и 0.23 мГр. На всей территории ПГРЭЗ присутствуют значимые уровни загрязнения долгоживущими радионуклидами ^{238,239,240,241}Pu, ^{241}Am, ^{137}Cs, ^{90}Sr.

Все участки характеризуются сходным древостоем. Содержание тяжёлых металлов в почвах всех площадок Брянской области не превышает ПДК, почва дерново-подзолистая супесчаная, гранулометрический состав одинаков (Гераськин и др., 2008). На экспериментальных участках ПГРЭЗ почва песчаная.

В префектуре (пр.) Фукусима мощность амбиентной дозы на высоте 1 м составила на контрольном участке 0.25 мкЗв/ч, а на радиоактивно загрязнённых участках 3.4–6.4 мкЗв/ч. Для расчёта годовой поглощённой дозы в кронах сосен оценили удельные активности ^{134}Cs и ^{137}Cs в хвое и ветвях. Годовая поглощённая доза на импактных площадках изменяется в пределах 31–57 мГр, на референтном участке 2.4 мГр.

Оценка морфометрических показателей хвои. В России и Беларуси отбор двухлетней хвои проводили с 14–16 деревьев на каждом участке по 20–40 пар хвоинок с дерева. В Японии отбирали хвою с 7–11 деревьев на каждом участке по 30–60 пар двухлетних хвоинок с дерева. Оценивали следующие морфометрические показатели хвои: длина, масса, индекс флуктуирующей асимметрии (ФА). Длину хвои измеряли с точностью до 0.5 мм. Подсушенную хвою взвешивали на лабораторных аналитических весах с точностью до 0.1 мг. Индекс ФА хвои по длине и массе хвоинок рассчитывали по формулам (Kozlov et al., 2002).

Данные были проверены по критерию Диксона и критерию Граббса на наличие выбросов, которые исключены из дальнейшего рассмотрения. Для определения значимости различий между средними значениями использовали *U*-тест Манна-Уитни в программе Statistica 8.0. На рисунках представлены средние значения и стандартные ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Масса и длина хвои. Представленные в таблице 1 результаты свидетельствуют о значимом увеличении по сравнению с контролем массы хвои на большинстве радиоактивно загрязнённых участков.

Таблица 1. Масса хвои обыкновенной и японской красной сосны на изучаемых популяциях в зависимости от годовой поглощённой дозы (D-sum), мГр

Регион	Брянская обл.		Пр. Фукусима	Брянская обл.				Пр. Фукусима				Гомельская обл.		
Год/D-sum	0.03 (1)	0.23 (2)	2.4 (3)	10	19	33	39	31	35	44	57	19	102	129
2011	24.6	29.2º		26.7	30.5ºº	27.2	26.4							
2013	18.2	21.4º		26.8 ºº	23.0ºº	25.5ººº*	22.4º							
2014	22.9	23.3		28.2	25.8	27.1	24.6							
2016	21.1	24.6		28.4 ººº	19.6*	30.3ººº	24.1					21.4	25.6ºº	23.2
2019			15,3					27.0♦♦♦	22.7♦♦♦	19.6♦	15.6			
º, ºº и ººº – значимые отличия от контроля 1, $p<0.05$; $p<0.01$ и $p<0.001$; * – значимые отличия от контроля 2, $p<0.05$ ♦ и ♦♦♦ – значимое отличие от контрольного участка 3, $p<0.05$, $p<0.001$														

Значимой корреляции массы хвоинок от параметров радиационной обстановки (содержания радионуклидов в почве и шишках, мощности экспозиционной дозы, поглощённой дозы) не выявлено.

Анализ полученных данных по длине хвои показал, что на наименее загрязнённых участках наблюдаются статистически значимые колебания данного показателя по сравнению с контрольным уровнем (рис. 1). Видимо, в связи с низкой радиационной нагрузкой на растения данных участков, преобладает влияние иных факторов.

На японской красной сосне увеличение длины хвои относительно контрольного участка обнаружено только на наименее радиоактивно загрязнённом участке (рис. 2).

Обнаружена статистически значимая корреляция: в 2016 г. длина хвои сосны обыкновенной уменьшалась с увеличением поглощённой дозы от β-излучающих радионуклидов (r=-0.68, p=0.043) и удельной активности ^{90}Sr в шишках (r=-0.70, p=0.036).

Стимулирующее действие облучения в дозах 0.7–1 Гр на сосну, в результате которого масса хвои увеличилась в 1.5 раза было обнаружено Козубовым с соавт. (1993). Согласно работе Козубова и Таскаева (2002), увеличение размеров хвои связано с тем, что в хвое сосны увеличивается диаметр смоляных каналов, в 1.5–2 раза возрастает площадь поперечного сечения эпидермы и гиподермы, а также площадь сечения проводящего цилиндра.

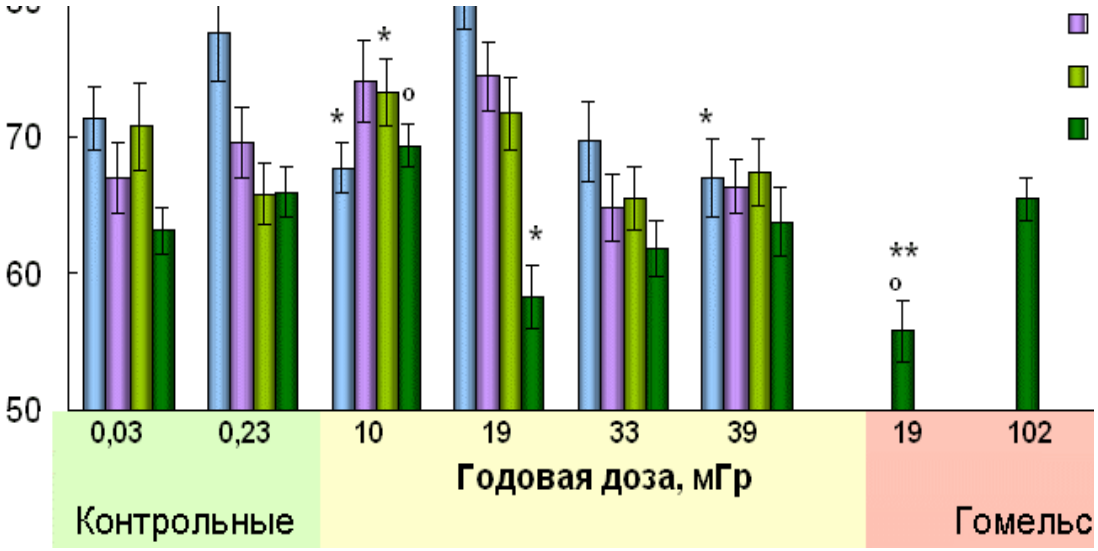


Рисунок 1. Длина хвои сосны обыкновенной в изучаемых популяциях
° – значимые отличия от контроля 1, $p<0.05$; * и ** – значимые отличия от контроля 2, $p<0.05$ и $p<0.01$

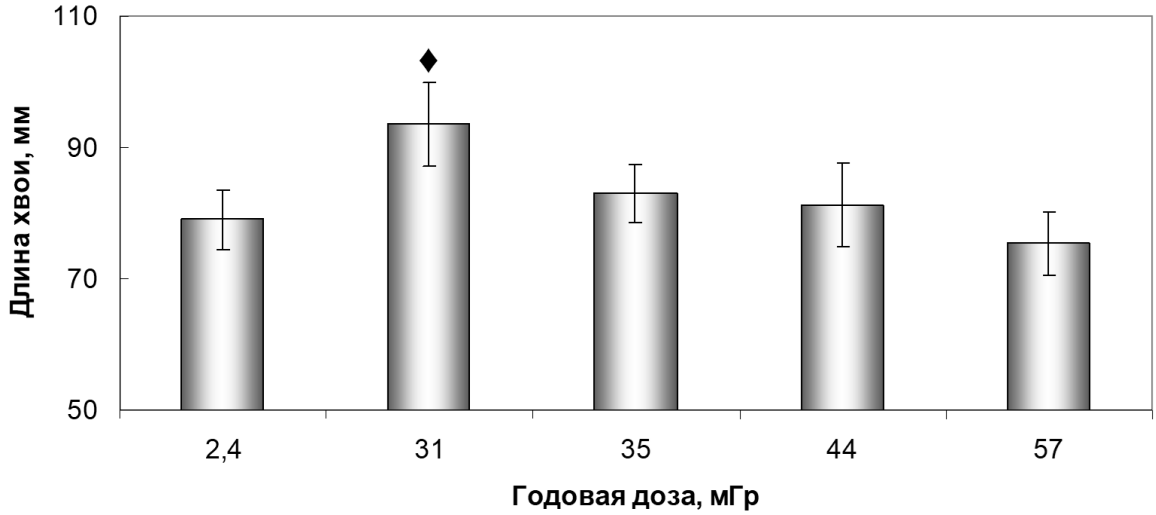


Рисунок 2. Длина хвои японской красной сосны на исследуемых участках в зависимости от годовой поглощённой дозы ♦ – значимое отличие от референтного участка, p<0.05

Флуктуирующая асимметрия (ФА). Данные о массе и длине парных хвоинок были использованы для оценки индексов флуктуирующей асимметрии по массе и длине хвои и изучения закономерностей их изменения в условиях хронического радиационного воздействия.

Индекс флуктуирующей асимметрии по массе хвои во все годы исследования не отличается значимо от контроля, и не имеет значимой корреляции от показателей радиационного воздействия.

На хвое сосны обыкновенной был выявлен повышенный индекс флуктуирующей асимметрии по длине на протяжении 2-х и 3-х из 4-х лет исследования на наиболее радиоактивно загрязнённых участках Брянской области. Индекс ФА по длине хвои в 2011 и 2013 гг. статистически значимо возрастает вместе со многими показателями радиационного воздействия (удельной активностью ^{137}Cs в почве и шишках, мощностью экспозиционной дозы, поглощённой дозой β-излучения).

Индекс флуктуирующей асимметрии по длине хвои красной японской сосны значимо превышает контрольный уровень ($p<0.01$) на площадке с максимальным уровнем радиоактивного загрязнения.

Исследования асимметрии в условиях радиационного воздействия было проведено на разных видах растений. Статистически значимое увеличение индекса флуктуирующей асимметрии у растений клевера было обнаружено на участке промплощадки пункта временного хранения радиоактивных отходов Дальневосточного центра по обращению с радиоактивными отходами, где мощность экспозиционной дозы в 50–60 раз превышала естественный радиационный фон (Горшкова и др., 2014). Хроническое воздействие ионизирующего излучения (при мощности поглощённой дозы на поверхности почвы 4.74 мкГр/ч) привело к увеличению интегрального индекса ФА листьев берёзы повислой (на 30 %) и содержания в них хлорофилла *a* (на 50 %) и хлорофилла *b* (на 83 %) (Иванов и др., 2015).

Как в работе (Kashparova et al., 2018), где не было обнаружено зависимости ФА хвои сосны обыкновенной и листьев берёзы (*Betula pendula* Roth) от показателей радиоактивного загрязнения в ближней зоне Чернобыльской АЭС, в нашей работе данный эффект не воспроизводился каждый год. Тем не менее, индекс ФА по длине хвоинок является более чувствительным индикатором состояния популяций условиях хронического радиационного воздействия, чем индекс ФА по их массе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе показано, что при хроническом облучении до 130 мГр/год у сосны обыкновенной и красной японской сосны выявлены морфометрические изменения. Обнаружены колебания длины хвои и увеличение массы хвои на большинстве импактных участков. На площадках с максимальным уровнем радиоактивного загрязнения увеличен индекс флуктуирующей асимметрии длины хвои. Данные параметры могут быть использованы для оценки и мониторинга состояния популяций в условиях радиоактивного загрязнения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19–54–50003 и гранта JSPS в рамках двусторонней программы поддержки совместных проектов РФФИ-JSPS.

ЛИТЕРАТУРА

Гераськин С.А., Дикарева, А.А. Удалова, Спиридонов С.И., Дикарев В.Г. Цитогенетические эффекты в популяциях сосны обыкновенной из районов Брянской области, подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 5. С. 584–595.

Горшкова Т.А., Удалова А.А., Гераськин С.А., Киселев С.М., Ахромеев С.В. Биоиндикация состояния природной среды в районе расположения Дальневосточного центра по обращению с радиоактивными отходами // Известия вузов. Ядерная энергетика. 2014. № 4. С. 130–139.

Иванов В.П., Иванов Ю.В., Марченко С.И., Кузнецов В.В. Использование индексов флуктуирующей асимметрии листа берёзы повислой для диагностики состояния фитоценозов в условиях техногенного загрязнения // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 3. С. 368–377.

Козубов Г.М., Патов А.П., Кузин Е.А. Биометрические исследования вегетативных побегов сосны и ели при хроническом облучении // Труды Коми научного центра УрО РАН. 1993. С. 105–117.

Козубов Г.М., Таскаев А.И. Радиобиологические исследования хвойных в районе Чернобыльской катастрофы. М.: НПЦ «Дизайн. Информация. Картография», 2002. 256 с.

Сарапульцев Б.И., Гераськин С.А. Генетические основы радиорезистентности и эволюция. М.: Энергоатомиздат, 1993. 208 с.

Спиридонов С.И., С.В. Фесенко, С.А. Гераськин, Соломатин В.М., Карпенко Е.И. Оценка доз облучения древесных растений в отдалённый период после аварии на Чернобыльской АЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2008. Т. 48. № 4. С. 432–438.

Ahuja M.R., Neale D.B. Evolution of genome size in conifers // Silvae Genetica. 2005. V. 54. P. 126–137.

Conger A.D., Sparrow A.H., Schwemmer S.S., Klug E.E. Relation of nuclear volume and radiosensitivity to ploidy level (haploid to 22-ploid) in higherplants and a yeast // Environmental and Experimental Botany. 1982. V. 22. P. 57–74.

ICRP Publication 108. Environmental protection: the concept and use of reference animals and plants. Annals of the ICRP. 2008. Vol. 38. P. 1–242.

Kashparova E.A., Levchuk S., Morozova V., Kashparov V. A dose rate causes no fluctuating asymmetry indexes changes in silver birch (Betula pendula (L.) Roth.) leaves and Scots pine (Pinus sylvestris L.) needles in the Chernobyl Exclusion Zone // Journal of Environmental Radioactivity. 2018. 105731.

Kozlov M.V., Niemela P., Junttila J. Needle fluctuating asymmetry is a sensitive indicator of pollution impact on Scots pine (Pinus sylvestris) // Ecological Indicators. 2002. V. 1. P. 271–277.

Yoschenko V.I., Nanba K., Yoshida S., Watanabe Y., Takase T., Sato N., Keitoku K. Morphological abnormalities in Japanese red pine (Pinus densiflora) at the territories contaminated as a result of the accident at Fukushima Dai-Ichi Nuclear Power Plant // J. Environmental Radioactivity. 2016. V. 165. P. 60–67.

УДК 581.1.581.14

ВЛИЯНИЕ ЛАТРУНКУЛИНА Б НА ДИНАМИКУ ЭНДОГЕННЫХ ИУК И АБК

А.С. Воронков, Ю.В. Минкина[1], Н.В. Авдеева[2]

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия
[1]-ИАТЭ НИЯУ МИФИ «Обнинский институт атомной энергетики», Обнинск, Россия
[2]- Школа № 118 ГБОУ ДО МДЮЦ ЭКТ. Москва, Россия

АЦ обеспечивает доставку мембранных везикул в апикальную зону ПТ благодаря активности АФ в ходе их полярного роста [2], поэтому нельзя исключить, что эффекты экзогенных гормонов на рост ПТ связаны с их влиянием на АЦ. Справедливость этой гипотезы была подтверждена в опытах, направленных на выяснение характера действия экзогенных фитогормонов на организацию F-актина как ключевого компонента, непосредственно ответственного за доставку материала для построения клеточной стенки к ПМ апекса ПТ [1].

В продолжение этих исследований были исследованы эффекты ИУК и АБК, стимулирующих рост ПТ, на организацию F-актина. Судя по степени флуоресценции нитей F-актина, ИУК вызывала усиление интенсивности флуоресценции на 37 % по сравнению с контролем, что свидетельствовало об увеличении общего количества АФ в ПТ. Максимальное количество АФ локализовано в апикальной и субапикальной зоне ПТ, наиболее существенных для поддержания ее полярного роста. АБК привела к менее значительному (10 %) повышению общего содержания и 15 %-перераспределению АФ в апикальную зону. Плотность АФ достигала максимума в субапикальной и апикальной областях ПТ. Таким образом, именно ИУК стимулировала полимеризацию нитей АЦ как ключевых его компонентов, непосредственно ответственных за доставку материала для построения клеточной стенки к ПМ.

Представленные выше данные о влиянии экзогенных фитогормонов на организацию АЦ как одного из ключевых детерминантов роста ПТ ставят вопрос о том, способно ли нарушение этой структуры и тем самым данного процесса отражаться на интенсивности продукции или биосинтеза эндогенных фитогормонов. В этой связи в описанных ниже экспериментах с использованием латрункулина Б мы попытались дать ответ на этот вопрос.

Ингибитор полимеризации актина, латрункулин Б, в концентрации 100 нМ ингибирует прорастание ПЗ, тогда как при концентрации ингибитора 0.2 нМ прорастание ПЗ не ингибируется, но рост ПТ значительно замедляется. Культивирование пыльцы в течение 4 ч на среде в присутствии 0.2 нМ латрункулина приводило к нарушению цитоархитектуры АЦ мужского гаметофита и, как следствие, к ингибированию его роста. Торможение роста ПТ сопровождалось резким снижением практически до нуля содержания ИУК в отличие от контрольного варианта, где рост ПТ сопровождался постепенным подъемом уровня этого гормона. Динамика содержания АБК была иной. В ПТ, растущих на обеих средах, концентрация АБК снижалась до нуля через 1 ч культивирования, а при последующем культивировании ее уровень постепенно повышался и через 4 ч был идентичен в обоих вариантах.

Результаты проведенных исследований указывают на то, что изменения структуры и функционирования АЦ мужского гаметофита, вызываемые латрункулином Б, определенным образом коррелируют с модуляцией уровня эндогенных фитогормонов. Существенное снижение скорости роста ПТ на среде с ингибитором, очевидно, обусловлено нарушением функционирования АЦ и снижением содержания эндогенной ИУК, играющей ключевую роль в поляризованном росте ПТ.

Работа поддерживается РФФИ 17–04–00153

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ковалева Л.В., Воронков А.С., Захарова Е.В.* Роль ауксина и цитокинина в регуляции актинового цитоскелета в прорастающем *in vitro* мужском гаметофите петунии // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 195–203.
2. *Staiger C.J., Poulter N.S., Henty J.L. et al*. Regulation of actin dynamics by actin-binding proteins in pollen // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. P. 1969–1986.

УДК 640

ПОИСК НОВЫХ ПРОДУКТИВНЫХ ШТАММОВ, СПОСОБНЫХ ОСАЖДАТЬ КАРБОНАТ КАЛЬЦИЯ

Е.В. Журишкина, Д.А. Головкина, А.А. Кульминская

НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия
Курчатовски геномный центр-ПИЯФ, Гатчина, Россия

Цементобетон – один из наиболее используемых материалов в строительстве. К сожалению, многие цементобетонные конструкции подвержены разрушительному влиянию климатических условий. В результате различных факторов окружающей среды происходит увеличение пористости материалов и образование трещин и, как следствие, старение бетонных конструкций [1, 2]. В современной строительной практике существует много способов для заполнения трещин, однако большинство традиционных систем основаны на использовании химических веществ. Они дороги и часто вредны для окружающей среды и здоровья людей [3, 4]. В течение последнего десятилетия в качестве альтернативной технологии разрабатываются микробиологические системы, способные осаждать карбонат кальция. Методы использования бактериальных систем более экологичны и обладают способностью к самопроизвольному запуску [5, 6].

Несмотря на достигнутые успехи в данной области, по-прежнему существуют некоторые ограничения, которые затрудняют продвижение данного метода в большое производство. Одними из таких трудностей являются дороговизна метода и малый объем заживления трещин. На данный момент с помощью бактерий можно восстановить лишь первичные микротрещины на поверхности цементобетонных конструкций. Поэтому задача поиска эффективного штамма для увеличения площади заживления остается актуальной.

Цель работы – поиск новых продуктивных штаммов, способных осаждать карбонат кальция и заполнять микротрещины в цементо-песчаных образцах.

В работе был исследован 71 бактериальный штамм домашней коллекции лаборатории энзимологии ПИЯФ. Отбор штаммов проводился по следующей схеме. На первом этапе были выявлены бактерии, устойчивые к щелочным значениям pH, так как цементные конструкции – это очень агрессивная среда, значения pH которой может достигать 12,5. Для этого исследуемые бактерии высевали на среду LB с pH 9–10, культивировали в термостате при 37^0C. В результате было отобрано 28 штаммов. Следующим этапом отбирали грамположительные бактерии, как потенциально образующие споры, а значит способные выживать в неблагоприятных условиях. Было выявлено 9 грамположительных штаммов.

Следующим необходимым требованием к бактериям было наличие у них уреазной активности. Уреазную активность детектировали визуально при помощи агаризованной среды Кристенсена [7] при 37 °C в течение 24 часов. Положительный результат оценивали по появлению розового окрашивания среды. Качественный тест оказался положительным для всех штаммов. Количественно уреазную активность определяли по оценке электропроводности водной среды [8]. Для этого отобранные бактерии культивировали в жидкой среде B4-M в течение 14 дней при 37 °C при встряхивании (100 об/мин), ежедневно отбирая аликвоты для анализа pH и уреазной активности. Отобранный образец охлаждали до 25 °C и измеряли проводимость с использованием кондуктометра Gravity: Analog Electrical Conductivity Sensor/Meter (K = 10). Образование ионных частиц неионных субстратов приводила к увеличению общей проводимости раствора, а скорость, с которой проводимость увеличивалась, была пропорциональна концентрации активной уреазы, присутствующей в реакционной смеси. Проводимость среды со штаммом *E. coli* DH5α была взята в качестве отрицательного контроля. Было выявлено, что значение pH изменялось от 5 до 7 – 8,5 в течение первых двух дней для всех культур, затем оставалось постоянным до конца эксперимента. Большинство штаммов показали максимальную уреазную активность в первый день культивирования, активность штаммов *Bacillus subtilis* K51 и *B. cereus* 168 достигла максимума только на вторые сутки.

Для проверки способности микроорганизмов осаждать карбонат кальция, каждый из них выращивали в среде СС в течение суток при 37 °C. Затем осаждали бактерии центрифугированием. Осадок суспендировали и вносили в 100 мл жидкой среды B4-M [9], затем культивировали в течение 14 дней при 37 °C на шейкере. Полученные кристаллы карбоната кальция фильтровали путем осаждения и сушили в термостате при 37 °C (Рисунок 1).

По итогам оценки высушенных осадков, образованных бактериями, лучшими показали себя *B. licheniformis, Staphylococcus epidermidis* 4a, *B. cereus* 4b, *Micrococcus luteus* 6, у которых количество осадка составляло 201, 235, 218 и 208 мг, соответственно. Показатели остальных штаммов *B. subtilis* K51, *B. subtilis* 170, *B. cereus* 168, *M. luteus* BS52, *B. cereus* BSP были ниже.

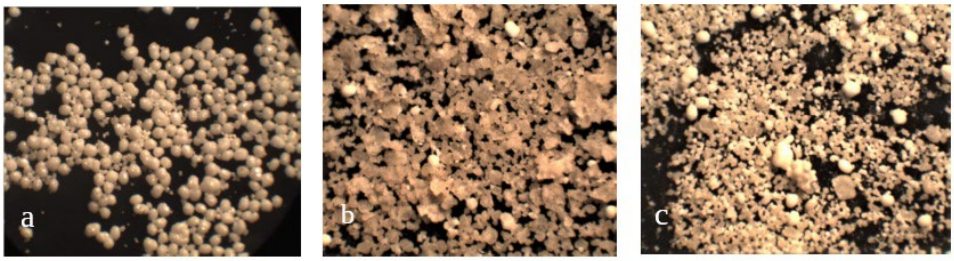


Рисунок 1 – Кристаллы, образованные бактериями в течении 14 дней культивирования (фото сделано на стереомикроскопе МИКРОМЕД МС-1 при 40х увеличении) : a – *B. licheniformis*; b – *B.cereus* 4b; c-*B. cereus 168*

Качественный анализ полученных осадков был осуществлен в лабораториях НИЦ «Курчатовский Институт» – ПИЯФ и ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Полученные образцы анализировали методом порошковой рентгеновской дифракции с использованием метода Ритвельда. Некоторые образцы были однофазными (*B. licheniformis, B.cereus* BSP, *B.subtilis* K51), но большинство представляли собой смесь кальцита и фатерита в различных сочетаниях.

Самым важным моментом в оценке бактериальных штаммов была проверка их способности заполнять трещины. Для этого в лаборатории были изготовлены образцы из цемента марки М300. После затвердения на них были созданы микротрещины. Бактерии растили в среде СС в течении суток, затем вносили в модифицированную среду В4-М с добавлением 0,3 % ксантана для увеличения вязкости среды. Бактериальные суспензии наносили на поверхность образцов и помещали в термостат на 37 °С. Заживление поверхности образцов наблюдали в течение месяца, периодически добавляя питательную среду. Контрольным был образец без добавления бактерий. По окончании эксперимента образцы высушили и визуально проанализировали на стереомикроскопе МИКРОМЕД МС-1 (Рисунок 2). Бактериальные штаммы *B. licheniformis, B. cereus* 4b, *S. epidermidis* 4a, *M. luteus* BS52, *M. luteus* 6 показали хороший результат, произошло полное заполнение трещин, у штаммов *B. cereus* BSP и *B. cereus* 168 полного заполнения не наблюдалось.

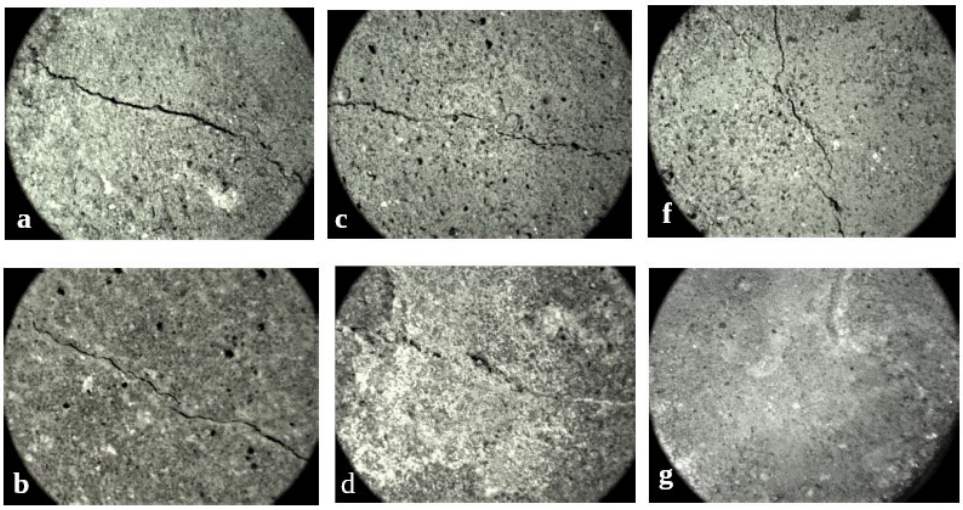


Рисунок 2 – Фотографии заполнения микротрещин на выборке цемент-песчанных образцов. Верхний ряд – исходные трещины, нижний – после месяца культивирования с бактериями: a-b – контроль без бактерий; c-d – *B. cereus* 168; f-g – *B. licheniformis*.

Для дальнейшего изучения процесса кристаллообразования карбоната кальция был отобран штамм *B. licheniformis*, так как по нашим данным он оказался способным образовывать самый стабильный полиморф (кальцит) в достаточных количествах, а также эффективно заполнять микротрещины в цемент-песчаных образцах.

Следует отметить, что биогенные процессы кристаллообразования довольно сложны и протекают в зависимости от различных факторов, включая состав питательной среды, тип бактерий, процесс аэрации. По результатам нашего исследования видно, что у каждого из отобранных штаммов кристаллообразование идет разными способами и приводит к различному выходу осадков и их морфологии при разных условиях. Эти результаты могут привести к разработке методов, необходимых для эффективного управления технологией самовосстановления цементных конструкций.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075–15–2019–1663.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Muynck, W. Microbial carbonate precipitation in construction materials:a review / W. De Muynck, N. De Belie, W. Verstraete // Ecol Eng. – 2010 – № 36. – P. 118–36.
2. Dhami, N.K. Application of calcifying bacteria for remediation of stonesand cultural heritage / N.K. Dhami, M.S. Reddy, A. Mukherjee // FrontiersMicrobiol. – 2014 – № 5. – P. 304
3. Ivanov, V. Environmental safety and biosafety in construction biotechnology. / V. Ivanov, V. Stabnikov, O. Stabnikova, S. Kawasaki //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2019 – № 35(2). – P 26
4. Okafor, N. Environmental microbiology of aquatic and waste systems / N. Okafor. – N. : Springer, 2011 – 307 p.
5. Hammes, F. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation / F. Hammes, W. Verstraete // Rev Environ Sci Biotechnol. -2002 – № 1. – P. 3–7.
6. Stocks-Fischer, S. Microbiological precipitation of CaCO3 / S. Stocks-Fischer, J.K. Galinat, S.S. Bang // Soil Biol Biochem. – 1999 – № 31. – P.1563–1571
7. Курманбаев А.А. Выделение уреолитических бактерий, перспективных для микробиологического осаждения кальцита / А.А. Курманбаев, Г.Ж. Нагметова, Л.Ж. Бижанова, А.Я. Ягофарова, Б.М. Шурабаев // актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук – 2017 – № 4(1). – С. 53–57.
8. Whiffin, V.S. Microbial $CaCO_3$ precipitation for the production ofbiocement : Dissertation / V.S. Whiffin; Murdoch University. – Australia, 2004 – 154 p.
9. Seifan, M. Induced calcium carbonate precipitation using Bacillus species /M. Seifan, A.K. Samani, A. Berenjian // Appl Microbiol Biotechnol – 2016– № 100. – P. 9895–9906

УДК 502

ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОГОЛОЛЕДНОГО РЕАГЕНТА НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИИ ХКНТВ НА ФИТОТОКСИЧНОСТЬ РАСТЕНИЙ

К.В. Пищаева[1], А.С. Макарова[1], А.В. Матасов[1], В.В. Челноков[1]

[1]Российский химико-технологический университет Д.И. Менделеева, Москва, Россия

За последние несколько лет исследователями почти не затрагивалась проблема воздействия противогололедных реагентов (ПГР) на наземные растения, включая морфологические, физиологические изменения и адаптивные реакции при засолении.

Однако, ранее исследователями было отмечено, что при засолении почвы легкорастворимыми солями (которые чаще всего входят в состав применяемых в РФ противогололедных реагентов) отмечается значительное ухудшение состояния растений. Избыток ионов Na^+ и Cl^- может приводить как к осмотическому стрессу, обусловленному дефицитом воды, так и оказывать воздействие на критические биохимические процессы [1, 2]. Во время солевого стресса могут задерживаться появление листьев, замедляется их расширение и способствует старению листьев. Это может быть временным эффектом, а длительное воздействие высокой солености может нанести больший вред, когда ионы Na^+ накапливается в высоких концентрациях [2, 3]. Увеличение концентрации Na^+ может не только снижать активность Ca^{2+}, но также может нарушить на клеточном уровне получение Ca^{2+} [4].

При оценке воздействия солей на растения большой интерес представляет анализ соотношения масс побега и корня. Известно, что степень развития корневой системы определяет устойчивость растений к дефициту воды, который является одним из важных факторов ростингибирующего действия засоления [5].

В результате анализа, приобретенных московскими организациями противогололедных реагентов (см. Рис. 1), авторами отмечено одним из самых закупаемых (по количеству) является жидкий многокомпонентный противогололедный реагент на основе композиции хлористого кальция и натрия (ХКН): жидкий (ХКНж) или твердый (ХКНтв).

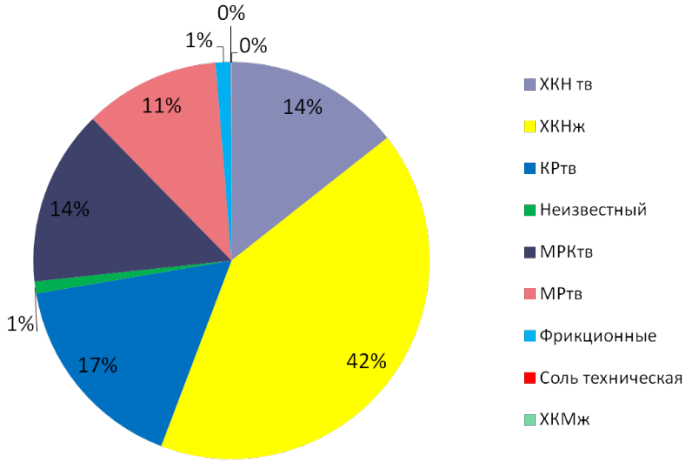


Рис. 1 Общее количество ПГР, приобретенных московскими организациями на осенне-зимний период 2018–2019 гг.

В представленной работе проведено исследование фитопатологического воздействия ХКНтв на горчицу белую (*Sinapis alba*) и редьку масличную (*Raphanus Sativus*). Фитотоксичность ХКНтв оценивали по таким морфологическим показателям, как средняя высота проростков, масса зеленой и корневой части растений.

Также в работе было изучено возможное защитное действие гибридного биопрепарата нового поколения «Почвовит» (тороговая марка 559263). Данный препарат нормализует белковый обмен в клетках растений и стимулирует развитие растения в целом [6]. Раствор препарата добавлялся в вегетационные сосуды один раз в два дня. Растения высаживались в соответствии с ГОСТ Р ИСО 22030–2009.

В таблице 1 представлены значения корневой и зеленой массы горчицы белой (*Sinapis alba*) и редьки масличной (*Raphanus Sativus*).

В результате проведенного экспериментального тестирования было установлено: при добавлении соли зеленая масса горчицы белой (*Sinapis alba*) с увеличение концентрации снижается, а корневая увеличивается. У редьки масличной наблюдается значительное увеличение корневой массы (*Raphanus Sativus*). Редька масличная (*Raphanus Sativus*) значительно более устойчива к действию ХКНтв по сравнению с горчицей белой (*Sinapis alba*), а применение биопрепарата «Почвовит», позволяет увеличить время жизни растений.

Таблица 1. Результаты зеленой и корневой массы растений

Концентрация ПГР (г/л)	Горчица белая				Редька масличная			
	Масса побега		Масса корня		Масса побега		Масса корня	
	грамм	(%)	грамм	(%)	грамм	(%)	грамм	(%)
ПГР								
0,01	0,559	69	0,158	35	1,015	95	0, 312	106
0,03	0,3	37	0,218	48	1,022	95	0,689	229
0,05	0,264	32	0,306	68	0,409	38	0,331	109
ПГР + «Почвовит» (однократно)								
0,01	0,877	109	0,741	165	0,717	67	0,240	79
0,03	0,33	40	0,375	83	0,66	62	0,228	76
0,05	0,25	31	0,318	70	0,071	7	0,074	25
ПГР + «Почвовит» (многократно)								
0,01	0,964	120	0,886	197	0,571	53	0,514	170
0,03	0,217	59	0,224	97	0,745	69	0,347	115
0,05	0,473	27	0,438	50	0,412	38	0,385	127

Полученные результаты показали, что применение ХКНтв приводят к увеличению содержанию в почве ионов Na^+, Cl^- и незначительному увеличению Ca^{2+}, что в свою очередь приводит к уменьшению зеленой массы растений. Это объясняется нарушением водного обмена растений вызванного действием засоления.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18–29–24185.

ЛИТЕРАТУРА

1. Daia H.L., Zhanga K.L., Xua X.L., Yua H.Y. Оценка воздействия противогололедных химических веществ на почву и водную среду, 18-я Международная конференция Международного общества по экологическому моделированию, 2011. – С. 2122–2130.
2. Таванколи Э., Ренгасами П., Макдональд Г.К. Высокие концентрации ионов Na^+ и Cl^- в почвенном растворе оказывают одновременно вредное воздействие на рост бобов faba в условиях соленого стресса, Journal of Experimental Botany, 2010. – С. 4449–4459, doi: 10.1093/jxb/erq251.
3. Таванколи Э., Ренгасами П., Макдональд Г.К. Реакция ячменя на засоленный стресс различна для гидропоники и почвенных систем. Функциональная биология растений, 2010. – С. 621–633.
4. Реза Хади М., Карими Н. Роль кальция в устойчивости растений к соли. Журнал питания растений, 2012, doi: 10.1080 / 01904167.2012.717158.
5. Тарасова Н.П., Макарова А.С. Оценка химического загрязнения в контексте границ планеты, Российский химический вестник, 2016. – С. 65 (5), 1383–1394.
6. Винаров А.Ю., Челноков В.В., Дирина Е.Н. Агрохимия: биодобавки для роста растений и рекультивации почв: учеб. пособие для бакалавриата и магистратуры. – 2-е изд., пер. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2018. – 149 с.

УДК 502

РЕКУЛЬТИВАЦИЯ СВАЛОК И ПОЛИГОНОВ ТВЕРДЫХ КОММУНАЛЬНЫХ ОТХОДОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОПРЕПАРАТОВ

К.В. Пищаева[1], Е.А. Никулина[2], А.С. Макарова[1], А.В. Матасов[1], В.В. Челноков[1]

[1]Российский химико-технологический университет Д.И. Менделеева, Москва, Россия
[2]НИЦ «Курчатовский институт» – ИРЕА, Москва, Россия

На территории России находится большое количество полигонов ТКО (твердых коммунальных отходов), которые оказывают негативное воздействие на компоненты окружающей среды [1]. При закрытии полигонов ТКО возникает необходимость в рекультивации [2]. Одним из наиболее безопасных, экономичных и экологических методов очистки почв от загрязнений, является фиторемедиация [3].



Рис. 1 Точки отбора проб с полигона ТКО «Левобережный.

Представленное в работе исследование проводилось для полигона ТКО «Левобережный» расположенного в Московской области на территории г. Химки. Полигон ТКО «Левобережный» является одним из крупнейших полигонов твёрдых коммунальных отходов в Московской области, где за более 40 лет эксплуатации накопилось более 9 миллионов тонн отходов. В 2012 году полигон был закрыт. В 2021–2022 годах полигон планируют рекультивировать. Для оценки состояния почв полигона были отобраны и проанализированы 5 проб грунта с разных точек полигона ТКО «Левобережный» (см. Рис. 1).

Точечные пробы отбирали методом конверта. Результаты анализа образцов почв на полигоне ТКО «Левобережный» представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты анализа образцов почв на полигоне ТКО «Левобережный»

Элемент	ПДК мг/кг (ГН 2.1.7.2041 - 06)	Среднее содержание элементов в почве, мг/кг	Результаты анализов проб почв на полигоне ТКО «Левобережный», мг/кг					Диапазон превышения ПДК
			1	2	3	4	5	
Zn	23	50	37	48	33	27	51	1,2–2,2
Cu	3	20	9,9	21,7	13,2	15,9	18,9	3,3–7,2
Co	5	8	5,7	3,9	5,7	5,2	14,2	1,1–2,8
Mn	1500	1000	219	158	36	77	678	-
Fe	-	-	10276	9423	7124	15301	26692	-
Cd	2	0,5	0,19	0,17	0,07	0,14	0,48	-
Cr	6	100	15,7	24,4	13,1	23,5	59	2,2–9,8
Pb	32	10	10,7	12,4	12	9,4	12	-
Ni	4	40	10,2	9,9	5,7	12,6	28,5	1,4–7,1
Hg	2,1	0,03	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	-
As	2	6	5,9	4,2	2,6	6,4	10,6	

Результаты анализа проб показали превышение ПДК почвы по следующим элементам: Zn, Cu, Co, Cr, Ni.

Экспериментальная оценка эффективности использования различных видов растения для фиторемедиации загрязненных почв полигона проводилась в лабораторных условиях на модельном грунте, имитирующим почвы полигона ТКО «Левобережный».

Для проведения оценки были отобраны быстрорастущие растения, которые широко распространены в России: горчица белая (*Sinapis alba*), рожь озимая (*Secale cereale*), овес яровой (*Avena sativa*), клевер луговой (*Trifolium pratense*), редька масличная (*Rhophanus sativa var. oleifera leetzg*) и горчица сарептская (*Brassica juncea*). Данные виды растений были посажены в вегетационные сосуды с загрязненной и контрольной почвой в соответствии с ГОСТ Р ИСО 22030–2009 [4].

Также в ходе исследования была оценена эффективность использования гибридного биопрепарат нового поколения «Почвовит» (торговая марка 559263) для повышения роста и развития на загрязненных почвах [5].

Результаты эксперимента показали наиболее стойкими к воздействию тяжелых металлов, являются горчица сарептская (*Brassica juncea*) и овёс яровой (*Avena sativa*), что позволяет использовать их в процессе фиторемедиации почв.

Добавление препарата «Почвовит» оказало положительное влияние на рост только у определённых видов растений: горчицы белой (*Sinapis alba*), ржи озимой (*Secle cereale*), горчицы сарептской (*Brassica juncea*) и овса ярового (*Avena sativa*). Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Усредненная разница между высотой растений в вегетационных сосудах

Растения	Усредненная разница (Δ, см) между высотой растений в загрязненной и контрольной почве		Усредненная разница (Δ, см) между высотой растений в почве с добавлением «Почвовита» в загрязненной и контрольной почве	
	Осень	Весна	Осень	Весна
Горчица белая	-1,23	3,76	2,18	-0,14
Горчица сарептская	0,11	1,20	0,10	0,45
Овес яровой	-0,26	0,88	-0,27	0,62
Рожь озимая	-1,95	-0,02	1,43	-0,05
Клевер луговой	-0,34	0,36	0,14	0,33
Редька масличная	-1,48	0,31	0,17	0,29

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18–29–25071.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рекомендации по проектированию, строительству и рекультивации полигонов ТБО // Академия коммунального хозяйства им. К.Д. Памфилова – Москва, 2009. – 27 с.
2. Makarova A.S., Meshalkin V.P., Klemeš J.J., Kudryavtseva E.I, Bulatov I., Ecological and Economic Model of Performance Evaluation of the Companies Involved in the Responsible Care® Program, Chemical Engineering Transactions, 61. – 2017. – P.1477–1482.
3. Куприенко П.С., Ашихмина Т.В., Овчинникова Т.В., Пинчук М.И. Рекультивация закрытых полигонов ТБО // Пожарная безопасность: проблемы и перспективы. – Воронеж, 2017. – Т.1. – № 8. – С. 445–447.
4. ГОСТ Р ИСО 22030–2009 Качество почвы. Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений. Введ. 01.01.11. – М.: Стандартинформ, 2019. – 16 с.
5. Винаров А.Ю., Челноков В.В., Дирина Е.Н. Агрохимия: биодобавки для роста растений и рекультивации почв: учеб. пособие для бакалавриата и магистратуры. – 2-е изд., пер. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2018. – 149 с.

УДК 577.114

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ НИЗКИХ ДОЗ НЕОНИКОТИНОИДОВ И КРИТЕРИЙ ИХ ТОКСИЧНОСТИ ДЛЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Е.С. Салтыкова, Л.Р. Гайфуллина, М.Д. Каскинова, А.В. Поскряков, А.Г. Николенко

Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних двух десятилетий неоникотиноиды остаются основной группой высокоэффективных и широко используемых инсектицидов. Неоникотиноиды оказывают влияние на нецелевых беспозвоночных, вызывая их гибель. Действие неоникотиноидов причисляют к ряду факторов, вызывающих массовые потери пчелиных семей в разных странах мира. Неоникотиноиды неблагоприятно воздействуют на воспроизводство и развитие личинок, нарушают координацию, обонятельную память, навигационные способности пчел. Крупномасштабные исследования в разных странах свидетельствуют, что распад пчелиных семей является результатом действия нескольких факторов, в том числе неоникотиноидов, увеличивающих восприимчивость пчелиных семей к болезням.

Очень часто они включают широкий спектр воздействий в мало значимых, фоновых концентрациях, в том числе на особей пчелиной семьи, не посещающих растения с целью опыления – это матка и трутни [1; 2].

Хотя трутни не участвуют в задачах жизнеобеспечения колонии, но их жизнь находится под влиянием инсектицидов аналогичным образом, как и других ее членов, потому что они проводят свои первые дни до половой зрелости в колонии и вскармливаются загрязненной пищей, привнесенной рабочими пчелами с полей обработанными неоникотиноидами.

Цель исследования – оценка последствий разового и хронического воздействия на трутней при действии фоновой концентрации (5 ppb) имидаклоприда (IMD) на сперматозоиды, их подвижность, жизнеспособность, активность АТФазы митохондрий, протеолитический состав эякулята.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился во время пчеловодного сезона (июнь–август 2018) и трутни выращивались в пчелиных семьях (Apis mellifera carpatica). Каждая пчелиная семья содержала 2-летнюю королеву, естественно спарившуюся. Девять пчелосемей были случайным образом распределены на три группы. Семьям контрольной группы давали пищу, свободную от имидаклоприда (IMD), в то время как пища, вводимая в колонии из групп P (разовый контакт с IMD) и X (хроническое отравление IMD в течение 10 дней) была загрязнена 5 ppb отравляющего препарата. Пчелы питались сахарным сиропом (соотношение сахар к воде 5: 3). Предполагается, что IMD был передан также всем особям в улье, включая трутней. Королевы во всех ульях были временно изолированы в верхней части соторамок для создания трутневого потомства. Все королевы были сестрами, воспитанными от одной матери-королевы. Изолированные трутневые ячейки были запечатаны на 23-й день после откладки яиц, рамки с трутневым расплодом были помечены.

Появившиеся трутни были взвешены и помечены цветным маркером, а затем они были помещены в пчелиные семьи с изоляторами, где они оставались до конца изучения. Трутни оставались в колониях до 15 дней. За три-четыре часа до сбора спермы трутни отлавливались и доставлялись в лабораторию вместе с рабочими пчелами в клетках (130 × 115 × 70 мм), снабженные кормом. Масса тела трутней у всех групп была в среднем одинаковой (330,6 ± 21,5, 322,9 ± 30,3 и 321,1 ± 30,7 мг, для контроля, разовой интоксикации IMD и хроническим отравлением соответственно) и различия не были статистически значимы ($p = 0,12$). Сперма была собрана капилляром, провоцируя извлечение копулятивного органа эндофаллуса у трутней. Каждый самец давал примерно 1 мкл эякулята. Суспензии спермы с небольшим разбавлением 1:1 физиологическим раствором были взяты для анализа подвижности сперматозоидов. Подвижность сперматозоидов была оценена субъективно с использованием микроскопа Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Определение активности АТФазы. Активность оценивали по приросту неорганического фосфата после инкубации при 370С и выражали в наномолях неорганического фосфата (Фн) отщепленного 1 мг белка в 1 мин. Активность Na+, K+ – АТФазы измеряли в той же среде, заменяя 15 мМ NaCl на 15 мМ 51 KCl.

Неорганический фосфат определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 390нм. Данный метод основан на изменении поглощения молибдата в невосстановленном комплексе фосфорномолибденовой кислоты. Он позволяет с большой точностью определять неорганический фосфор в присутствии легкогидролизуемых фосфорных эфиров.

Данные представлены в виде среднеарифметических значений. Их достоверность определяли по t-критерию Стьюдента, пользуясь программой Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тестирование качества спермы трутней важно для контроля и понимания биологии спаривания медоносных пчел, в том числе здоровья трутней, конкуренции спермы при полиандрии пчел. Информативность единичных тестов очень ограничена для оценки качества спермы у трутней. Таким образом, подход множественного тестирования рекомендуется для того, чтобы учесть разные аспекты репродуктивного поведения трутней. Контроль качества спермы важен, чтобы оценить эффективность и / или нарушение сперматогенеза, а также оценить, насколько трутни могут потенциально оплодотворять королев и обеспечивать продуктивность колоний. Подвижность сперматозоидов отражает как энергетическую эффективность и качество моторики аппарата; это также важно для передачи спермы королеве в сперматеке. Измерения активности АТФ-азы в сперме необходимо для косвенной оценки функции митохондрий, которые особенно важны для производства энергии во время движения спермы.

Половозрелые трутни из контрольных ульев без проблем расправляли копулятивный орган для взятия у них спермы. Под микроскопом в поле зрения сперма представляла густую подвижную массу. При действии на пчелиную семью разовой дозы имидаклоприда 5ppb у трутней наблюдали затруднения с расправлением эндофаллуса и под микроскопом наблюдали в поле зрения образование концентрических кругов из сперматозоидов, которые двигались по кругу. При хроническом употреблении имидаклоприда пчелиной семьей у трутней снижается тургор брюшка, возникают проблемы со сбором спермы. Под микроскопом сперматозоиды представляют разреженные неподвижные нитевидные образования. Изменения в состоянии спермы и копулятивного аппарата трутней могут представлять серьезную проблему для оплодотворения королевы, что может привести к сокращению численности пчелиных семей и даже гибели.

Подвижность сперматозоидов является важным параметром качества спермы [3]. Подсчитано, что только 2,5 % сперматозоидов активно мигрируют на длительное хранение в сперматеке королевы для оплодотворения. Wegener и соавт. [4] обнаружили корреляцию между подвижностью спермы и показателями производительности сперматозоидов в осеменении королевы. В нашем исследовании мы заметили значительное снижение подвижности сперматозоидов не только для трутней, которые подвергаются длительному воздействию низкой концентрации IMD, но и разовому. Сублетальные изменения в подвижности сперматозоидов не могут быть исключены, например, через совокупные эффекты низких концентраций IMD.

Изменения мембранного потенциала митохондрий могут быть чрезвычайно важными для жизнеспособности и подвижности сперматозоидов медоносных трутней [5]. Митохондрии охватывают основание жгутика сперматозоида. Активность фермента АТФазы спермы важна как параметр для оценки функции митохондрий, которые жизненно важны для производства энергии во время движения спермы. Наши результаты показали значительные воздействие IMD на активность данного показателя (табл. 1).

Таблица 1. Снижение активности АТФ-азы в сперме трутней от дозы имидаклоприда

Вариант	Активность АТФазы (нмоль/мин/мг белка)
Контроль	12,33± 0,05
5ppb разовое	5,4±0,02
5ppb хроническое	3,97±0,04

Потенциальный механизм различия в жизнеспособности сперматозоидов между колониями может быть связан также с различиями в содержании белка в семенной жидкости [6]. Возможно, такие различия отражают механизм влияния IMD на репродуктивный потенциал трутней. Это важно отметить, потому что в полевых условиях такой факт не может оказать особо заметного влияния на плодовитость королевы, так как королевы спариваются примерно с 20-ю трутнями и могут собрать в спермаприёмнике достаточный запас жизнеспособных сперматозоидов. При таких условиях наличие достаточного количества жизнеспособных сперматозоидов может сохранить репродуктивный потенциал королевы.

Наши данные значительно дополняют эти результаты, демонстрируя, что мужское репродуктивная система также может быть нарушена неоникотиноидами. Следовательно, воздействие неоникотиноидов на медоносных пчел может потенциально нарушать репродуктивный потенциал трутней и, возможно, приведет к постепенной гибели колонии из-за плохого качества спаривания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раннее реагирование спермы трутней на незначительное отравление неоникотиноидами помогает спрогнозировать развитие дальнейшей реакции ульевых пчел. Ранее результаты наших исследований показали, что хроническое действие имидаклоприда нарушает реакцию защитных систем рабочих пчел. Нарушается работа пищеварительного тракта и разрушение клеток жирового тела, что в целом ведет к снижению иммунитета. Нарушение структуры семенной жидкости у трутней может служить маркером раннего отравления пчел при посещении агроценозов.

Работа поддержана грантом РФФИ 19–54–70002 е-Азия_т и часть ее выполнена в рамках госзадания № 01201350736.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dively G.P., Embrey M.S., Kamel A., Hawthorne D.J., Pettis J.S. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honeybee colony health. PLoS ONE. 2015. 10 (3). 11–87.
2. Pisa L.W., Amaral-Rogers V., Belzunces L.P., Bonmatin J.M., Downs C.A. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environ. Sci. Pollut. Res. 2015.22 (1). 68–102.
3. Cresswell, J.E. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honeybees. Ecotoxicology. 2011. 20 (1). 149–157.
4. Wegener J., May T., Knollmann U., Kamp G., Müller T. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honeybee semen. Cryobiology. 2012. 65 (2), 126–131.
5. Ruttner F., Koeniger G. Die Füllung der Spermatheka der Bienenkönigin. Aktive Wanderung oder passiver Transport der Spermatozoen? Z. Vgl. Physiol. 1971. 72. 411–422.
6. Baer B., Zareie R., Paynter E., Poland V., Millar A.H. Seminal fluid proteins differ in abundance between genetic lineages of honeybees. J. Proteom. 2012. 75 (18). 5646–5653.

УДК 579.222.4, 57.033

ГУМИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ РАЗНЫХ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ, В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССОВ МЕТАНООБРАЗОВАНИЯ

Н.А. Степанов, О.В. Сенько, Е.Н. Ефременко

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

Гуминовые вещества (ГВ) сегодня широко используются в качестве органических удобрений, стимуляторов роста растений, в животноводстве, для ремедиации почв и водоемов, фармакологии и медицине [1–2]. В основу классификации ГВ положено их различие, связанное с извлечением этих соединений из природных объектов (почва, торф, угль, сланец, морские и озерные отложения). Сложность строения ГВ и наличие большого количества функциональных групп обусловливают широкий спектр взаимодействий, в которые могут вступать эти вещества. Недавние исследования показали, что наличие ГВ при анаэробном разложение различных органических субстратов может приводить к ингибированию процесса газообразования, в частности синтеза CH_4 [3–4]. Эти результаты могут быть использованы для решения такой экологической проблемы как снижение эмиссии свалочных газов с полигонов твёрдых бытовых отходов (ТБО) и мусорных свалок. Однако, существует огромная разница в действии различных ГВ, определяемая их химическим составом [5].

В этой связи была проведена экспериментальная оценка влияния гуминовых препаратов различного происхождения – гумат калия (ГК), полученный из леонардита, фульвовые кислоты (ФК), выделенные из грунтовых вод (Humintech, Германия), и сапропель (ООО «ЭКОСАП», Россия) – на метаболическую активность анаэробного консорциума, полученного из полигона в процессе метаногенеза. Процесс проводился в анаэробных реакторах с питательной средой, приготовленной на основе 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,2) и содержащей 1 г/л глюкозы в качестве единственного источника углерода при 37^{o}C в течение 21 сут.

В присутствии ГК наблюдалось ингибирование процесса метаногенеза и синтез метана, причем ингибирование метаногенеза усиливалось с ростом концентрации ГК. В то же время введение в питательную среду сапропеля и ФК приводило к стимулированию синтеза биогаза и увеличению в нем доли CH_4 в сравнении с контрольным образцом (без ГВ). ГК в сравнении с другими препаратами характеризовался большей гидрофобностью из-за наличия ароматических групп, в то время как ФК и гуминовые вещества сапропеля, наоборот, более гидрофильные. Известно, что в состав сапропеля входят различные природные компоненты, в частности, целлюлоза, которые могут использоваться микроорганизмами в качестве дополнительных источников питательных и биологически активных веществ, приводя к увеличению эффективности метаногенеза. Таким образом, для снижения выбросов CH_4 в процессе метаногенеза наиболее эффективным оказался гумат калия, полученный из леонардита.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18–29–25065).

ЛИТЕРАТУРА

1. Olk D.C., Dinnes D.L., Scoresby J.R., Callaway C.R., Darlington J.W. Humic products in agriculture: potential benefits and research challenges – a review. J. Soils Sediments, 2018, 18(8), 2881–2891.
2. Jacod K.K., KJ P.P., Chandramohanakumar N. Humic substances as a potent biomaterials for therapeutic and drug delivery system-a-review. Int. J. App. Pharm., 2019, 11(3), 1–4.
3. Yap S.D., Astals S., Lu Y., Peces M., Jensen P.D., Batstone D.J., Tait S. Humic acid inhibition of hydrolysis and methanogenesis with different anaerobic inocula. Waste Manag., 2018, 80, 130–136.
4. Hao X., van Loosdrecht M.C., Luo Y., Cao D. Effect of humic acids on batch anaerobic digestion of excess sludge. Water Res., 2019 155, 431–443.
5. Liu K., Chen Y., Xiao N., Zheng X, Li M. Effect of humic acids with different characteristics on fermentative short-chain fatty acids production from waste activated sludge. Environ. Sci. Technol., 2015, 49, 4929–4936.

УДК 66.047

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ПРИРОДНОГО ОРНАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ИЗ ПОТОКА РАССЕЯНИЯ ВЫСКОКСУЛЬФИДНОГО ХВОСТОХРАНИЛИЩА

А.С. Розанов[1,2], И.Н. Мягкая[2], Н.И. Ершов[1], Б.Ю. Сарыг-оол[2], М.А. Густайтис[2], А.А. Шипова[1], В.С. Ушаков[1], Е.В. Лазарева[2], С.Е. Пельтек[1]

[1]Институт цитологи и генетики СО АРН, Новосибирск, Россия
[2]Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО АРН, Новосибирск, Россия

Природное органическое вещество (торф, почва и др.) считается превосходным геохимическим барьером, интенсивно аккумулирующий различные элементы от тяжелых до благородных металлов [Lazareva et al., 2019], что позволяет использовать вещество в качестве агента для предотвращения экологической опасности вызванной воздействием кислых дренажных растворов на окружающую среду [Parviainen et al., 2014] и для концентрирования благородных металлов с перспективой будущего извлечения [Kuimova et al., 2011].

Кислые среды со значениями pH <5 (например, почвы и некоторые водоемы) широко распространены в литосфере. Однако сильнокислые (pH <3) среды встречаются гораздо реже. Это могут быть природные или антропогенные экосистемы, имеющие литотрофное происхождение. Ацидофилы встречаются среди представителей всех доменов дерева жизни [Johnson & Quatrini-Nyqvist 2016]. К чрезвычайно ацидофильным прокариотам относятся представители альфа-протеобактерий, бета-протеобактерий и гамма-протеобактерий, а также несколько видов класса ацидитиобациллий. Другие грамотрицательные ацидофилы являются представителями значительно дивергированных типов: Nitrospirae (Leptospirillum spp.), Aquificae и Verrucomicrobia. Грамположительные экстремальные ацидофилы встречаются среди представителей типов, Actinobacteria и Firmicutes, и включают некоторых из наиболее метаболически разносторонних из всех экстремофильных прокариот. В Домене Archaea экстремальные ацидофилы обнаружены среди Euryarchaeota (который включает Picrophilus spp., наиболее ацидофильные из всех известных в настоящее время форм жизни) и Crenarchaeota (в основном термоацидофильные). Экстремальные ацидофилы также можно найти во многих ветвях Eukarya, включая грибы, зеленые и красные водоросли и диатомовые водоросли, амебы, жгутиконосцы и инфузории [Aguilera et al., 2016]. В экстремально кислых средах как естественного, так и антропогенного происхождения видовое разнообразие значительно ниже, чем в средах с нормальными условиями. Независимо от конкретного типа среды обитания, относительно небольшое количество видов бактерий и архей составляют большую часть кислых микробиомов. различных преобладающих ацидофилов варьируются в зависимости от конкретного сообщества [Teng et al., 2017].

Урское хвостохранилище сформировано среди жилого поселка (Кемеровская область, п. Урск) и сложено отходами цианирования первичных высокосульфидных полиметаллических руд и руд зоны окисления Ново-Урского месторождения. Вещество отходов не закреплено никаким образом и более 80 лет сносится в нижележащий заболоченный лог, где происходит длительное взаимодействие природного органического вещества со снесенными отходами и дренажными высокоминерализованными водами, формирующимися счет окислительного выщелачивания отходов [Myagkaya et al., 2016]. Урское хвостохранилище представляется прекрасным модельным объектом, на котором in sito показано аутигенное образования минералов (сульфаты: гипс, ярозит, барит, англезит; гидроксиды Fe(III); вторичные алюмосиликаты; сульфиды Fe: фрамбоидальный пирит; сульфиды Zn: группа сфалерита; сульфиды Hg: метацинабарит с разным количеством Ag, Zn, Cu, Se, I, P и др.; селениды Hg: тиманнит; йодиды Ag: йодаргирит; самородное Au) в природном органическом веществе, взаимодействующем с Al-Fe-SO_4 дренажным раствором [Myagkaya et al., 2020], связанное с концентрированием соответствующих элементов (11700 г./т Hg, 41300 г./т Zn, 6060 г./т Se, 155 Au г/т, 534 Ag г/т, 416 г./т I). Эти процессы преимущественно наблюдались в части потока рассеяния, покрытой отходами руд зоны окисления. Природное органическое вещество потока рассеяния сложно отнести к классическому торфу, поскольку зольность из-за техногенной нагрузки у вещества выше 20 %, положенных таковым (21.3–96.9 %) [Lazareva et al., 2019].

В потоке рассеяния местами сохранились неразложенные под действием дренажных вод и отходов болотные кочки (остатки кочек осоки), а также пни деревьев. В результате были сформированы экологические ниши, в которых присутствует вещество с ярко выраженным литотрофным происхождением которое взаимодействует с поверхностным органическим материалом. В современной экосистеме такие условия формируются достаточно редко [Hedrich & Schippers 2016], населяющие их микробные сообщества представляют значительный интерес как с точки зрения метаболизма литотрофных микроорганизмов, так и с точки зрения филогении микроорганизмов и поиска новых видов. Кроме того, в природном органическом веществе были ранее зафиксированы клетки микроорганизмов, покрытые Hg-содержащими минералами [Myagkaya et al., 2020]. Знание об особенностях микробного сообщества этого природного органического вещества позволит понять природу процессов концентрирования и аутигенного образования этих минералов.

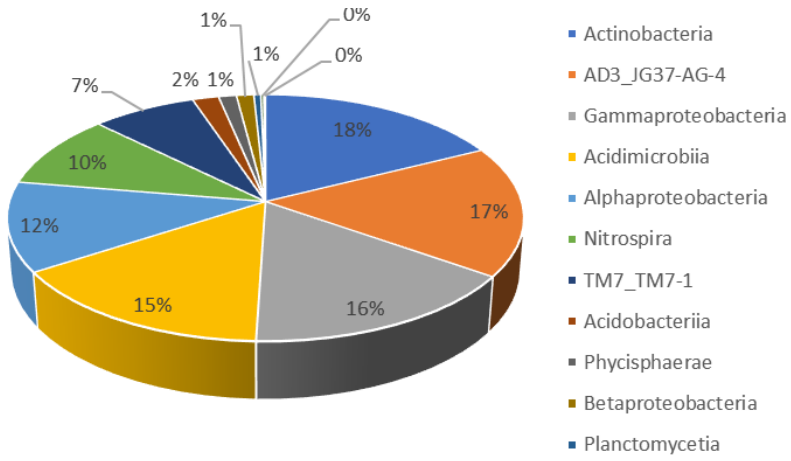


Рисунок 1. Содержание микроорганизмов в микробном сообществе в природном органическом веществе из области потока рассеяния, покрытой отходами руд зоны окисления Урского хвостохранилища, по данным 16s рРНК ген направленного метагеномного анализа

В ходе экспедиционной работы в июле 2019 года для изучения микробных сообществ в веществе потока рассеяния Урского хвостохранилища отобрано природное органическое вещество из части потока рассеяния, которая покрыта отходами руд зоны окисления. Из полученных образцов была выделена суммарная ДНК которая была использована для амплификации фрагмента гена 16S рРНК при помощи праймеров U341F (5'–CCTACGGGRSGCAGCAG-3') и U806R (5'–GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') [Rozanov et al., 2014].

Для получения библиотек генов с наименьшим смещением численности была использована фьюжен полимераза Q5 (NewEnglandBiolabs) и низкая температура отжига праймеров. Баркодированные библиотеки получали в ходе второго раунда ПЦР с использованием праймеров с довесками, содержащими технические последовательности и восьмибуквенные баркоды. Секвенирование было выполнено в Лаборатории геномики ИМКБ СО РАН на приборе Illumina MiSeq с использованием набора TG MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle). Секвенированные риды были автоматически разделены по баркодам.

Парные прочтения, полученные в ходе секвенирования библиотек 16S rRNA были обработаны с помощью платформы QIIME2 v. 2020.2 (https://doi.org/10.1038/s41587–019–0209–9). Удаление шума, объединение парных прочтений и конструирование OTUs выполнялось по алгоритму DADA2. Для таксономической классификации OTUs искпользовался классификатор scikit-learn, обученный на фрагментах 16S рРНК базы данных Greengenes v. 13 8, ограниченных использованными праймерами.

В сообществе значительную долю (рис. 1) занимают представители следующих типов Actinobacteria 18 %, Gammaproteobacteria 16 %, Acidimicrobiia 15 %, Alphaproteobacteria 12 % и Nitrospira 10 %. Также значительную долю занимаю представители двух кандидатных типов не имеющих культивируемых представителей это AD3_JG37-AG-4 17 % и TM7_TM7–1 7 %. Кроме не культивируемых типов в сообществе выявлены и другие мало изученные виды бактерий.

Таким образом можно заключить, что изученное сообщество имеет достаточно необычную структуру и включает представителей двух малоизученных типов бактерий, описанных только по данным метагеномного анализа.

Работа проведена в «ЦКП Многоэлементных и изотопных исследований ИГМ СО РАН» и "Лаборатории молекулярных биотехнологий ИЦиГ СО РАН" при поддержке гранта РНФ 18–77–10056.

ЛИТЕРАТУРА

Aguilera A, Olsson S, Puente-Sa´ nchez F: Physiological and phylogenetic diversity of acidophilic eukaryotes. In Acidophiles: Life in Extremely Acidic Environments. Edited by Quatrini R, Johnson DB. Caister Academic Press; 2016:107–118

Hedrich, S., & Schippers, A. (2016). Distribution of acidophilic microorganisms in natural and man-made acidic enviroments. *Acidophiles: Life in Extremely Acidic Environments*, 153–175.

Johnson, D.B., & Quatrini-Nyqvist, R.C. (2016). Acidophile Microbiology in Space and Time.

Kuimova N.G., Pavlova L.M., Sorokin A.P., Noskova L.P., Sergeeva A.G. (2011). Experimental modeling of gold concentrating processes in peat. *Litosfera* 4, 131–136.

Lazareva E.V., Myagkaya I.N., Kirichenko I.S., Gustaytis M.A., Zhmodik S.M. (2019). Interaction of natural organic matter with acid mine drainage: *In-situ* accumulation of elements. *Science of the Total Environment* 660, 468–483.

Myagkaya I.N., Lazareva E.V., Gustaitis M.A., Zhmodik S.M. (2016). Gold and silver in a system of sulfide tailings. Part 1: Migration in water flow. *Journal of Geochemical Exploration* 160, 16–30.

Myagkaya I.N., et al. (2020). Interaction of natural organic matter with acid mine drainage: Authigenic mineralization (case study of Ursk sulfide tailings, Kemerovo region, Russia). *Journal of Geochemical Exploration 211*, 106456.

Parviainen A. et al.. (2014). Pre-mining acid rock drainage in the Talvivaara Ni–Cu–Zn–Co deposit (Finland): Natural peat layers as a natural analog to constructed wetlands. *Journal of Geochemical Exploration* 143, 84–95.

Rozanov, A.S. et al. (2014). Molecular analysis of the benthos microbial community in Zavarzin thermal spring (Uzon Caldera, Kamchatka, Russia). BMC genomics, 15(12), S12.

Teng, W., Kuang, J., Luo, Z., & Shu, W. (2017). Microbial diversity and community assembly across environmental gradients in acid mine drainage. Minerals, 7(6), 106.

УДК 543.9:664

БАКТЕРИИ *PARACOCCUS YEEI*, ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МЕТОДОМ, КАК ОСНОВАБПК-БИОСЕНСОРА

О.А. Каманина, Е.А. Ланцова, П.В. Рыбочкин

Тульский государственный университет, Тула, Россия

В течение последних лет качество поверхностных вод изменялось, поскольку работа промышленных предприятий приводит к увеличению загрязнения рек, озер, водохранилищ, морей [1]. Для обеспечения экологического контроля существуют различные методы и оборудование для чувствительной оценки степени загрязнения воды. Одним из наиболее широко используемых показателей для мониторинга загрязнителей в водной среде является биохимическое потребление кислорода (БПК). Методы определения БПК являются довольно сложными и трудоемкими процедурами, которые требуют значительных затрат времени. Разрабатываются экспресс-методы определения БПК с использованием биосенсорных анализаторов, основанных на применении микроорганизмов, способных метаболизировать различные органические соединения.

За последнее время было разработано значительное количество различных БПК-биосенсоров, предназначенных для сокращения необходимого времени измерения, в том числе основанные на определении бактериального дыхания, потреблении кислорода иммобилизованными бактериями, различных ферментативных реакций и биолюминесценции [2]. БПК-биосенсоры по виду применяемого биоматериала можно классифицировать на биосенсоры с использованием популяции микроорганизмов или с использованием индивидуальной культуры. Применение активного ила позволяет увеличить количество возможных биодеградируемых органических веществ, так как биосенсорные элементы будут адаптированы к химическому составу анализируемых сточных вод. Однако, данные сенсоры достаточно нестабильны в работе, так как биоценоз активного ила может изменяется в течение времени, характеризуются недостаточно высокими значениями воспроизводимости, операционной и долговременной стабильностями. Поэтому более эффективно применять чистую культуру микроорганизмов, выделенных из активного ила [3].

Однако, биоматериал в составе биорецепторного элемента биосенсора подвержен воздействию со стороны множества физико-химических факторов окружающей среды, что может вызвать потерю его активности и влиять на результаты проводимого анализа. Помимо этого, параметры природных объектов не стабильны и постоянно изменяются, что также отражается на активности биоагентов. На окислительную способность биологического материала могут оказывать влияние различные факторы: изменение pH, температуры, присутствие ионов тяжелых металлов, УФ излучение, ионная сила раствора. Для получения более стабильного и устойчивого к вымыванию, сохраняющего активность биоматериала, имеющего быстрое время отклика, применяются методы иммобилизации. По сравнению со свободными системами благодаря иммобилизации у биологического материала часто происходит увеличение показателей стабильности, устойчивости, активности и селективности [4].

Среди различных методов иммобилизации биоматериала (ферментов, клеток, антител, тканей) особенно выделяется инкапсулирование в золь-гель матрицы благодаря следующим своим преимуществам: простоте исполнения, экспрессности, нетоксичности, более высокой электропроводность получаемой матрицы по сравнению с традиционно используемыми органическими матрицами, постоянству занимаемого носителем объема вне зависимости от состава среды, сохранению биологической активности ферментов, низкой стоимости и доступности прекурсоров. [5] При использовании золь-гель технологии возможно более легкое и простое формирование электрохимических и оптических биосенсоров, которые можно применять для определения концентрации различных аналитов в тестируемых растворах. Также такой способ иммобилизации способен в некоторых случаях повышать термостабильность, механическую стойкость и устойчивость по отношению к растворенным веществам.

Ранее в нашем научном коллективе [6] была установлена возможность инкапсулирования дрожжей в органосиликатные матрицы с использованием золь-гель технологий, как способа получения стабильных гетерогенных биокатализаторов БПК – биосенсоров. Дрожжи участвуют в формировании архитектуры гибридного материала, и в определенных условиях образуется структура «клетки в оболочке». Чаще всего в качестве биоматериала используются дрожжи благодаря своей устойчивости к отрицательным факторам окружающей среды. Однако, с другой стороны, культуры дрожжей более подвержены воздействию загрязнения по сравнению с бактериальными. *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 возможно использовать для анализа БПК благодаря их широкой субстратной специфичности, способности обитать в условиях высокой солёности и функционировать в диапазоне температур 4–48 °С.

На первом этапе работы была проведена иммобилизация бактерий в матрицу на основе тетроэтоксисилана (ТЭОС) и метилтриэтоксисилана (МТЭС) 50/50 и структуроуправляющего агента поливинилового спирта (ПВС). Исследование полученного биокатализатора проводили методом низкотемпературной адсорбции азота с целью изучения пористости и удельной поверхности образца. Полученная изотерма относится к IV типу, т. е. характерна для адсорбции в мезопористых телах и характерна для неорганических оксидов. Форма гистерезиса обусловлена формой и типом пор. При анализе изотермы наблюдается гистерезис типа H3 (согласно классификации IUPAC) между изотермами адсорбции и десорбции, следовательно, скорее всего образец имеет щелевидные поры. На основании модели Барретта-Джойнера-Халенды (БДХ) получено распределение пор по объему для биокатализатора на основе иммобилизованных бактерий в золь-гель матрицу с соотношение силановых прекурсоров ТЭОС\МТЭС: 50\50. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что в образце присутствует наибольшее количество пор в диапазоне от 4 до 40 нм, т. е. преобладают мезопоры (согласно классификации IUPAC). В мезопорах происходит капиллярная конденсация, на изотермах наблюдается характерная петля гистерезиса. Все это говорит о том, что микроорганизмы не способны вымываться из матрицы и надежно закреплены в золь-гель матрице, в то же время продукты их жизнедеятельности и субстраты диффундируют сквозь эти поры без затруднений.

На следующем этапе работы с помощью биосенсорного метода была изучена дыхательная активность иммобилизованных бактерий *P. yeei*. Была получена градуировочная зависимость биорецептора, которая описывается уравнением типа Михаэлиса-Ментен, т. к. биологический ответ в системе обеспечивается ферментативными реакциями. Были определены следующие характеристики: коэффициент чувствительности, диапазон определяемых концентраций, предел обнаружения и долговременная стабильность. Для определения БПК ранее применялась культура бактерий *P. yeei* ВКМ В-3302, которые были иммобилизованы в гидрогель поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном.

Таблица 1 Сравнение характеристик биосенсоров на основе клеток *Paracoccus yeei*, иммобилизованных в золь-гель матрицу с соотношением ТЭОС/МТЭС 50/50 (**I**) и в гидрогель поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном (**II**)

Характеристика	*Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, иммобилизованные в	
	I	**II**
Коэффициент чувствительности, 10^{-3}*мин$^{-1}$	4,6±0,2	1,1
Диапазон определяемых концентраций, мг/дм^3	0,07–2,4	0,6–142
Долговременная стабильность, сутки	более 15	-
Относительное стандартное отклонение, %	7	8,3

Показано, что иммобилизация *P. yeei* в кремнийорганическую золь-гель матрицу позволила получить биорецептор, характеризующийся повышенной чувствительностью, более низкой нижней границей определяемых концентраций и меньшей величиной относительного стандартного отклонения по сравнению с клетками, иммобилизованными в гидрогель поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном. Вероятно, это связано с наиболее эффективным удерживанием иммобилизованных золь-гель методом дрожжей *P. yeei*.

Разработанный рецепторный элемент возможно применять для анализа БПК относительно чистых речных и очищенных сточных вод без разбавления, а загрязненных речных и сточных вод с разбавлением пробы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–33–70078 и при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых ученых – кандидатов наук договор № МК-1349.2020.3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gosse, Y. Ferro, Cl. Durrieu // Methods for evaluating the pollution impact of urban wet weather discharges on biocenosis: A review // Water Research. – 2016. – V. 89(1). – P. 330–354
2. T. Yamashita, N. Ookawa, M. Ishida, H. Kanamori, H. Sasaki, Y. Katayose, H. Yokoyama // A novel open-type biosensor for the in-situ monitoring of biochemical oxygen demand in an aerobic environment // Sci Rep. – 2016. – V.6. -38552
3. Н.Ю. Юдина, Т.Н. Абрамова, В.А. Арляпов // Создание биосенсора на основе бактерий, выделенных из активного ила, для экспресс-мониторинга водных сред // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2018. – № 1
4. I. Eş, J.D.G. Vieira, & A.C. Amaral, // Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2015. – V. 99(5). – P.2065–2082.
5. M. Blondeau, T. Coradin // Living materials from sol–gel chemistry: current challenges and perspectives // Journal of Materials Chemistry. – 2012. – V. 22(42). – P. 335–343.4.
6. О.Н. Понаморева, и др. // Дрожжи Debaryomyces hansenii в органосиликатной оболочке как основа гетерогенного биокатализатора // Журнал Биотехнология 2017, Т. 33, No 4, С. 44–53
7. Т.Н. Абрамова, и др. // Разработка БПК-биосенсора на основе бактерий Paracoccus yeei, выделенных из активного ила // Сборник тезисов участников форума "Наука будущего – наука молодых". – 2017. – С. 248–250

УДК 579.6

ИЗУЧЕНИЕ ДЕСТРУКЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ АКТИВНЫХ КОНСОРЦИУМОВ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

С.А. Айткельдиева, Э.Р. Файзулина, О.Н. Ауэзова, Л.Г. Татаркина, Г.А. Спанкулова

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

В настоящее время одной из самых глобальных проблем является загрязнение окружающей среды нефтяными углеводородами из-за их токсичности для всех форм живых организмов. Восстановление загрязненных территорий методом биоремедиации с использованием нефтеокисляющих микроорганизмов является наиболее эффективным способом, так как обычные физико-химические методы восстановления являются технически, а также экономически сложными. В связи с тем, что значительная часть нефтезагрязненных участков расположена на территориях с высокими температурными показателями, проводятся многочисленные исследования по выявлению и изучению термотолерантных микроорганизмов-деструкторов нефти с целью дальнейшего их применения для ремедиации нефтезагрязненных территорий. Такого рода исследования на сегодняшний день являются актуальными.

Температура играет жизненно важную роль в биоремедиации нефтяных загрязнений. Она влияет как на физическое состояние углеводородов, присутствующих на загрязненном участке, так и на микроорганизмы находящихся в почве. Это влияние выражается в темпах роста микроорганизмов и их метаболизме. От температуры сильно зависят биодоступность и растворимость гидрофобных веществ, таких как алифатические и полиароматические углеводороды. В жарком климате летучие углеводородные фракции быстро испаряются, а оставшиеся длинноцепочечные алифатические и ароматические компоненты сложнее подвергаются деградации и могут оставаться в окружающей среде длительное время.

Специфические климатические условия являются селектирующим фактором, способствующим выживанию аборигенных микроорганизмов с определенными свойствами: способностью выдерживать высокие температуры, соленость и недостаток влаги в почве. Именно бактерии с такими свойствами способны эффективно утилизировать нефть на территориях с жарким аридным климатом.

Были созданы консорциумы на основе активных штаммов термотолерантных микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана. В их состав входили представители родов *Rhodococcus, Gordonia, Bacillus, Brevibacillus* и *Pseudomonas*. После предварительных исследований было отобрано 4 консорциума, активно растущих на нефти при 35 ℃, 2 консорциума – при 40 ℃ и 5 консорциумов – при 50 ℃. Изучена их способность деградировать нефть в концентрациях 2; 5; 7; 15 % в жидкой минеральной среде.

Установлено, что при 35℃ и содержании нефти в среде 2 и 5 % все исследуемые консорциумы показали высокую активность. Степень деструкции нефти составила 67,5–88,9 %. При увеличении концентрации нефти до 7 % два консорциума сохранили свою активность (78,4–83,7 %), и даже при высокой концентрации (15 %) они утилизировали свыше 50 % нефти. У двух других консорциумов наблюдалось снижение деструкционной способности.

При 40 ℃ высокую активность показал только один консорциум, который деградировал от 76,0 % до 33,3 % нефти в зависимости от ее концентрации.

При 50 ℃ высокую активность при всех концентрациях нефти показали два консорциума. Степень деградации нефти при их применении составила от 61,7–72,8 % до 44,5–45,0 % в зависимости от количества нефти в среде. У одного консорциума отмечалась высокая активность при 2 %-ном содержании нефти – 72,1 %, однако увеличение концентрации нефти привело к значительному снижению его деструкционной способности.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили отобрать консорциумы термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов, эффективно деградирующих нефть в концентрациях 2–15 % при высоких температурах. Они могут служить основой биопрепаратов, используемых для очистки почвы от нефтяных загрязнений в условиях аридного климата.

УДК 582.475.4:577.175.1:539.1.047

АНАЛИЗ ГОРМОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ЯПОНСКОЙ КРАСНОЙ СОСНЫ ПОСЛЕ АВАРИИ НА АЭС ФУКУСИМА

С.В. Битаришвили, С.А. Гераськин, А.А. Празян

Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», Обнинск, Россия

Исследование последствий аварии на АЭС Фукусима выявило у молодых сосен повышенную частоту нарушений апикального доминирования [1]. Главная ось ствола прекращала рост, боковые побеги интенсивно развивались. У некоторых поврежденных деревьев апикальное доминирование восстанавливалось: один из верхних побегов занимал лидирующее положение, подавляя рост других.

Апикальное доминирование у растений, а также адаптивные реакции при ответе на стресс контролирует гормональная система. В связи с этим было оценено содержание основных классов фитогормонов в популяциях красной японской сосны с территорий, загрязнённых радионуклидами в результате аварии на АЭС Фукусима.

Объектом исследования явилась красная японская сосна (*Pinus densiflóra* Siebold et Zucc.), которая характеризуется высокой радиочувствительностью и является одним из референтных видов, рекомендованных Международной комиссией по радиационной защите для оценки последствий облучения.

Характеристика участков, пробоотбор. В мае 2019 года было заложено 4 экспериментальных участка (3,4 – 6,4 мкЗв/ч) *Akibadai (At)*, *Tsushima Farm (T)*, *Tsushima School (S)*, *Okuma (O)* на территории, подвергшейся радиоактивному загрязнению в результате аварии на АЭС Фукусима и контрольный (F). Участки были сходны по условиям произрастания деревьев и почвенным характеристикам, но различались уровнем хронического облучения (табл. 1). Мощность амбиентной дозы в воздухе измеряли на высоте 1 метр с помощью дозиметра PDR-111 (Hitachi-Aloka Medical, Япония).

В популяциях выделяли нормальные (*N*), аномальные (*A*) – с нарушением апикального доминирования и восстановленные (*R*) деревья. На каждом участке отбирали хвою второго года с деревьев на высоте 1–2 метра от земли. Хвою замораживали в жидком азоте и лиофилизировали для транспортировки в лабораторию.

Анализ содержания фитогормонов. В образцах оценивали концентрации основных классов фитогормонов: индолилуксусной (ИУК) и индолилмасляной (ИМК) кислот, зеатина – представителя цитокининов, абсцизовой (АБК), и гиббереллловой (ГК) кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ранее отработанной на ячмене [2].

Статистический анализ данных. Экспериментальные данные анализировали методами непараметрической статистики с помощью программ MS Excel и STATISTICA. Статистическую значимость различий оценивали с помощью *U*-теста Манна-Уитни. В таблице 2 и на рисунках представлены минимальные значения, первые квартили (Q1), медианы (M), третьи квартили (Q3) и максимальные значения.

Таблица 1. Мощность амбиентной дозы в воздухе, доля деревьев с морфозами и поглощенные дозы на экспериментальных участках

Участок	Описание	Доля деревьев с морфозами	Мощность дозы, мкЗв/ч	Поглощенная доза, мкГр/ч
F	Университетский городок, склон холма	0.14±0,04	0.25 ± 0.05	0.27 ± 0.06
At	Заброшенное рисовое поле	0.52±0,11*	3.4 ± 0.1	3.5 ± 0.2
S	Бывшая спортивная площадка	0.45±0,06*	3.7 ± 0.4	4.0 ± 0.8
T	Заброшенный сельскохозяйственный участок	0.42±0,07*	3.5 ± 0.3	5.0 ± 0.4
O	Пологий склон вдоль дороги	0.42±0,06*	6.4 ± 0.4	6.5 ± 0.4
* – Различия статистически значимы по сравнению с контрольными значениями, $p < 0.05$, *U*-тест.				

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Выявлен рост (r = 0.9; p < 0.05) содержания основного ауксина растений ИУК с увеличением поглощенной дозы (табл. 2), который достигался за счет доли аномальных и репарированных деревьев. В нормальных же деревьях содержание ауксинов было снижено на загрязненных участках (рис. 1). Были выявлены корреляции между содержанием ауксинов у аномальных деревьев и мощностью дозы: ИУК – (r = 0.87, p = 0.05); ИМК – (r = 0.88, p < 0.05). У восстановленных деревьев была обнаружена тенденция к увеличению содержания ИУК с мощностью дозы (r = 0.75, p > 0.05).

Таблица 2. Содержание фитогормонов в хвое (обобщенная выборка: N+A+R) в зависимости от поглощенной дозы на экспериментальных участках, мкМ.

Фитогормон	Показатель	Участок				
		F 0.27 мкГр/ч	**At** 3.5 мкГр/ч	**S** 4.0 мкГр/ч	**T** 5.0 мкГр/ч	**O** 6.5 мкГр/ч
ИУК	**M** Q1; Q3	**9.87** 7.02; 13.12	**12.41** 9.11; 15.61	**12.43** 8.92; 18.75	**13.40*** 10.86; 17.25	**18.40*** 16.49; 25.68
ИМК	**M** Q1; Q3	**4.94** 1.14; 8.4	**4.12** 1.61; 7.34	**5.28** 2.64; 8.45	**2.41** 1.88; 3.16	**4.97** 2.35; 6.3
Зеатин	**M** Q1; Q3	**8.68** 6.36; 10.56	**7.58** 5.83; 8.07	**13.68*** 10.5; 14.45	**14.37*** 12.73; 15.36	**12.54*** 7.34; 13.34
АБК	**M** Q1; Q3	**9.96** 6.74; 12.70	**9.79** 7.86; 12.19	**16.01*** 12.58; 19.09	**18.5*** 17.12; 20.68	**10.79** 8.43; 13.17
ГК	**M** Q1; Q3	**19.23** 17.67; 20.58	**16.82** 13.82; 18.42	**13.56*** 8.62; 17.01	**13.45*** 8.4; 15.20	**14.2*** 9.11; 20.26

* – Различия статистически значимы по сравнению с контролем (участок F), p < 0.05, U-тест.
Концентрации зеатина – мкМ*10^3, ГК – мкМ*10^2.

Ауксины, поддерживающие апикальное доминирование за счет стимуляции растяжения клеток в апикальной меристеме и подавления роста боковых почек, синтезируются в верхушке побега [3]. Этим объясняется резкое снижение концентраций ауксинов у деревьев с нарушением апикального доминирования (A, R) на контрольном участке по сравнению с нормальными. Максимальные концентрации ИУК были зафиксированы у нормальных деревьев на контрольном участке, любые другие варианты эксперимента, – будь то повышенная мощность дозы или наличие аномалий развития, приводили к снижению ее уровня.

Содержание зеатина было увеличено на 3-х самых загрязненных участках T, S, O, а содержание ГК снижено на этих же участках, причем у всех типов деревьев (табл. 2). На радиационную природу выявленных изменений указывает тенденция к снижению содержания ГК в обобщенной выборке (N+A+R) (r = –0.86, p > 0.05) и у нормальных деревьев (r = –0.91, p < 0.05) с ростом поглощенной дозы на участках (рис. 2). Обнаружена отрицательная связь между содержанием зеатина и ГК (r = –0.88, p < 0.05).

Цитокинины и ГК являются антагонистами в контроле развития апикальной меристемы побега, хотя имеют общие факторы транскрипции генов метаболизма [4]: цитокинины стимулируют пролиферацию клеток ПАМ, а ГК ингибируют их пролиферацию и стимулируют дифференцировку. Повышение уровня цитокининов и снижение ГК (рис. 2) указывает на активацию развития ПАМ. Снижение содержания ГК ведет к укорочению и утолщению побегов и хвои. Подобное явление наблюдали в популяциях сосны обыкновенной в зоне аварии на ЧАЭС: длина хвои у деревьев с загрязненных участков была статистически значимо короче по сравнению с контролем [5].

Концентрации основного стрессового гормона АБК были увеличены на участках T и S по сравнению с контрольным (табл. 2). Выявлена тенденция связи между содержанием АБК и зеатина (r = 0.86, p > 0.05). У аномальных деревьев по сравнению с нормальными уровни АБК были увеличены на загрязненных участках At и S, у восстановленных – снижены (рис. 3). В неблагоприятных условиях основной «стрессовый гормон» АБК запускает важнейшие адаптивные реакции растений – замедление роста, снижение транспирации, синтез стрессовых белков и др., приводящие к формированию неспецифической устойчивости [6]. Повышение содержания АБК было выявлено при исследовании травянистых растений, произрастающих в зоне отчуждения ЧАЭС [7]. Вероятно, высокие уровни АБК – один из элементов ответной реакции растений на хроническое радиационное воздействие.

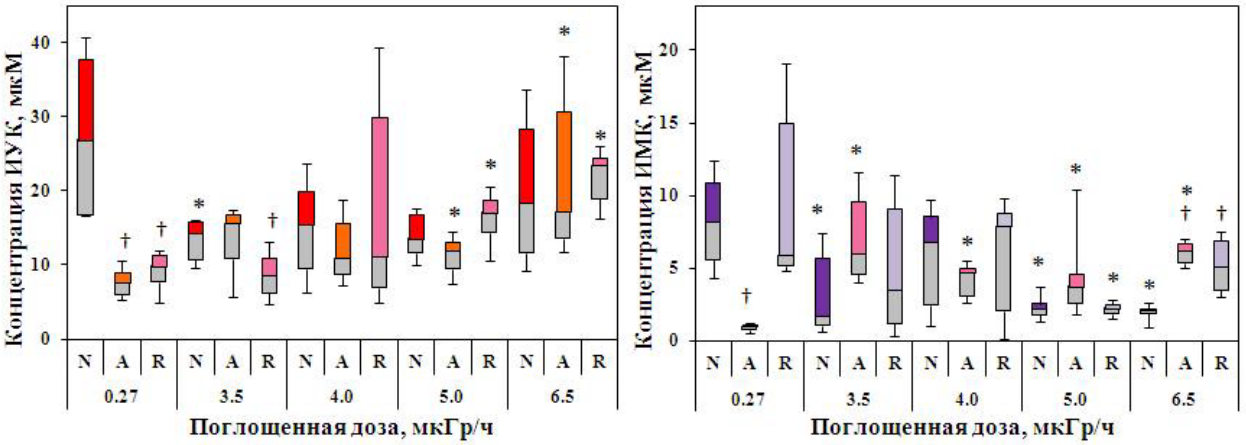


Рис. 1. Содержание ауксинов в хвое нормальных (*N*), аномальных (*A*) – с нарушением апикального доминирования и восстановленных (*R*) деревьевв зависимости от поглощенной дозы на экспериментальных участках

* – сравнение в зависимости от участка в пределах одного типа деревьев: различия статистически значимы по сравнению с контрольными показателями (участок *F*), $p < 0.05$, *U*-тест; † – сравнение разных типов деревьев в пределах одного участка: различия статистически значимы по сравнению с нормальными (*N*) деревьями, $p < 0.05$, *U*-тест. Верно для всех рисунков.

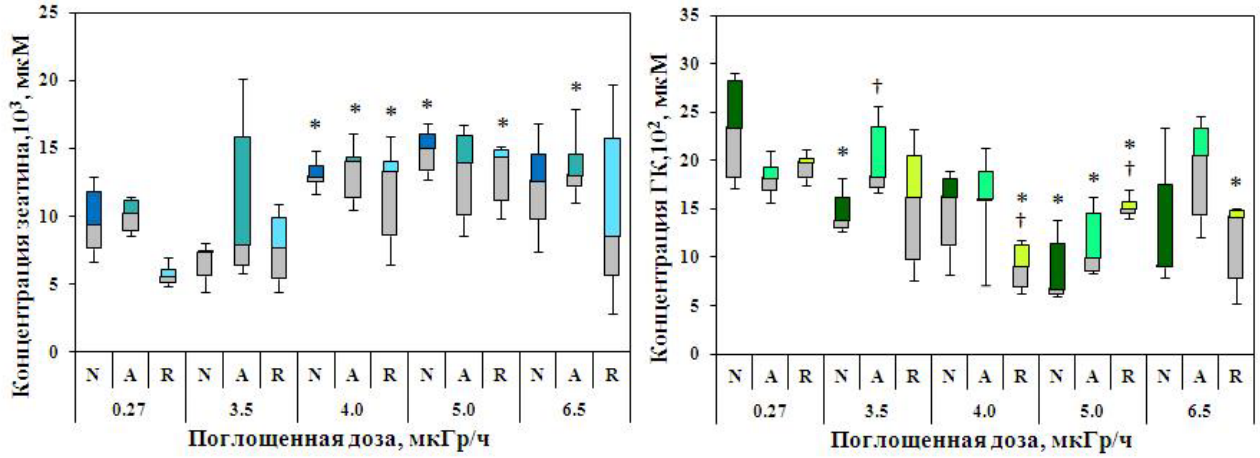


Рис. 2. Содержание зеатина и ГК в хвое нормальных (*N*), аномальных (*A*) – с нарушением апикального доминирования и восстановленных (*R*) деревьевв зависимости от поглощенной дозы на экспериментальных участках

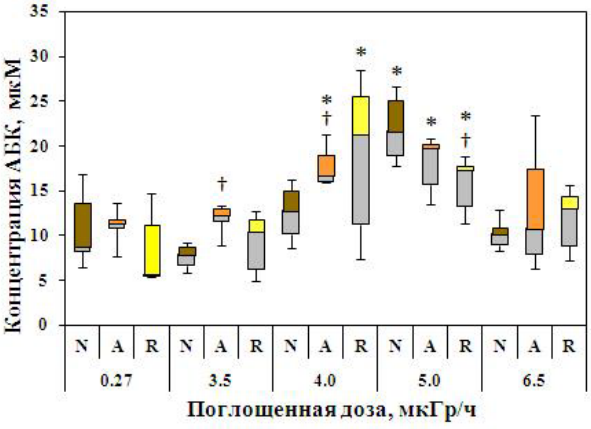


Рис. 3. Содержание АБК в хвое нормальных (*N*), аномальных (*A*) – с нарушением апикального доминирования и восстановленных (*R*) деревьевв зависимости от поглощенной дозы на экспериментальных участках

Фитогормоны играют ключевую роль в развитии растений и их ответе на стресс, в том числе в отмене апикального доминирования. В рамках данной работы было показано, что хроническое радиационное воздействие изменяет содержание основных классов фитогормонов в хвое красной японской сосны: повышает концентрации ИУК, зеатина и АБК и снижает концентрации ГК. Содержание гормонов в исследуемых популяциях изменялось в зависимости от наличия морфозов, что подтверждают выявленные корреляции.

Полученные в нашей работе результаты раскрывают механизмы адаптации красной японской сосны к хроническому радиационному воздействию и проясняют феномен повышенной частоты появления нарушений апикального доминирования в популяциях молодых хвойных деревьев из района аварии на АЭС Фукусима.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 119–54–50003 и гранта JSPS в рамках двусторонней программы совместных проектов РФФИ-JSPS.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yoschenko V., Nanba K., Yoshida S., et al. Morphological abnormalities in Japanese red pine (Pinus densiflora) at the territories contaminated as a result of the accident at Fukushima Dai-Ichi Nuclear Power Plant // J. Environmental Radioactivity 2016. V. 165. P. 60–67.
2. Битаришвили С.В., Волкова П.Ю., Гераськин С.А. Влияние γ-облучения семян на фитогормональный статус проростков ячменя // Физиология растений. 2018. Т. 65. № 2. С. 223–231.
3. Woodward A.W., Bartel B. Auxin: Regulation, action, and interaction // Annals Botany. 2005. V. 95. P. 707–735.
4. Jasinski S., Piazza P., Craft J., et al. KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities // Current Biology. 2005. V. 15. P. 1560–1565.
5. Козубов Г.М, Таскаев А.И. Особенности морфогенеза и ростовых процессов у хвойных растений в районе аварии на ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. Т. 47. № 2. С. 204–223.
6. Vishwakarma K., Upadhyay N., Kumar N., et al. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects // Frontiers Plant Science 2017. V. 8:161.
Битаришвили С.В., Пишенин И.А., Шестерикова Е.М., Волкова П.Ю. Содержание абсцизовой кислоты в популяциях травянистых растений, обитающих в условиях хронического радиационного воздействия // Современные проблемы радиобиологии, радиоэкологии и агроэкологии. Обнинск, 2019. С. 26.

УДК 633.88

ЭКОЛОГИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ОМЕЛЫ БЕЛОЙ (*VISCUM ALBUM* L.) НА ТЕРРИТОРИИ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Л.Н. Скрыпник, П.В. Масленников, П.В. Федураев, А.В. Пунгин, Н.С. Белов

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

Омела белая (*Viscum album* (L.)) относится к полупаразитическим растениям и представляет собой вечнозеленый куст шаровидной формы, который развивает устойчивые гаустории в дереве-хозяине. С древних времен и по сей день различные части омелы используется в народной медицине для лечения, например, атеросклероза, воспалительных заболеваний почек, хронического воспаления матки, при заболеваниях желудка и поджелудочной железы, туберкулезе легких, бронхиальной астме, геморрое, кровотечениях, при сахарном диабете и т. д. [1]. Обсуждается вопрос об использовании омелы при лечении рака у человека и животных [2]. Лекарственные свойства омелы связаны с наличием в ней разнообразных фитокомпонентов, проявляющих различную биологическую активность. Листья и молодые побеги растения содержат – олеаноловую и урсоловую кислоты и применяются для получения лекарственных средств, они также богаты смолистыми веществами, жирными маслами [3]. В растении обнаружены алкалоиды, сапонины, бета-вискол, висцерин, вискотоксин, холин и ацетилхолин, пропионилхолин и тирамин. В ягодах обнаружены жирное масло, каучук, смолистые вещества, каротин, аскорбиновая кислота [4]. Такой богатый и разнообразный химический состав омелы позволяет рассматривать ее как ценное сырье для выделения биологически активных соединений.

Несмотря на то, что в некоторых регионах России омела белая занесена в Красную книгу, и является редким и охраняемым видом, в Калининградской области она распространена достаточно широко. Вместе с тем исследования количественных характеристик и экологических особенностей распространения омелы белой на территории области стали проводиться недавно и касаются в основном только областного центра, не затрагивая другие города области [5, 6].

Таким образом, целью данного исследования явилось исследования экологии распространения и оценка биотехнологического потенциала омелы белой (*Viscum album* (L.)), произрастающей в различных городах Калининградской области.

Исследование распространения омелы белой проводилось на территории некоторых городов региона (г. Калининград, г. Черняховск, г. Балтийск, г. Советск, г. Правдинск и г. Нестеров). Общая площадь обследованных территорий составила более 40 км^2. Для расчета пространственных закономерностей распределения омелы белой на обследованных территориях и выявления взаимосвязей между ее распространением (количество пораженных деревьев, видовая принадлежность пораженных деревьев, количество кустов омелы, средний диаметр кустов омелы) и экологическими факторами (средний возраст пораженных деревьев, плотность дорожно-уличной сети, плотность строений, средняя температуру воздуха, относительная влажность воздуха, содержание Pb, Zn, Cu в почве, концентрация NO_2 в атмосферном воздухе) использовался QGIS 3.6 с модулем Spreadsheet Layers и корреляционный анализ с расчетом коэффициентов Спирмена. Программный комплекс SasPlanet (v. 190707) использовался для получения растровой подложки исследуемых территорий. С целью повышения точности оценки распространения омелы белой был выбран метод зональной статистики с элементами фокальной статистики.

В результате проведенных исследований было установлено, что на обследованных территориях омелой белой были поражены деревья и кустарники, принадлежащие к 49 таксонам, относящиеся к 17 родам и 9 семействам. В результате исследований инфицированных хвойных деревьев идентифицировано не было, что свидетельствует о распространении в городах области только подвида *Viscum album* L. subsp. *album*, который инфицирует лиственные деревья. На рисунке 1 представлено представлены виды деревьев, наиболее подверженных заражению омелой белой на обследованных территориях. В настоящем исследовании среди зафиксированных инфицированных видов деревьев преобладали деревья липы, клена и тополя. Данные виды являются преобладающим в городских древесных посадках, особенно вдоль дорог. Сильная восприимчивость деревьев липы к заражению омелой также была установлена ранее для некоторых городов Европы, однако в ряде работ по изучению распространения омелы белой в городах Польши данный вид не был зафиксирован в числе наиболее инфицированных [7, 8]. Кроме того, в этих же исследованиях омела белая редко встречалась на *Acer platanoides*, который в Калининградском регионе был сильно поражен омелой.

Считается, что омела белая предпочитает деревья с мягкой древесиной [9], однако значительная частота встречаемости ее на клене, относящимся к твердопородным видам деревьев, свидетельствует о том, что выделить какой-то один фактор, обуславливающий выбор омелой дерева-хозяина, не представляется возможным.

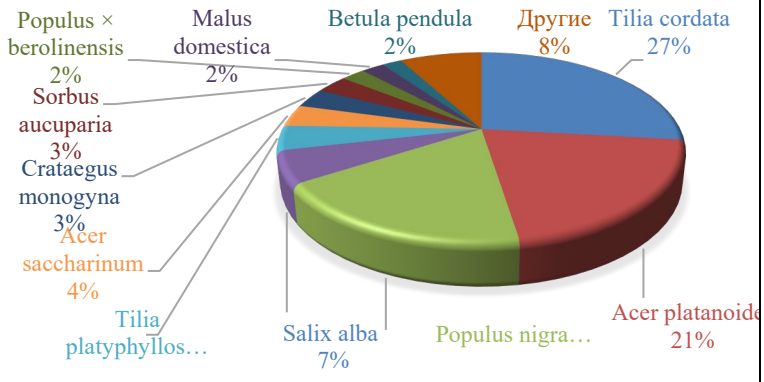


Рисунок 1 – Виды деревьев, наиболее подверженных заражению омелой белой на обследованных территориях в Калининградской области

Исследуемые участки значительно отличались по наличию на их территории зараженных омелой деревьев. Наибольшее количество зараженных деревьев было выявлено в зеленой зоне (городских парка), зоне исторической застройки и зеленой зоне вдоль водных объектов г. Калининграда, а также в г. Правдинск.

Наименьшей степенью зараженности характеризовалось зона современной многоэтажной застройки г. Калининграда и г. Нестеров.

Кроме того, стоит отметить, что в г. Советск было идентифицировано всего одно дерево, зараженное омелой. Центр города, зона среднеэтажной застройки и зона частных жилых домов г. Калининграда, а также г. Черняховск и г. Балтийск характеризовались средней степенью заражения. Диаметр кустов омелы в исследуемых зонах варьировал в широких пределах от 20 до 180 см, но в среднем составлял от 45 до 75 см. В целом полученные результаты исследования по распространение омелы в различных функциональных зонах Калининграда аналогично результатам, полученным в работе по исследованию распространения омелы в Варшаве [7]. При этом также, как и для Варшавы, для Калининграда не было характерно присутствие омелы в городских лесах, в которых зараженные омелой деревья были обнаружены только на внешних границах. Как отмечают ряд авторов, для распространения омелы важным условием является достаточное количество солнечного света [10]. По этой же причине некоторые авторы считают, что прореживание деревьев будет способствовать распространению омелы [11]. Центр городов, характеризующийся более высокой плотностью улично-дорожной сети и строений, отличался относительно низким уровнем распространения омелы. Данный результат связан не только с тем, что в центре сосредоточено меньшее количество деревьев и зеленых зон, но и с тем, что там чаще проводится санитарная обрезка деревьев и спил старых и поврежденных деревьев.

Корреляционный анализ с использованием коэффициентов корреляции Спирмена подтвердил наличие прямой связи между параметрами распространения омелы (количество пораженных деревьев, количество кустов омелы и средний диаметр кустов омелы), возрастом деревьев (r = 0,65–0,84, $p \leq 0,05$) и относительной влажностью воздуха (r=0,59–0,66, $p \leq 0,05$). Несмотря на то, что омела может поражать и молодые деревья, все-таки в большинстве исследований отмечается прямая корреляционная зависимость между возрастным составом зеленых насаждений и степенью поражения их омелой [7, 9]. Наличие прямой корреляционной зависимости между степенью инфицированности омелой и влажностью воздуха, а также преобладание пораженных омелой деревьев в зеленых зонах вдоль водных объектов может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, чаще всего поддаются заражению породы деревьев, имеющие повышенный водный баланс и гигрофиты. Обеспеченность влагой является необходимым условием, как для прорастания семян омелы, так и для ее успешного развития. Во-вторых, природные и искусственные водоемы и ручьи в городах представляют собой богатую кормовую базу для различных видов птиц, которые являются основными переносчиками семян омелы и способствуют ее распространению.

Между факторами, отражающими загрязнение окружающей среды (содержание тяжелых металлов в почве и концентрация диоксида азота в воздухе) и параметрами распространения омелы зависимости выявлено не было. Полученный результат может быть обусловлен разнородностью других параметров в исследуемых зонах (плотность улично-дорожной сети, плотность застройки, влажность, наличие птиц, доступность деревьев-хозяев и др.), поэтому для более точной интерпретации полученных данных требуется проведение дополнительных исследований.

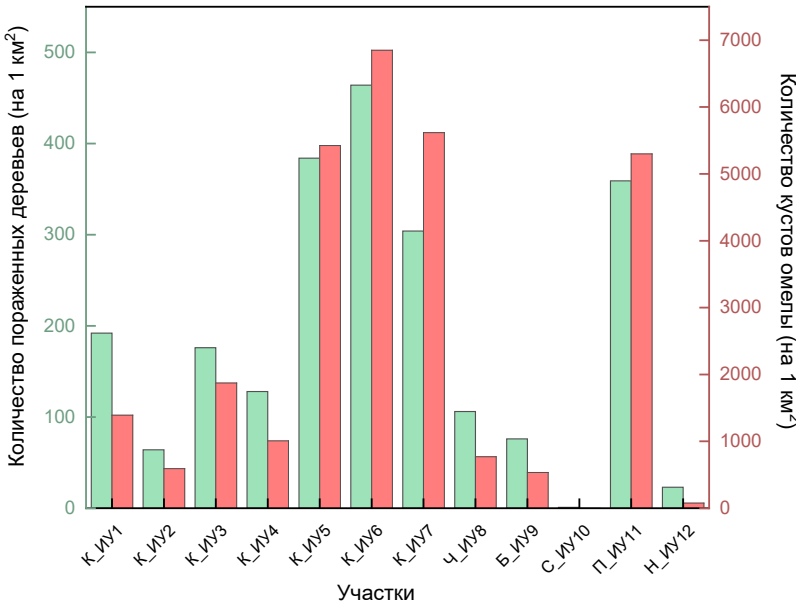


Рисунок 2 – Количественные характеристики распространения омелы белой в различных городах Калининградской области (К_ИУ1 – Калининград, центр города, К_ИУ2 – Калининград, зона жилой многоэтажной застройки, К_ИУ3 – Калининград, зона жилой среднеэтажной застройки, К_ИУ4 – Калининград, зона жилой малоэтажной застройки, К_ИУ5 – Калининград, зона жилой малоэтажной исторической застройки, К_ИУ6 – Калининград, городские парки (зеленая зона), К_ИУ7 – Калининград, зона вокруг водных объектов, Ч_ИУ8 – Черняховск, центральная часть города, Б_ИУ9 – Балтийск, центральная часть города, С_ИУ10 – Советск, центральная часть города, П_ИУ11 – Правдинск, центральная часть города, Н_ИУ12 – Нестеров, центральная часть города)

Таким образом, проведенные исследования показали достаточный ресурсный потенциал Калининградской области для использования омелы белой в биотехнологических целях. На сегодняшний день особое внимание исследователей привлекает экстракция из омелы лектинов и вискотоксинов, которые проявляют апоптические и цитоксические свойства и тем самым обладают выраженным антиканцерогенным эффектом [4, 12]. При этом лектины омелы могут использоваться не только в медицинских целях, но и в качестве чувствительных биосенсоров, детектирующих определенные углеводные последовательности в олигосахаридах, которые являются специфическими лигандами в углевод-белковом взаимодействии, сорбентов в аффинной хроматографии и для очистки вирионов, мембран, органоидов и клеток [13], а также для создания средств защиты от патогенов в растениеводстве [14].

К ценным биологически активным компонентам относятся также фенольные кислоты, фенилпропаноиды и флавоноиды, обнаруженные в омеле и обладающие, прежде всего, антиоксидантной и противовоспалительной активностью. Особенностью накопления данной группы соединений является зависимость их качественного состава от дерева-хозяина, на котором произрастает омела. Например, в омеле с *Sorbus aucuparia* выявлено высокое содержание салициловой кислоты, а с *Malus domestica* – розмариновой [4]. Высокое содержание фенольных соединений в омеле белой позволяет рассматривать ее в качестве сырья для производства препаратов с антигипертазивным действием.

Помимо гидрофильных компонентов, омела белая содержит также липофильные биологически активные соединения, которые в основном представлены тритерпеновыми кислотами, такими как олеаноловая, бетулиновая и урсоловая кислоты. Указанные тритерпеновые кислоты обладают антиканцерогенным эффектом, а также противовоспалительным и апоптотическим действием, а также ингибируют рост клеток. Благодаря своей структуре тритерпены также способны встраиваться в клеточные мембраны, нарушать их структуру, тем самым способствовать миграции лектинов в цитоплазму, поэтому целесообразным в качестве противораковых препаратов использовать экстракты омелы белой, содержащей совместно лектины и тритерпеновые кислоты [15].

На сегодняшний день единственным методом борьбы с омелой остается механическое удаление кустов омелы с дерева-хозяина. Активное использование сырья омелы с целью извлечения биологически активных веществ позволит более эффективно, в том числе с экономической точки зрения, регулировать распространение этого полупаразита в регионе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Калининградской области в рамках научного проекта № 19–44–390004 р_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vardanyan R.L., Vardanyan L.R., Atabekyan L.V. Antioxidant effect of extracts of white mistletoe (*Viscum album* L.) grown in different trees. Chemical Journal of Armenia. 2011. 64: 335–343.
2. Bar-Sela G. White-Berry Mistletoe (*Viscum album* L.) as complementary treatment in cancer: does it help? European Journal of Integrative Medicine, 2011. 3: 55–62.
3. Shah S.S., Rehman Y.U., Iqbal A., Rahman Z.U., Zhou B., Peng M., Li Z. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of Stem, Leaves and Fruit Extracts of *Viscum album* L. Journal of Pure and Applied Microbiology. 2017. 11: 1337–1349.
4. Nazaruk J., Orlikowski P. Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album* L. Natural product research. 2016. 30: 373–385.
5. Chupakhina N.Y., Maslennikov P.V., Skrypnik L.N., Feduraev P.V., Chupakhina G.N. Mistletoe Infestation as a Transboundary Problem. In *Baltic Region – The Region of Cooperation*. Springer, Cham. 2020. 145–152.
6. Skrypnik L., Maslennikov P., Feduraev P., Pungin A., Belov N. (2020). Ecological and Landscape Factors Affecting the Spread of European Mistletoe (*Viscum album* L.) in Urban Areas (A Case Study of the Kaliningrad City, Russia). Plants. 2020. 9: 394.
7. Zachwatowicz M., Petrović K., Sudnik-Wójcikowska B. The occurrence of European mistletoe under the conditions of high human impact in the central part of Warsaw, Poland. In Problemy Ekologii Krajobrazu XXII. Warsaw University, Warsaw, Poland. 2008. 101–114.
8. Kołodziejek J., Patykowski J., Kołodziejek R. Distribution, frequency and host patterns of European mistletoe (*Viscum album* subsp. *album*) in the major city of Lodz, Poland. Biologia. 2013. 68: 55–64.
9. Varga I., Poczai P., Tiborcz V., Aranyi N.R., Baltazár T., Bartha D., Pejchal M., Hyvönen J. Changes in the distribution of European mistletoe (*Viscum album*) in Hungary during the last hundred years. Folia Geobot. 2014. 49: 559–577.
10. Sayad E., Boshkar E., Gholami S. Different role of host and habitat features in determining spatial distribution of mistletoe infection. For. Ecol. Manage. 2017. 384: 323–330.
11. Rybalka I.O. The applied aspects of environmental management of the white mistletoe (*Viscum album* L.) population in urban areas (in case of the city Kharkiv). Biol. Stud. 2016. 10: 141–154.
12. Attar R., Tabassum S., Fayyaz S. et al. Natural products are the future of anticancer therapy: Preclinical and clinical advancements of *Viscum album* phytometabolites. Cellular and Molecular Biology. 2015. 61: 62–68.
13 Кобелев А.В., Сироткин А.С. Лектины: обзор свойств и перспектив использования в биотехнологии. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2018. 14: 60–67.
14. Павловская Н.Е., Гагарина И.Н. функциональная роль лектинов растений как предпосылка для их применения в биотехнологии. Химия растительного сырья. 2017. 1: 21–35.
15. Mulsow K., Enzlein T., Delebinski C., Jaeger S., Seifert G., Melzig M.F. Impact of mistletoe triterpene acids on the uptake of mistletoe lectin by cultured tumor cells. PLoS One. 2016. 11: e0153825.

УДК 579.6

ДЕСТРУКЦИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ АКТИВНЫМИ КОНСОРЦИУМАМИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Э.Р. Файзулина, С.А. Айткельдиева, Л.Г. Татаркина

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

В настоящее время, с ростом развития промышленности, особенно остро встают вопросы защиты окружающей среды от загрязнения токсичными соединениями. Одним из наиболее распространенных загрязнителей является нефть, а также входящие в ее состав моно- и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Основными источниками эмиссии ароматических углеводородов в окружающую природную среду являются предприятия энергетического комплекса, автомобильный транспорт, химическая и нефтеперерабатывающая промышленности. ПАУ плохо растворимы, легко адсорбируются частицами почвы и их трудно разлагать. Таким образом, они имеют тенденцию накапливаться в почвах. Моноароматические углеводороды также являются опасными загрязнителями и нелегко разлагаются. Из-за их относительно высокой растворимости они подвижны с потоком грунтовых вод и образуют шлейфы загрязнения в водоносных горизонтах. Они встречаются практически повсюду, но около 90 % экологической нагрузки приходится на почвы. Ароматические углеводороды нефти создают серьезную угрозу для здоровья населения, поскольку обладают токсическими, мутагенными и канцерогенными свойствами. Эти соединения классифицированы Агентством США по охране окружающей среды как приоритетные загрязнители окружающей среды.

Для очистки почвы, загрязненной углеводородами нефти, в настоящее время используются различные физические, химические и биологические методы. Биоремедиация является экономически и экологически безопасной альтернативой. Она определяется как процесс биологического разложения токсичных органических отходов до неопасных или менее опасных продуктов, а в идеале до углекислого газа. В этом отношении микробная деградация привлекает большое внимание.

На основе активных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненных почв Западного Казахстана, были созданы консорциумы, эффективно деградирующие моно- и полициклические ароматические углеводороды. В их состав входили представители родов *Bacillus, Pseudomonas* и *Rhodococcus*.

Поставлен лабораторный модельный эксперимент по возможности их использования в очистке почвы, загрязненной нефтью в количестве 3 %. Установлено, что через 2 месяца под воздействием консорциумов содержание нефти в почве снизилось на 62,0–64,9 %, тогда как естественная убыль нефти составила 28,5 %.

Определена степень деструкции изомеров ксилола, нафталина, флуорена и антрацена, входящих в состав нефти, под воздействием исследуемых консорциумов. Показано, что уже на 14 сутки после обработки почвы произошла значительная деструкция о-ксилола – 81,7–85,2 %. К 28 суткам этот субстрат был полностью утилизирован. В контрольном варианте его остаточное содержание составило 26,2 %. Скорость деструкции м- и п-ксилола была несколько ниже. Так, их полная утилизация отмечалась только через два месяца.

Исследуемые консорциумы показали высокую активность и по отношению к ПАУ нефти. Так, уже на 14 сутки было деградировано более 50 % нафталина, а через два месяца он не был обнаружен. Несколько медленнее происходила деструкция флуорена и антрацена. Однако к концу эксперимента эти углеводороды также были полностью утилизированы. Остаточное содержание нафталина, флуорена и антрацена в нефти в контрольном варианте составило 35,4 %, 47,2 % и 56,3 % соответственно.

Таким образом, исследуемые консорциумы показали высокую активность по отношению к моно- и полициклическим ароматическим углеводородам нефти и могут быть использованы в очистке загрязненных почв.

УДК 543.544.613.2:615.916

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК, ИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ И МАГНИТНЫЕ ПОЛЯ

Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев

Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Эндогенные и экзогенные источники вызывают различные виды окислительного повреждения биополимеров в живых организмах. Известными проявлениями стресс-реакции в клетках являются повреждения биологически значимых молекул и, прежде всего, ДНК. Нарушение или недостаточность процессов репарации и возникающие при этом мутации могут иметь катастрофические последствия для организма [1]. В ряде статей [2–3] было показано, что при воздействии на взвесь лимфоцитов периферической крови человека электромагнитными излучениями происходит образование активных форм кислорода (АФК). Образование АФК может приводить к повреждению первичной структуры ДНК [1], накоплению окисленных азотистых оснований 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG), а в дальнейшем к появлению однонитевых разрывов (ОР) ДНК. Однонитевые разрывы репарируются по негомологичным концам ДНК на всех этапах клеточного цикла, представляющий основной механизм репарации в G1(гуанин) или гомологичных рекомбинациях в различных фазах клеточного цикла. Они сопровождают действие многих агентов и являются вторичными, промежуточными дефектами при репарации.

Вопросы, связанные с возможностью инициации окислительного стресса как низкоинтенсивными факторами, такими, как низкочастотное магнитное поле (МП), так и ионизирующими излучениями, используемыми в клинической медицине, и их вкладом в поддержание уже развившегося окислительного стресса, остаются малоизученными.

Цель работы – оценка степени окислительных повреждений ДНК лимфоцитов периферической крови здоровых доноров после воздействия различных видов ионизирующего излучения и переменным МП в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vitro* с помощью определения уровня содержания 8-OHdG в ДНК с использованием иммуноферментного анализа и определения количества ОР ДНК с помощью флуоресцентного метода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований были лимфоциты, выделенные из периферической крови здоровых доноров (20 человек), мужчины, некурящие, возраст от 21 до 23 лет. Выделение чистой взвеси лимфоцитов из донорской крови проводили в градиенте плотности фиколла-урографина (плотность 1,077 г./мл).

Для изучения влияния СВЧ-излучения на содержание ОР ДНК были использованы СВЧ генераторы: ГКЧ-53, Р2–68, Р2–69 мощностью 3 мВт. Образцы подвергали воздействию излучения в течение 10 минут при разных частотах. При изучении влияния гамма-излучения на содержание ОР ДНК в лимфоцитах был использован радиоактивный препарат ^{137}Cs с активностью 0,104 МБк.

Также образцы взвеси лимфоцитов в серии экспериментов обрабатывали импульсным газоразрядным лазером на парах меди с длинами волн генерации 510,6 и 578,2 нм.

Обработку образцов переменным МП проводили в химически чистой и стерилизованной пластиковой чашке с толщиной облученного слоя 2 мм. В наших экспериментах мы использовали устройство для компьютерного исследования биологических жидкостей в переменном МП, описанное в работе [4]. Эффективное значение напряженности МП в месте нахождения образца составляло (550 ± 30 А/м). Измерение напряженности МП производилось прибором «Экофизика-110А» с цифровым измерительным преобразователем для измерения переменных электрических и магнитных полей П3–80-ЕН500.

Температура раствора контролировалась температурным датчиком с точностью до 0,2 °С и составляла 23 °С, напряженностью 550 ± 30 А/м, продолжительность обработки образца достигала 30мин.

Количество ОР ДНК определяли после щелочной обработки лизатов и добавления бромистого этидия по интенсивности флюоресценции полученных образцов в кварцевой кювете на флюоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2700 при длине волны возбуждения – 540 нм и $\lambda_{погл}$ 610 ± 5 нм как это описано в [3].

С помощью иммуноферментного анализа определено содержание повреждений азотистых оснований 8-OHdG в ДНК лимфоцитов периферической крови человека после воздействия на них переменного МП с использованием моноклональных антител к 8-OHdG. Использовался готовый набор DNA Damage ELISA Kit, определение осуществлялось согласно протоколу. После внесения стоп-растворов измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере Thermo Fisher Scientific Multiskan (Финляндия).

Определение общего уровня перекисей липидов в образцах плазмы крови проводили с помощью спектрофотометрического метода, используя готовый набор PerOx Immundiagnostic AG (Germany).

Лабораторное диагностическое обследование выполнено в соответствии с обязательным соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 г. с дополнениями 1983г.

Результаты обрабатывали статистически (ПО StatPlus). Достоверность различий между выборками оценивали, используя непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После соответствующей обработки были сняты спектры флуоресценции лизатов лимфоцитов с бромистым этидием, спектральный диапазон регистрации составлял 500–740 нм. Как показали исследования, в лимфоцитах при воздействии гамма-излучения ^{137}Cs наблюдалось увеличение количества ОР ДНК при увеличении времени облучения. При воздействии излучения в течение 30 минут увеличение составляло 44,3 ± 0,4 %, в течение 60 минут на 56,5 ± 0,9 %, в течение 90 минут на 68,3 ± 0,8 % больше, чем в контрольном образце лимфоцитов без облучения.

Рассмотрено влияние СВЧ-излучения на появление ОР ДНК при облучении лимфоцитов на частотах 3,5 ГГц, 50 ГГц, 70 ГГц. В этом диапазоне работают терапевтические устройства для лечения больных облучением миллиметрового диапазона, в частности, для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, онкологических (совместно с традиционными методами) и многих других заболеваний. Примером такого прибора может служить терапевтическая установка „ЯВЬ-1" с рабочей длиной волны 5,60 мм (частота – 53534 ± 10 МГц) и плотностью мощности облучения раскрытии рупора – не менее 10 мВт/кв. см. Лимфоциты облучались СВЧ-излучением в течение 10 минут на частотах 3,5 ГГц, 50 ГГц, 70 ГГц при мощности 3 мВт. Выяснено, что с увеличением частоты количество ОР ДНК в лимфоцитах также увеличивается: при воздействии на них СВЧ-излучением с частотой 3,5 ГГц на 32,3 ± 0,9 %, с частотой 50 ГГц на 40,1 ± 1,1 %, с частотой 70 ГГц на 49,8 ± 0,7 % по сравнению с контрольными образцами. Как видно, повреждающий эффект СВЧ-излучения возрастает с увеличением частоты, поэтому использование в КВЧ-терапии, более низких частот, будет увеличивать сохранность иммунокомпетентных клеток крови.

Известно применение в медицине лазера на парах меди (ЛПМ) с длинами волн генерации 510,6 и 578,2 нм. Взвесь лимфоцитов облучалась при данных длинах волн (578,2 и 510,6 нм) в течение 3 и 5 минут при средней мощности около 10 Вт. Наблюдалось увеличение количества ОР ДНК после облучения лазером при длине волны 510,6 нм на 18,1 ± 0,7 % (время облучения 3 мин) и на 6,1 ± 0,5 % (время облучения 5 мин) при длине волны 578,2 нм на 18,1 ± 0,7 % (время облучения 3 мин) и на 22,3 ± 0,9 % (время облучения 5 мин). Было обнаружено, что при длине волны генерации 578,2 нм в лимфоцитах образуется меньше ОР ДНК, чем при длине волны генерации 510,6 нм. При увеличении времени воздействия с 3 до 5 мин количество ОР ДНК лимфоцитов увеличивается в среднем в 2 – 2,5 раза.

Одним из ключевых биомаркеров окислительных повреждений нуклеиновых кислот, опосредованных с генерацией АФК, является образование 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG) в ДНК [5]. Уровни содержания 8-OHdG и его аналогов 8-гидроксигуанозина и 8-гидроксигуанина связаны со многими дегенеративными заболеваниями. Так, взаимосвязь АФК и использование 8-OHdG в качестве маркера оксидативного стресса были исследованы при многих заболеваниях, включая рак простаты, муковисцидоз, атопический дерматит и ревматоидный артрит, а участок ДНК, содержащий в своём составе оксогуанин, является наиболее стабильным продуктом окисления ДНК [6].

С увеличением частоты МП содержание 8-OHdG в ДНК лимфоцитов изменяется сложным образом. Так, обработка МП с частотой 50 Гц не приводила к увеличению количества 8-OHdG в ДНК. Напротив, при воздействии МП с частотой 3 Гц наблюдалось увеличение количества 8-OHdG в ДНК в 1,5 раза. Изменение количества 8-OHdG в ДНК не может быть вызвано депуринизацией модифицированного основания, так как данная модификация приводит не к ослаблению, а к повышению устойчивости гликозидной связи.

Известно, что гуанин в ДНК имеет самый низкий окислительно-восстановительный потенциал среди природных оснований [7] и в большей степени подвержен окислению. Как донор электронов, он способен отдавать свой электрон различным акцепторам, образуя гуанин-радикал-катион, который затем мигрирует вдоль цепи ДНК по гуанинам прыжковым способом, пока не происходит его окисление с образованием 8-oxoG [8–10]. Возможно, что под действием МП с частотами 3, 30 и 50 Гц происходит и дальнейшее окисление 8-oxoG до таких продуктов, как оксазолон, гуанидиногидантоин и спироиминодигидантоин. Таким образом, при воздействии МП с частотами от 3 до 30 Гц скорость доокисления 8-оксогуанина сопоставима со скоростью окисления нативных гуанинов ДНК. В ходе выполнения экспериментов выяснилось, что скорость образования продуктов окисления азотистых оснований под действием МП зависит от концентрации растворенного кислорода в растворе.

Наличие кислородного эффекта при низкоинтенсивных воздействиях на молекулу ДНК впервые продемонстрировано в работе [11]. В частности, было показано, что образование продуктов депуринизазии, урацила и 8-оксогуанина происходит в ДНК за счет АФК, образующихся в растворе под действием тепла. Это согласуется с мнением, изложенным в работах [2, 3], в которых указывается, что одной из причин изменения хемилюминесценции водных растворов ДНК при действии на них ЭМП НЧ может быть образование активных форм кислорода в водном растворе. Об образовании двух- и однонитевых разрывов в растворе ДНК под действием как пероксирадикалов, так и низкочастотного ЭМП отмечается и авторами статьи [8].

Увеличение уровня окисленных модификаций азотистых оснований 8-oxoG в ДНК сыворотки крови здоровых доноров после обработки МП, по-видимому, связано с генерацией АФК при воздействии НЧ МП [3, 8 – 11]. Установлено, что первичной мишенью при воздействии таких низкоинтенсивных физических факторов, как тепло, видимый свет, лазерное излучение (632,8 нм) является растворенный в водной фазе кислород [9]. Как отмечают авторы, начальным этапом для этого процесса является переход кислорода из триплетного в синглетное состояние. По оценке Красновского [12] время жизни синглетного кислорода в биологических системах невелико – от 0,2 для цитоплазмы до 1 μs для плазмы крови и 0,05 μs для мембраны эритроцитов, коэффициент диффузии находится в пределах от 4×10^{-6} до 7×10^{-7} $см^2с^{-1}$. Даже этого короткого времени достаточно для запуска дальнейших процессов: восстановления синглетного кислорода до супероксид-анион радикала, протонированная форма которого дисмутирует с образованием наиболее долгоживущей АФК – перекиси водорода. Процессы образования АФК в водной среде происходят по типу химического осциллятора и постепенно затухают, если не поддерживаются внешней энергией низкоинтенсивных факторов, к которым можно отнести НЧ МП. Процессы такого характера крайне чувствительны к слабым резонансным воздействиям [2].

Несмотря на то, что энергия НЧ МП чересчур мала для какого-нибудь значительного повреждения ДНК, однако, ее может быть достаточно для перехода растворенного кислорода из триплетного в синглетное состояние и дальнейшей генерации каскада АФК. В хромосомах ДНК-связывающие белки защищают ее от окислительных повреждений, что связано как с компактной упаковкой молекулы ДНК, так и с взаимодействием белковых молекул с образующимися АФК. Однако, установлено [9], что долгоживущие белковые радикалы являются источниками продолжительного образования АФК, посредниками окислительного стресса в биологических системах и способны к переносу радикальных повреждений на ДНК. Так, гидропероксиды гистона H1 индуцируют образование 8-оксогуанина в ДНК [6]. Таким образом, все образующиеся при воздействии на растворы ДНК и образцы крови переменным МП АФК и белковые радикалы могут атаковать молекулу ДНК, тем самым приводя к окислительным повреждениям азотистых оснований и накоплению 8-oxoG в ДНК.

Таким образом, появление и накопление окислительных повреждений 8-OHdG в ДНК после обработки крови здоровых доноров переменным МП и накопление ОР ДНК может свидетельствовать с одной стороны о генерации АФК при воздействии различных видов ионизирующего излучения и переменным МП, а с другой – об участии АФК в повреждении ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генерация активных форм кислорода при воздействии различных видов ионизирующего излучения и переменным МП на образцы крови *in vitro* приводит к накоплению окислительных повреждений азотистых оснований 8-oxoG в ДНК. Дальнейшее развитие окислительного стресса способствует нарушению процессов репарации ДНК и приводит к появлению и накоплению ОР ДНК. В основе подобных типов повреждений ДНК, приводящих к образованию ОР и продуктов окисления азотистых оснований, по-видимому, лежит универсальный механизм, связанный с генерацией АФК в водном растворе под действием МП и ионизирующих излучений. Данный процесс оказывает существенное влияние на функциональные метаболические свойства биосистем в целом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № МФИ-20.1/119

ЛИТЕРАТУРА

1. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease // Cancer Letters 327 (2012) 26–47
2. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Ильченко Г.П. Влияние низкочастотного электромагнитного поля на хемилюминесценцию водных растворов ДНК // Биофизика, 2015, Т. 60, вып. 6, С. 1099–1103. DOI 10.1134/S000635091506024X
3. Tekutskaya E.E. Conformational changes in natural biopolymers induced by electromagnetic field and cadmium ion exposure // Russian Open Medical Journal, 2019, V.8, Uss.2, DOI: 10.15275/rusomj.2019.0202. URL:http://www.romj.org/2019–02
4. Ильченко Г.П., Барышев М.Г., Текуцкая Е.Е., Шелистов В.С., Никитин А.В. Устройство для поиска оптимальных параметров обработки биологических объектов переменным магнитным полем // Измерительная техника, 2017, №.6. С. 69–72 DOI: 10.1007/s11018–017–1247–7
5. Huizhen W., Xin Z. Magnetic fields and reactive oxygen species // International Journal of Molecular Sciences, V. 18, 2017 URL: doi:10.3390/ijms18102175 [October 18, 2017]
6. Рогачева М.В., Кузнецова С.А. Репарация 8 оксогуанина в ДНК. Механизмы ферментативного катализа // Успехи химии, 2008.Т. 77, № 9. С. 817–843.
7. Страйер Л. Биохимия Т.3, Москва: Мир. 1985
8. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Окислительные повреждения ДНК при действии переменного магнитного поля // Биофизика, 2020, Т. 65, № 4, С. 664–669 DOI: 10.31857/S0006302920040055
9. Chernikov A.V., Gudkov S.V., Shtarkman I.N., Bruskov V.I. Oxygen effect in heat-induced DNA damage // Biophysics. 2007. Т. 52, № 2, С. 185–190
10. Текуцкая Е.Е., Лупаш Н.Г., Майорова А.В. Медико-социальные аспекты экологической гастроэнтерологии // Журнал «Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология» 2013. № 1. С. 015–019
11. Гудков С.В., Карп О.Э., Гармаш С.А. и др. Образование активных форм кислорода в воде под воздействием видимого и инфракрасного излучения в полосах поглощения молекулярого кислорода // Биофизика. 2012. Т. 57. № 1. С. 5–13.
12. Krasnovsky A.A. Membrane and cell biology, 1998, T.15, C. 530

УДК 602:628.1:579.66

ОБ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОЦЕССОВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕФОСФАТАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД

А.Р. Хабибуллина, А.А. Хасанова, Р.Ш. Бикулов, Т.В. Вдовина, А.С. Сироткин

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Загрязнение водоприемников биогенными элементами в настоящее время представляет чрезвычайно острую экологическую проблему. Поступление соединений азота и фосфора в природные экосистемы приводит к эвтрофикации водоемов, загрязнению подземных водоносных горизонтов. В системах оборотного водопотребления они являются причиной обрастания поверхности трубопроводов и аппаратов водорослями [1].

Настоящая работа посвящена интенсификации процессов биологической дефосфатации сточных вод на основе использования фосфатаккумулирующих организмов (ФАО), выделенных из микробиоценоза активного ила очистных сооружений. Цель работы состояла в оценке фосфатаккумулирующей способности изолята ФАО и активного ила.

Экспериментальные исследования включали несколько этапов:

– расчет параметров процесса фосфатаккумуляции и составление баланса по фосфору (теоретическая оценка процесса);

– выделение изолята ФАО из сообщества активного ила;

– моделирование процесса фосфатаккумуляции в процессе периодического культивирования ФАО (экспериментальная оценка процесса);

– сравнительный анализ результатов теоретической и экспериментальной оценки фосфатаккумулирующей способности ФАО;

– моделирование процесса фосфатаккумуляции в процессе периодического культивирования сообщества активного ила;

– моделирование процесса фосфатаккумуляции в процессе периодического культивирования сообщества активного ила с интродукцией изолята А.

Объектом исследования выступал изолят ФАО (изолят А), выделенный из сообщества активного ила очистных сооружений г. Чистополь, по фенотипическим признакам отнесенный к бактериям рода *Acinetobacter*.

Экспериментальное моделирование процесса фосфатаккумуляции выполняли с реализацией 3-х последовательных стадий процесса [2]. Каждая стадия характеризовалась определенным кислородным режимом, связанным с:

включением принудительной аэрации;

выключением принудительной аэрации;

возобновлением принудительной аэрации.

Эффективность фосфатаккумуляции контролировали на основании оценки содержания фосфатов в среде в процессе культивирования. Определение фосфат-ионов проводили по стандартной методике [3]. Концентрация растворенного кислорода определялась на приборе ULABUP-7041O.

Для обработки экспериментальных данных использовался пакет прикладных программ MS Excel.

Ниже приведены результаты теоретического анализа процесса фосфатаккумуляции и его экспериментального исследования.

1 стадия – включение принудительной аэрации

Основным источником углерода для исследуемых изолятов является пептон, источником фосфора – дигидрофосфат калия. Поскольку выход энергии в процессе аэробного дыхания является значительным, в ходе первой стадии может наблюдаться прирост биомассы.

В соответствие с вышесказанным уравнение протекающего на первой стадии процесса может иметь следующий вид:

$$C_{100}H_{180}N_{30}O_{40} + 2{,}5[PO_4^{3-}] + 8O_2 \; 15C_{4,4}H7O_{1,3}N_{0,9}P_{0,1} + 15C_2H_4O_2 + [\text{-}HPO_3\text{-}] + 4CO_2 + 7H_2O, \quad (1)$$

где $C_{100}H_{180}N_{30}O_{40}$ – усредненная химическая формула пептона, $[PO_4^{3-}]$ – фосфат-ионы, вносимые в питательную среду, $C_{4,4}H_7O_{1,3}N_{0,9}P_{0,1}$ – усредненная химическая формула биомассы, $C_2H_4O_2$ – уксусная кислота, $[\text{-}HPO_3\text{-}]$ – звено внутриклеточной полифосфатной гранулы [4].

Из уравнения 1 следует, что из 0,8 моль фосфора фосфатов (Р-PO_4) лишь 0,4 моль фосфора войдет в состав полифосфатов (Р-полиР), что составляет порядка 50 %.

2 стадия – выключение принудительной аэрации

Уравнение протекающего на второй стадии процесса может иметь следующий вид:

$$9C_2H_4O_2 + 10[\text{-}HPO_3\text{-}] + 3H_2O\ [C_4H_6O_2]_4 + [\text{-}HPO_3\text{-}] + 9[PO_4^{3-}] + 2CO_2, \quad (2)$$

где $[C_4H_6O_2]_4$ – полимерные насыщенные оксикислоты (ПНО).

Из уравнения 2 следует, что из 3,9 моль фосфора полифосфатов (Р-полиР) в питательную среду высвободится 2,9 моль фосфора фосфатов (Р-PO_4), что составляет порядка 76 %.

3 стадия – возобновление принудительной аэрации

Уравнение протекающего на третьей стадии процесса может иметь следующий вид:

$$[C_4H_6O_2]_4 + [\text{-}HPO_3\text{-}] + 1{,}2[PO_4^{3-}] + 5O_2\ [C_4H_6O_2] + 1{,}6C_{4,4}H_7O_{1,3}N_{0,9}P_{0,1} + 2[\text{-}HPO_3\text{-}] + 5CO_2 + 2{,}5H_2O. \quad (3)$$

Из уравнения 3 следует, что из 0,4 моль фосфора фосфатов (Р-PO_4) 0,39 моль фосфора войдет в состав полифосфатов (Р-полиР), что составляет порядка 97 %.

Теоретически в ходе процесса фосфатаккумуляции, реализованного по трехстадийной схеме, из среды может быть удалено около 85 % фосфора-фосфатов.

Результаты, полученные в ходе экспериментального моделирования процесса фосфатаккумуляции с использованием изолята А, представлены на рисунке 1.

Полученные в процессе экспериментальных исследований результаты соответствуют литературным данным о зависимости концентрации фосфат-ионов от концентрации растворенного кислорода в процессе биологической очистки сточных вод [5].

В условиях постоянной аэрации наблюдается снижение концентрации фосфатов на 26 % от начального количества фосфатов (2-й час культивирования). Уменьшение количества растворенного кислорода в среде на 2,9 мг/дм^3 привело к высвобождению фосфора фосфатов в количестве 5 % от концентрации фосфора фосфатов на втором часу культивирования. Дальнейшее возобновление аэрации способствовало интенсивному потребление фосфора фосфатов ФАО и снижению концентрации фосфора на 10 % по сравнению с показателями четвертого часа культивирования. Общая эффективность удаления фосфора фосфатов в процессе периодического культивирования бактерий изолята А в условиях изменения концентрации растворенного кислорода в пределах 4,2 -7,0 мг/дм^3 составила 30 %.

Полученные результаты биологической дефосфатации в процессе моделирования процесса фосфатаккумуляции с участием микроорганизмов изолята А (рис. 1) и результаты теоретических расчетов сведены в таблицу 1.

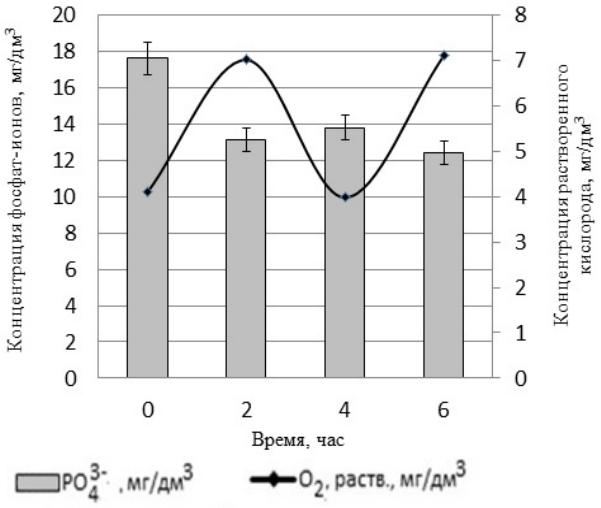


Рисунок 1 – Изменение концентраций фосфора фосфатов и растворенного кислорода в процессе периодического культивирования бактерий изолята А

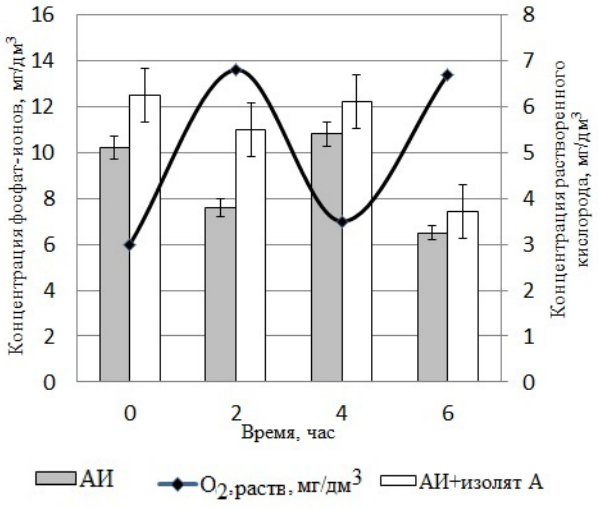


Рисунок 2 – Изменение концентраций фосфатов и растворенного кислорода в процессе периодического культивирования активного ила до и после биоаугментации изолята А

Из данных, представленных в таблице 1, очевидно, что процесс биологической дефосфатации в процессе экспериментального моделирования характеризуется довольно низкой эффективностью в сравнении с теоретически возможной: экспериментальная эффективность дефосфатации меньше расчетной в среднем на 55 %.

Таблица 1 – Теоретическое и экспериментальное количество удаленного (высвобожденного) фосфора фосфатов, мг/дм^3

Стадия моделирования фосфатаккумуляции	Количество удаленного (высвобожденного) $P\text{-}PO_4^{3-}$, мг/дм^3	
	расчетное	опытное
1	-3,2	-1,6
2	+1,2	+0,1
3	-3,9	-0,5
весь период моделирования	-5,8	-1,9

Причинами выявленного дисбаланса могут быть:

Малое время моделирования процесса фосфатаккумуляции, недостаточное для прироста бактерий в составе изолята и достижения установившихся аэробных и анаэробных условий;

Использование чистой культуры, чувствительность которой к внешним факторам обычно выше, чем у смешанных биоценозов.

Выявление и устранение обозначенных причин требовало проведения дополнительных исследований с увеличением длительности каждой стадии моделирования и оценкой возможности биоагументации бактерий изолята А в состав активного ила.

Результаты, полученные при моделировании биологической дефосфатации с использованием активного ила до и после биоагументации изолята А, приведены на рисунке 2. Доза активного ила в системе культивирования составляла 4 г АСВ/дм^3.

В условиях постоянной аэрации фосфат-ионы биологически потребляются, что приводит к снижению концентрации фосфатов на 2-й час культивирования на 24,5 и 8,8 % от начального количества фосфатов для активного ила и активного ила с интродуцированным изолятом А, соответственно. Уменьшение количества растворенного кислорода в среде на 3,6 мг/дм^3 привело к высвобождению фосфатов в количестве, равном 27,4 % от концентрации фосфатов на второй час культивирования для активного ила и 8,2 % для активного ила с изолятом А. Дальнейшее возобновление аэрации способствовало интенсивному потреблению фосфатов ФАО и снижению концентрации фосфора по сравнению с показателями четвертого часа культивирования на 37,3 % и 39,2 % для активного ила и активного ила с изолятом А, соответственно. Общая эффективность удаления фосфатов в процессе периодического культивирования составила 34,8 % для активного ила и 40 % для активного с изолятом А.

Согласно полученным результатам, отмечено незначительное повышение общей эффективности удаления фосфат-ионов в системе совместного культивирования активного ила и изолята А в сравнении с системой культивирования активного ила.

Достичь эффективности, близкой к теоретической, после биоагументации не удается, что может быть связано с малым количеством внесенных ФАО, сложностью их адаптации, а также с доступностью субстрата и кислорода.

Таким образом, отмечено, что максимальная расчетная эффективность биологической дефосфатции составила около 85 %. Показано, что экспериментально выявленная максимальная эффективность биологической дефосфатации с использованием ФАО в составе изолята А составила около 30 %, а активного ила с изолятом А – 40 %. Отмечено также, что эффективность биоагументации изолята А в микробиоценоз активного ила для повышения его дефосфатирующей способности определяется рядом факторов, среди которых важнейшими является количество (биомасса) внесенных ФАО, обеспечение их адаптации в сообществе, а также с доступность субстрата и кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева Т.Г. Минимизация техногенного воздействия на гидросферу в промышленных центрах / Т.Г. Воробьева, И.Ю. Шлёкова // Студент. Аспирант. Исследователь. – 2016. – № 4 (10). – С. 158–162.
2. Günther S. et al.. Dynamics of polyphosphate accumulating bacteria in wastewater communities detected via DAPI and tetracycline labelling // Appl. Environm. Microbiol. – 2009. – 75/7. – P. 2111–2121.
3. ПНД Ф 14.1:2.112–97 Методика измерений массовой концентрации фолсфат-ионов в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом с молибдатом аммония. – Москва, 1997.
4. Мешенгиссер Ю.М. Ретехнологизация сооружений очистки сточных вод / Ю.М. Мешенгиссер. – М.: ООО Издательский Дом «Вокруг цвета», 2012, – 211 с.: ил.
5. Жмур, Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками / Н.С. Жмур. – М.: АКВАРОС, 2003. – 512 с.

УДК 631.41

НАКОПЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ ПЕРВОГО КЛАССА ОПАСНОСТИ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ИМПАКТНОЙ ЗОНЫ НОВОЧЕРКАССКОЙ ГРЭС

В.А. Чаплыгин, Т.М. Минкина, С.С. Манджиева, Д.Г. Невидомская, Н.П. Черникова

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону, Россия

Загрязнение окружающей среды потенциально токсичными элементами (ПТЭ) является одной из актуальнейших проблем нашего времени. Выбросы предприятий химической и энергетической промышленности являются наиболее значимыми источниками поступления ТМ в окружающую среду. Среди химических элементов ТМ являются наиболее токсичными, многие из них проявляют высокую токсичность даже в следовых количествах (Жуйкова, Зиннатова, 2014; Rao et al., 2018; Pukalchik et al., 2018). Опасность металлов усугубляется еще и тем, что они обладают кумулятивным действием и сохраняют токсические свойства в течение длительного времени.

Исследования элементного химического состава лекарственных растений в настоящее время получили особую актуальность, т. к. именно в последние десятилетия во всем мире резко увеличился интерес к фитотерапии – комплексу относительно простых технологий профилактики и лечения с использованием лекарственных растений (Syso et al., 2016; Загурская, 2018). Увеличение внимания к лекарственным средствам растительного происхождения, т. е. фитопрепаратам, обусловлено постоянно выявляющимися побочными эффектами современных синтетических лекарственных средств и отсутствием лекарств для лечения хронических и длительно протекающих заболеваний. Терапия с участием фитопрепаратов имеет высокий потенциал, но существует вероятность недостаточно эффективного, а также побочного (опасного) действия лекарственных средств растительного происхождения, связанных с плохим качеством лекарственного сырья и конечных продуктов.

Zn и Cd являются одними из наиболее распространенных в промышленных выбросах ТМ, относящихся к первому классу опасности. Cd принадлежит к наиболее токсичным элементам, оказывающим множественное токсическое действие на растения (Zhao et al., 2014). Zn входит в число важнейших для физиологии растений микроэлементов, проблеме загрязнения которым также уделяют внимание многие исследователи (Baiseitova, Sartayeva, 2014; Mayachkina, Chugunov, 2009).

Северное Приазовье представляет собой уникальную территорию, где сохранилась естественная степная растительность. Количество работ, посвященных изучению аккумуляции тяжелых металлов (ТМ) в травянистых растениях, произрастающих в степной зоне, юга России очень невелико (Соборникова, Кизильштейн, 1990; Закруткин, Шишкина, 1997). В тоже время, на территории Северного Приазовья расположено большое количество промышленных предприятий, являющиеся источниками загрязнения окружающей среды.

Крупнейшим в Ростовской области предприятием, загрязняющим окружающую среду ТМ, является филиал ПАО «ОГК-2» «Новочеркасская» ГРЭС (НчГРЭС). На долю этого предприятия приходится 1 % всех выбросов поллютантов в атмосферу в РФ, в Ростовской области – свыше 50 %, в Новочеркасске – порядка 90 % (Экологический вестник Дона, 2019). В выбросах НчГРЭС содержится большое количество таких ТМ, в том числе Cd и Zn (Минкина и др., 2018). Ввиду того, что НчГРЭС уже более 50 лет оказывает техногенное воздействие на прилегающие территории, образуя зону полиэлементного загрязнения, данный регион Ростовской области был выбран объектом исследования.

Площадки мониторинга на данной территории были заложены на расстоянии 1–20 км от НчГРЭС. Выбор представленных площадок мониторинга также обусловлен произрастанием на них всех изучаемых видов лекарственных травянистых растений. Площадки расположены по преобладающему северо-западному направлению ветров и прилегающему к данному направлению северо-северо-западному (№ 4, № 5, №№ 8–10). Площадки № 1, № 2, № 3, № 7, №№ 11–14 заложены на расстоянии 1–3 км от НчГРЭС в различных направлениях и лежащих вне преобладающего направления ветров. Площадка № 9 была выбрана в качестве фоновой за счёт своей большой удаленности (15 км) от НчГРЭС и отсутствия дополнительных источников загрязнения.

Отбор образцов растений полыни австрийской (*Artemisia austriaca* Pall. ex. Wild.), тысячелистника благородного (*Achillea nobilis* L.) и пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), проводился во второй декаде июня в фазу массового цветения. В образцах растений определялись Cd и Zn, металлы первого класса опасности, присутствующие в выбросах НчГРЭС (Экологический вестник Дона, 2019).

Минерализацию проб проводили методом сухого озоления согласно ГОСТ 26929–94. Экстракция ТМ из золы осуществлялась растворением в 20 %-ном растворе HCl с последующим определением методом ААС (Методические указания…, 1992). Оценка уровня загрязнения растений ТМ проводилась путем сопоставления содержания ТМ в исследуемой растительности с ПДК для лекарственного растительного сырья в соответствии с СанПиН 2.3.2.560–96.

Максимальное содержание изучаемых металлов наблюдается на площадках, расположенных наиболее близко к источнику загрязнения по линии преобладающего направления розы ветров (№ 4, 5). С увеличением расстояния от предприятия в северо-западном направлении (площадки № 6, 8, 9, 10) идёт постепенное снижение их содержания. В то же время, растения площадок, расположенных в радиусе 1–2 км от НчГРЭС, но в других направлениях (№ 1, 11, 12), являются менее загрязненными. Это связано с тем, что данные участки лежат вне зоны преобладающей розы ветров, поэтому в меньшей степени подвержены техногенному загрязнению. В целом для обоих металлов отмечается общая закономерность: пониженные уровни техногенного загрязнения к югу от источника выброса.

На площадках мониторинга № 4, № 5 и № 6, испытывающий наибольшую техногенную нагрузку, установлено загрязнение Zn (до 3,1 ПДК) для всех изучаемых видов растений (табл. 1).

Таблица 1. Содержание Zn и Cd в различных видах дикорастущих травянистых растений на площадках мониторинга, мг/кг

Площадка	Направление и расстояние от НчГРЭС, км	Zn					
		Стебли	Корни	Стебли	Корни	Стебли	Корни
		Полынь австрийская		Тысячелистник		Пижма обыкновенная	
1	1,0 СВ	47±6	40±4	38±4	34±4	21±3	18±3
2	3,0 ЮЗ	23±2	18±1	18±3	28±4	15±2	15±1
3	2,7 ЮЗ	13±1	22±1	20±3	20±3	11±2	12±1
4	1,6 СЗ	**156**±18	118±9	**123**±14	109±12	**101**±10	67±9
5	1,2 ССЗ	**109**±8	90±8	**106**±11	76±9	**67**±8	49±6
6	2,0 СЗ	**74**±6	67±5	**60**±6	53±6	**52**±5	38±6
7	1,5 С	22±3	20±1	43±5	42±4	15±2	20±3
8	5,0 СЗ	40±4	36±3	45±6	60±8	31±4	25±4
9	15,0 СЗ	10±1	9±1	6±1	12±1	8±1	7±1
10	20,0 СЗ	12±1	11±1	10±1	9±1	5±1	5±1
11	1,0 ЮВ	15±2	18±2	13±1	25±2	15±2	13±2
12	1,1 Ю	33±3	30±3	31±3	28±2	14±2	14±1
13	2,2 ЮВ	10±1	8±1	16±2	24±2	9±1	12±1
14	2,1 В	13±2	7±1	22±2	34±4	11±1	19±3
$НСР_{0,95}$		1,7	1,4	2,1	3,0	0,4	1,9
		Cd					
		Полынь австрийская		Тысячелистник		Пижма обыкновенная	
1	1,0 СВ	0,21±0,01	0,19±0,02	0,19±0,01	0,15±0,01	0,18±0,03	0,13±0,02
2	3,0 ЮЗ	0,23±0,02	0,26±0,03	0,27±0,03	0,23±0,02	0,16±0,02	0,18±0,02
3	2,7 ЮЗ	0,09±0,01	0,15±0,01	0,14±0,01	0,15±0,01	0,09±0,01	0,11±0,01
4	1,6 СЗ	**2,88**±0,30	2,00±0,22	**3,16**±0,34	2,12±0,23	**2,40**±0,24	1,43±0,15
5	1,2 ССЗ	**1,84**±0,26	1,52±0,10	**2,39**±0,19	1,64±0,11	**1,64**±0,18	1,05±0,09
6	2,0 СЗ	**1,05**±0,12	0,94±0,08	**1,44**±0,09	1,06±0,07	**1,05**±0,13	0,70±0,06
7	1,5 С	0,14±0,01	0,13±0,01	0,15±0,01	0,13±0,01	0,13±0,01	0,12±0,04
8	5,0 СЗ	0,29±0,03	0,28±0,04	**0,38**±0,05	0,31±0,03	0,25±0,03	0,21±0,02
9	15,0 СЗ	0,04±0,01	0,06±0,01	0,04±0,01	0,09±0,01	0,08±0,01	0,10±0,01
10	20,0 СЗ	0,01±0,01	0,04±0,01	0,02±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01	0,06±0,01
11	1,0 ЮВ	0,13±0,02	0,12±0,01	0,16±0,02	0,16±0,02	0,13±0,01	0,10±0,01
12	1,1 Ю	0,10±0,01	0,12±0,01	0,16±0,02	0,19±0,03	0,13±0,02	0,11±0,01
13	2,2 ЮВ	0,15±0,02	0,15±0,03	0,08±0,01	0,18±0,03	0,20±0,02	0,15±0,02
14	2,1 В	0,15±0,02	0,15±0,02	0,09±0,01	0,16±0,02	0,09±0,01	0,09±0,01
$НСР_{0,95}$		3,2	0,02	0,01	0,03	0,01	0,02
Примечание: жирным шрифтом выделено превышение ПДК (СанПиН 2.3.2.560–96) (50 мг/кг для Zn и 0,1 мг/кг Cd) для кормовых трав							

Важно отметить, что превышение ПДК для лекарственного сырья по данному элементу фиксируется только в условиях максимальной техногенной нагрузки, в то время как на остальных площадках мониторинга содержание Zn соответствует или не превышает фоновое. У изучаемых растений отмечается аккумуляция Zn преимущественно в надземной части, используемой для приготовления лекарственных препаратов. Наибольшим содержанием металла отличается полынь, минимальное содержание Zn установлено в пижме. Содержание Zn в растениях на два порядка превосходит концентрацию Cd, что связано с высокой потребностью растений в данном элементе, выполняющем ряд биологических функций. Однако уровень загрязнения изучаемых растений Zn достаточно невысокий.

Значительное превышение ПДК для Cd отмечается для всех изучаемых видов растений и достигает 28,8 раза для полыни, 31,6 для тысячелистника и 24,0 для пижмы (табл. 1). При загрязнении растений Cd наблюдается чёткая локализация на площадках мониторинга, испытывающих наибольшую техногенную нагрузку. У полыни и тысячелистника также наблюдаются небольшие превышения ПДК или близкие к пороговой концентрации Cd в пределах всей 5 километровой зоны исследования. Cd, как и Zn, характеризуется преимущественной аккумуляцией в надземной части растений, что учитывая высокий уровень загрязнения им растений характеризует данный металл как исключительно опасный поллютант. Максимальная концентрация Cd установлена в тысячелистнике, минимальная – в пижме.

Таким образом, установлено, многолетнее техногенное загрязнение дикорастущих лекарственных травянистых растений, сосредоточенное в 5 километровой зоне, преимущественно в северо-западном направлении от НчГРЭС. Приоритетными загрязнителями исследуемых территорий выступают Zn и Cd. Для изучаемых растений семейства Астровые наблюдается преимущественная аккумуляция Zn и Cd в надземной части. Высокое содержание Zn и Cd во всех рассматриваемых лекарственных растениях, составляющее 3,1 и 31,6 ПДК соответственно представляет потенциальную угрозу здоровью населения.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № 0852–2020–0029 и при поддержке гранта Президента, № МК-2818.2019.5.

ЛИТЕРАТУРА

Жуйкова Т.В., Зиннатова Э.Р. Аккумулирующая способность растений в условиях техногенного загрязнения почв тяжёлыми металлами // Поволжский экологический журнал. – 2014. – № 2. – С. 196–207.
Загурская Ю.В., Коцупий О.В., Сиромля Т.И. Листья Padus avium (Rosaceae) из техногенно нарушенных экотопов как источник биологически активных веществ // Растительный мир Азиатской России. 2018. № 4. С. 102–107.
Закруткин В.Е., Шишкина Д.Ю. Некоторые аспекты распределения меди и цинка в почвах и растениях агроландшафтов Ростовской области // Мат. Межд. симпозиума «Тяжелые металлы в окружающей среде». Пущино, 1997. С. 101–109.
Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства. М.: ЦИНАО, 1992. 61 с.
Минкина Т.М., и др. Аккумуляция тяжелых металлов разнотравной степной растительностью по данным многолетнего мониторинга // Аридные экосистемы. – 2018. – Т. 24, № 3 (76). – С. 43–55.
Соборникова И.Г., Кизильштейн Л.Я. Медь, цинк, свинец в почвах и растениях полыни г. Ростова-на-Дону и его окрестностей // Изв. Сев. – Кав. центра выс. школы. Естест. Науки. – 1990. – № 4. – С. 3–8.
Экологический вестник Дона: О состоянии окружающей среды и природных ресурсов Ростовской области в 2019 году. Ростов-на-Дону. 2019. С. 283.
Baiseitova N.M., Sartayeva J.M. Phytotoxic action of heavy metals in technogenic pollution. Young Scientist. – 2014. № 2. P. 382–384.
Mayachkina N.V., Chugunov M.V. Features bioassay of soil for the purpose of ecotoxicological assessment // Vestn. The Nizhny Novgorod. Zap them. N.I. Lobachevskian. – 2009. № 1. P. 84–93.
Pukalchik M., et al. Biochar, wood ash and humic substances mitigating trace elements stress in contaminated sandy loam soil: evidence from an integrative approach // Chemosphere. 2018. Vol. 203. P. 228–238. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.181.
Rao M., et al.. Antimicrobial compounds of plant origin as efflux pump inhibitors: new avenues for controlling multidrug resistant pathogens // Journal of Antimicrobial Agents. – 2018. 4:1. DOI: 10.4172/2472–1212.1000159.
Syso A.I., at al. Ecological and Biogeochemical Assessment of Elemental and Biochemical Composition of the Vegetation of Anthropogenically Disturbed Ecosystems (Based on the Example of Achillea millefolium L.) // Contemporary Problems of Ecology. 2016. Vol. 9. № 5. P. 643–651.
Zhao Z.J., Nan Z.R., Wang Z.W., Yang Y.M., Shimizu M. Interaction between Cd and Pb in the soil-plant system: a case study of an arid oasis soil-cole system // J Arid Land. – 2014. – № 6 (1). P. 59–68. DOI: 10.1007/s40333–013–0194–7.

УДК 665.939.351

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ АГАРОФИТОВ

Т.А. Игнатова, Н.Г. Строкова

ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии, Москва, Россия

При получении агара из красных водорослей образуются водорослевые отходы (ВО), сырая масса которых составляет от 295 % до 663 % к массе сушеного сырья в зависимости от вида водоросли (табл. 1).

Таблица 1 – Количество ВО, образующихся при получении агара из различных видов агарофитов и их химический состав

Наименование красной водоросли из которой получен ВО	Сырой ВО, % к в/с водоросли	Сухой ВО, % к в/с водоросли	Содержание воды, %	Содержание, % сух. в-ва		
				золы	белка ($N_{общ.}$*6,25)	полисахаридов
Gelidium amansii [1]	365	33,3	90,8	5,2	26,1	68,7
Ahnfeltia tobuchiensis [1]	380	88,8	76,6	7,2	41,5	51,3
Ahnfeltia plicata[1]	295	46,2	82,3	7,7	15,1	77,2
G. tenuistipitata[1]	663	15,9	95,3	6,6	27,7	65,7
Ahnfeltia tobuchiensis [2]	314	78,4	75,0	25,0	19,1	50,0

[1] Выделение агара по разработанной в ФГБНУ «ВНИРО» технологии [Патент РФ 2435443]
[2] Выделение агара по технологии, с применением окиси кальция [Патент РФ 2189990]

Ограниченность применения водорослевых отходов связана с высоким содержанием в них минеральных веществ (20–25 %), обусловленное применением растворов щелочи в технологии производства агара и наличием белков, которые устойчивы к действию протеолитических ферментов [Зимина, Наседкина, Шмелькова, 1972; Красильникова, Медведева, 1974; Зимина, 1986; Патент РФ 2189990]. Поэтому, водорослевые отходы зачастую использовали для производства различных кормов (порошки, гидролизаты) для сельскохозяйственных животных и рыб, применение которых в животноводстве позволило улучшить качество молока, повысить продуктивность животных на 9 % и увеличить привес животных на 18–20 %, при добавлении их к рациону молодняка крупного рогатого скота и свиней [Бойко и др., 1974; Зимина, Кушева, Врищ, 1989; Дума, Щербина, Салькова, 1991].

Разработанная в ФГБНУ «ВНИРО» технология получения агара не предусматривает применения щелочи [Патент РФ 2435443], что привело к снижению содержания минеральных веществ в водорослевых отходах с 25 до 7,2 %. Около 51,3–68,7 % сухих веществ водорослевых отходов приходиться на полисахариды, основная часть которых представлена трудногидролизуемыми полисахаридами (ТГП), и на белки от 26,1 до 41,5 % сухого ВО (табл. 1). Из-за значительного содержания полисахаридов в сухих водорослевых отходах целесообразно рассматривать их как сырье для получения пищевых волокон (ПВ).

Известно, что недостаток пищевых волокон в питании способствует возникновению у человека сердечно-сосудистых, желудочно-кишечных и метаболических нарушений. Регулярное употребление пищевых волокон в составе диет улучшают моторные функции кишечника, понижают уровень холестерина и регулируют содержание глюкозы в крови [Полшков 2006; Шендеров, 2008]. Также ПВ используют в пищевой промышленности в качестве водосвязывающих ингредиентов, что приводит к повышению выхода и снижению дефектов при производстве продукции. Жиросвязывающая способность пищевых волокон не велика [Макурина, Румянцева, 2006].

Основной задачей при разработке технологии получения пищевых волокон из водорослевых отходов является получение препаратов с высокими функционально-технологическими свойствами (ФТС). Работы отечественных ученых показали, что наиболее эффективное нарушение связи углевод-белок ВО достигается в результате применения растворов щелочей [Бойко, 1974; Красильникова, Медведева, 1974; Медведева, 1978].

Высокое содержание клетчатки в красной водоросли *Ahnfeltia* (14–17 %) обуславливает жесткую структуру её талломов, по сравнению с *Gracilaria*, которая содержит от 3 до 10 % клетчатки, что приводит к необходимости использования различных подходов для переработки ВО в зависимости от вида водоросли.

При изучении влияния щелочи различных концентраций (от 3 до 7 %) при обработке водорослевых отходов *Gracilaria* на извлечение белка и ФТС пищевых волокон установлено, что увеличение концентрации щелочи более 3 % не рационально, так как не приводит к увеличению этих показателей (табл. 2).

Таблица 2 – Изменение химического состава, выхода и ФТС пищевых волокон из *Gracilaria* в зависимости от концентрации щелочи

Показатель		Концентрация щелочи, %		
		3	5	7
Выход, % сух. в-ва		29,2	24,4	17,5
ВСС	22±3ºС	11,1	10,9	10,1
	87±3ºС	23,3	22,3	21,7
ЖСС	22±3ºС	1,5	1,8	1,5
	87±3ºС	1,6	1,3	1,3
Набухаемость	22±3ºС	298	209	200
	87±3ºС	354	333	317
Содержание воды, %		6,9	6,8	5,9
Содержание, % сух. в-ва				
Золы		7,2	6,9	6,0
Белка($N_{общ.}$*6,25)		3,3	2,8	3,2
Углеводов	Глюкозы	9,9	4,7	6,9
	Маннозы	1,3	0,9	1,1
	Агара	47,8	34,7	22,4
	ТГП[2]	30,5	50,4	60,4

При повышении концентрации щелочи (от 3 % до 7 %) при обработке водорослевого отхода из *Gracilaria*, происходит экстрагирование остаточного агара, что приводит к снижению выхода пищевых волокон (табл. 2).

Для выбора рационального способа удаления из пищевых волокон *Gracilaria* раствора щелочи были изучены два способа их отмывки, заключающиеся в кипячении пищевых волокон в течение часа при pH 5,5±0,5 и 6,5±0,5 с последующей их промывкой горячей водой. При кипячении пищевых волокон из *Gracilaria* при pH 5,5±0,5 происходит снижение остаточного содержания агара на 8 %, что приводит к снижению ВСС и набухаемости препарата (табл. 3).

ЖСС при рассматриваемых способах отмывки пищевых волокон осталась практически неизменной и составила 1,6–2,0 г жира на 1 г препарата (табл. 3). Таким образом, водорослевые отходы *Gracilaria* следует обрабатывать 3 %-ным раствором щелочи в течение 30 мин при температуре 97±2 °С (ГМ 1:4) с последующем их кипячением в воде при pH 6,5±0,5, температуре 97±2ºС (1±0,1 час) и промывкой горячей водой. При переработке ВО *A. plicata* с целью получения препарата ПВ была проведена депротеинизация ВО карбонатом натрия, окисью кальция и гидроксидом калия в течение 0,5, 1,0 и 1,5 ч, при этом концентрация реагентов составляла 1, 3 и 6 % (табл. 4).

Для выбора рациональных параметров получения ПВ проведена статистическая обработка результатов эксперимента, в результате чего были рассчитаны критерии Фишера (табл. 5).

Таблица 3 – Изменение химического состава и ФТС пищевых волокон из *Gracilaria* в зависимости от способа отмывки

Показатель		Способ отмывки ПВ из *Gracilaria*	
		ПВГр-1[1]	ПВГр-2[2]
ВСС	22±3ºС	21,8	16,5
	87±3ºС	30,0	24,9
ЖСС	22±3ºС	1,8	2,0
	87±3ºС	1,6	1,9
Набухаемость	22±3ºС	200	250
	87±3ºС	175	190
Содержание воды, %		8,6	5,0
Содержание, % сух. в-ва			
Золы		6,5	5,2
Белка($N_{общ.}$*6,25)		3,5	4,2
Углеводов	Глюкозы	4,8	4,3
	Маннозы	0,9	1,0
	Агара	35,4	27,4
	ТГП[2]	48,9	57,9

[1] Пищевые волокна из ВО *Gracilaria*, полученные после кипячения при pH 6,5±0,5

[2] Пищевые волокна из ВО *Gracilaria*, полученные после кипячения при pH 5,5±0,5

При сравнении полученного критерия Фишера ($F_{экс}$) с табличным значением этого критерия ($F_{таб}$=19, при α=0,05; f_1=2; f_2=2) было установлено, что основным фактором воздействующим на процесс депротеинирования является тип применяемого реагента. Данный переменный фактор оказывает статистически значимое влияние на такие показатели как, содержание белка, углеводов в ПВ, а также на их выход. Все остальные переменные факторы не оказывают статистически значимого влияния на процесс депротеинирования ВО. Таким образом, для получения ПВ следует проводить обработку водорослевого отхода в течение 0,5 ч при концентрации реагента 1 % (табл. 5).

Сравнение средних показателей выхода, содержание белка и углеводов ПВ с помощью рангового критерия Дункана, по различным типам реагентов, показало, отсутствие статистически значимых различий между использованием гидроксида калия и карбоната натрия при проведении обработки водорослевых отходов. На основании сравнения стоимости, безопасности и технико-экономических показателей гидроксида калия и карбоната натрия установлена целесообразность применения карбоната натрия для обработки водорослевых отходов.

В результате проведенных исследований установлено, что рациональными параметрами обработки водорослевых отходов из беломорской анфельции *A. plicata* являются: 1 %-ный раствор карбоната натрия, ГМ 1:4, температура 97±2ºС, продолжительность 0,5 ч.

Таблица 4 – Изменения физико-химических показателей и выхода ПВ в зависимости от условий депротеинизации ВО *A. plicata*

Условия депротеинизация ВО	Содержание					Выход ПВ, %	Набухае-мость, %	Водосвязывающая способность, г воды/г ПВ
	воды, %	белка, % сух. в-ва	золы, % сух. в-ва	углеводы, % сухого в-ва				
				всего	клетчатки, % СВ			
1 % Na_2CO_3, 1 ч	10,2	30,70	7,56	61,7	43,8	12,4	242	5,7
3 % Na_2CO_3, 0,5 ч	11,1	26,16	6,62	67,2	33,7	15,4	382	6,3
6 % Na_2CO_3, 1,5 ч	11,1	27,64	5,41	66,9	36,0	14,9	380	5,8
1 % CaO, 0,5 ч	11,1	28,50	8,22	63,3	39,4	16,4	250	5,5
3 % CaO, 1,5 ч	10,7	26,52	9,59	63,9	40,5	15,8	350	5,9
6 % CaO, 1 ч	10,7	28,25	10,58	61,2	43,5	13,7	309	5,4
1 % KOH, 1,5 ч	9,9	22,31	10,48	67,2	57,7	7,6	244	6,2
3 % KOH, 1 ч	13,7	20,56	9,75	69,7	48,6	9,1	277	6,0
6 % KOH, 0,5 ч	13,1	14,68	12,64	72,7	53,5	7,6	245	6,5

Таблица 5 – Значения рассчитанного критерия Фишера ($F_{экс}$) по контролируемым показателям

Источник дисперсии	Наименование отклика процесса					
	белок	углеводы (всего)	клетчатка	выход	набухаемость	водосвязы-вающая способность
Концентрация реагента	4,2186	5,2195	1,5553	0,8990	7,8073	0,9423
Продолжительность обработки	3,5336	5,9478	0,4632	0,7981	2,1668	2,1539
Тип реагента	30,0248	24,5109	11,2279	22,8648	5,6330	5,2115

Таблица 6 – Химический состав и функционально-технологические свойства пищевых волокон

Наименование пищевых волокон	Содержание						ВСС, г воды/г ПВ	Набухаемость, %
	воды, %	золы, % сух. в-ва	белка, % сух. в-ва	углеводов, % сух. в-ва				
				всего	в том числе			
					клетчатки	ЛГП[3]		
Ahnfeltia plicata	11,0	7,1	28,4	64,5	38,8	25,7	6,0	312,0
Ahnfeltia tobuchiensis	7,8	2,5	14,9	82,6	78,7	3,9	6,2	46,0
Gelidium	8,0	2,5	21,7	75,8	70,7	5,1	5,9	177,0
Gracilaria 1	6,9	7,2	3,3	89,5	30,5	59,0	11,1	298,0
Gracilaria 2	8,6	6,5	3,5	90,0	48,9	41,1	21,8	200,0
Пшеничные 1	4,9	1,0	0,5	98,5	96,0	2,5	5,3	145,0
Пшеничные 2	3,8	5,3	17,1	77,6	12,8	64,8	4,4	173,0
Картофельные	11,5	3,5	5,1	91,4	26,0	65,4	6,7	223,0
Гороховые 1	7,1	3,2	6,9	89,9	70,1	19,8	6,7	229,0
Гороховые 2	8,7	1,8	4,7	93,5	49,6	43,9	11,5	350,0
Морковные	9,3	6,0	2,4	91,6	71,4	20,2	13,4	374,0
Апельсиновые	6,0	3,1	9,0	88,0	44,0	44,0	17,4	981,0
Бамбуковые	5,1	0,3	0,1	99,6	97,0	2,6	4,7	149,0

Для водорослевого отхода *Gelidium* депротеинирование рационально проводить 0,5 %-ной щелочью. Из-за жесткости структуры талломов ВО *Ahnfeltia tobuchiensis* необходимо перед стадией их депротеинирования применять кислотную обработку (5 % серная кислота, температура 97±2 °С и продолжительность 30 мин, ГМ 1:5) для разрушения структуры его тканей. Щелочную обработку ВО *Ahnfeltia tobuchiensis* рационально проводить аналогично как для ВО *Gracilaria*.

Анализ микробиологических показателей качества и содержания тяжелых металлов в разработанных препаратов пищевых волокон из водорослевых отходов показало их полное соответствие требованиям ТР ЕАЭС 040/2016 «О безопасности рыбы и рыбной продукции» и ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».

На основании проведенных исследований были разработаны ТУ 9284–127–0072124–12 «Пищевые волокна из водорослей» и ТИ на производство, а также получен патент РФ 2445780 «Способ получения пищевых волокон из водорослевого сырья».

Разработанные пищевые волокна из водорослей по таким показателям как содержание клетчатки, набухаемость и водосвязывающая способность, не уступают коммерческим препаратам ПВ (табл. 6).

По классификации, предложенной Дудкиным М.С. и Щелкуновым Л.Ф. [Дудкин, Щелкунов, 1998], полученные ПВ по содержанию клетчатки можно отнести к полуконцентратам, а по общему содержанию углеводов, в состав которых входит клетчатка и агар – к концентратам ПВ.

Пищевые волокна из агарофитов были использованы при получении рыбных фаршевых пищевых продуктов типа «палочки рыбные» на основе фарша рыбы, состоящего на 60 % из трески и на 40 % из горбуши. Низкое содержание жира (5 %) и незначительная энергетическая ценность (116 ккал/100 г. продукта) «палочек рыбных» позволяют отнести их к среднекалорийному продукту и использовать в диетическом питании.

На основании проведенных исследований показана возможность применения пищевых волокон из водорослей в технологии рыбных фаршевых пищевых продуктов. Разработана техническая документация на «Палочки рыбные диетические с пищевыми волокнами» (ТУ9266–006–00472124 и ТИ к ним) и получен патент РФ № 2459456 «Диетический продукт».

Таким образом, разработаны рациональные режимы переработки водорослевых отходов различных видов агарофитов и техническая документация на их производство, а также рекомендации по применению пищевых волокон при изготовлении рыбных фаршевых пищевых продуктов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойко Л.И. и др. Биологическая оценка белковых веществ водорослей и поиск путей рационального их использования // Всесоюзное совещание по морской альгологии – макрофитобентосу. 1974. С. 14–16.
2. Бойко Л.И. и др. Разработка технологии получения препарата, содержащего аминокислоты и пептиды, из отходов переработки агароносных водорослей // Всесоюзное совещание по морской альгологии – макрофитобентосу. 1974. С. 16–17.
3. Дудкин М.С., Щелкунов Л.Ф. Новые продукты питания. М.: МАИК «Наука». 1998. 304 с.
4. Дума Л.Н. и др. Использование отходов филлофоры при производстве агароида в кормлении рыб // Биологически активные вещества гидробионтов – новые лекарственные лечебно-профилактические и технические препараты. 1991. С. 136–137.
5. Зимина Л.С. и др. Аминокислотный состав некоторых красных водорослей // Исследования по технологии рыбных продуктов. 1972. Вып. 3. С. 40–45.
6. Зимина Л.С. и др. Пути использования отходов агарового производства в народном хозяйстве // Проблемы технологии переработки нетрадиционного сырья из объектов Дальневосточного промысла. 1989. С. 111–115.
7. Зимина Л.С. Улучшение качества кормового гидролизата из водорослевых отходов агарового производства // Исследования по технологии гидробионтов Дальневосточных морей. 1986. С. 106–112.
8. Красильникова С.В. Исследование особенностей белков красных агароносных водорослей / Красильникова С.В., Медведева Е.И. // Всесоюзное совещание по морской альгологии – макрофитобентосу. 1974. С. 76–78.
9. Макурина С.В., Румянцева Г.Н. Сравнительная характеристика функционально-технологических свойств пищевых волокон. Мясная индустрия. 2006 № 6. С. 28–29.
10. Медведева Е.И. Разработка комплексной технологии использования черноморской филлофоры // Биология моря. 1978. № 47. С. 97–98.
11. Патент РФ 2435443 Универсальный способ получения агара из красных водорослей (агарофитов) / Подкорытова А.В и др.; заявитель и патентообладатель ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии. – № 2010120014/13; заявл. 20.05.2010; опубл. 10.12.2011. Бюл. № 34. – 6 с.
12. Патент РФ 2445780 Российская Федерация, МПК[8] A23 L 1/0532. Способ получения пищевых волокон из водорослевого сырья / Подкорытова А.В. и др.; заявитель и патентообладатель ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии – № 2010146763/13; заявл. 18.11.2010; опубл. 27.03.2012. Бюл. № 9. – 6 с.
13. Патент РФ 2459456, Диетический продукт [Текст] / Подкорытова А.В. и др.; заявитель и патентообладатель ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии. № 2011108970/13; заявл. 11.03.2011; опубл. 27.08.2012, Бюл. № 24. – 6 с.
14. Патент РФ № 2189990 Способ получения высокоочищенного агара и агарозы из красной водоросли анфельции тобучинской, Подкорытова А.В. и др. Опубликован 27.09.02. Бюл. № 27.
15. Полшков А.Н. Медико-биологические и функциональные аспекты применения пищевых волокон. Вестник Аромарос-М. 2006. № 3(17). С. 65–70.
16. Шендеров Б.А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. / Б.А. Шендеров – М.: ДеЛипринт. – 2008. – 319 с.

Секция 4. Биоинформатика и IT

УДК 592

ЭКДИЗОНОВЫЙ РЕЦЕПТОР НАСЕКОМЫХ-ВРЕДИТЕЛЕЙ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ФАРМАКОФОРНОГО ПОИСКА НОВЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ

М.С. Кондратьев, А.А. Самченко, В.М. Комаров, Н.Н. Хечинашвили

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Создание экологически чистых инсектицидов остается актуальной задачей для биотехнологии и агрокультуры. В 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.

Стоит также отметить, что стероидные соединения с активностью экдизона вырабатывается и самими растениями – предполагается, что они синтезируют экдизоны для защиты от насекомых, поскольку в большом количестве эти соединения для членистоногих токсичны [2]. Считаясь БАДами (экстракт левзеи, Rhaponticum), фитоэкдизоны в настоящее время входят в практику, хотя недавно было показано, что эти 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 данного 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. 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.

Нами было воспроизведено экспериментально известное 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 меньшей аффинностью (порядка 7 ккал / моль). Данное исследование позволяет провести направленную модификацию веществ стероидной природы или 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 575.18

АНАЛИЗ РЕПИТОМА В СЕМЕЙСТВЕ CANNABACEAE – ПОИСК КЛЮЧА К ВОЗНИКНОВЕНИЮ ПОЛА

О.В. Разумова[1], Ю.В. Бочаркина[1,2], К.Д. Боне[1,3], Д.В. Романов[1], Г.И. Карлов[1].

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия
Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия
Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Проблема возникновения пола в целом, и половых хромосом в частности интересовала людей во все времена. Несмотря на то, что само наличие пола у растений явление довольно редкое, а наличие гетероморфных половых хромосом – исключительно редкое, растения как модель для изучения механизмов эволюции пола во многом предпочтительней животных. Это связано, в первую очередь с тем, что, в отличие от животных, растения обладают разными системами детерминации пола, их половые хромосомы возникли сравнительно недавно и находятся на разных этапах эволюционной зрелости, что позволяет проследить этапы их эволюционного пути. Однако, в связи с тем, что гетероморфные половые хромосомы встречаются лишь у немногих видов растений из филогенетически далёких семейств, построение стройной и логичной системы возникновения пола затруднено, и неизбежно связано со значительным количеством спекулятивных выводов, не подкреплённых наблюдениями. Семейство Cannabaceae может служить удобной моделью для понимания процессов, происходящих в половых хромосомах, поскольку включает в себя растения из двух родов с разными системами определения пола.

В семейство Cannabaceae sensu stricto включают растения рода Хмель (Humulus) с двумя общепризнанными видами – хмелем обыкновенным Humulus lupulus L. и хмелем японским H. japonicus Siebold & Zucc. и род Конопля (Cannabis) с единственным крайне полиморфным видом Cannabis sativa L. Все растения двудомные, однако различаются по своему хромосомному составу. Хмель обыкновенный в кариотипе имеет 20 хромосом (2n=18+XX\XV у женских и мужских растений соответственно), у хмеля японского женские растения имеют 16 хромосом (2n=14+XX), а мужские – 17 (2n=14+XY1Y2). У конопли система хромосом схожа с хмелем обыкновенным, и у мужских и у женских растений по 18 аутосом и одна пара половых хромосом – XV\XX. Однако, в отличие от хмеля обыкновенного, Y хромосома которого самая маленькая в кариотипе, Y хромосома конопли, напротив, имеет самый большой относительный размер. Данное различие имеет принципиальное значение, поскольку именно размер половой хромосомы в гетерогаметном поле принято считать маркером эволюционной древности системы половых хромосом.

Дело в том, что по наиболее разработанной и принятой на данный момент модели эволюции пола, образование половых хромосом начинается с возникновения на аутосомах нерекомбинирующего участка, ответственного за определение пола (образования мужских и женских цветков), с последующим распространением нерекомбинирующей области на хромосоме, исключенной из кроссинговера, и как следствие – дифференциацией на X и Y хромосомы (или Z и W, в случае женского гетерогаметного пола). Еще одним следствием исключения из процесса рекомбинации является накопление хромосомой участков хлоропластной и митохондриальной ДНК, мобильных генетических элементов и других повторяющихся последовательностей. На последней стадии дифференциации половых хромосом начинается обратный процесс, когда нерекомбинирующие, увеличенные гетерохроматиновые области Y-хромосомы элиминируются, вплоть до полной дегенерации хромосомы с возникновением системы XX/XO, когда Y хромосома, даже если остается в кариотипе физически, полностью утрачивает роль пол-определяющего фактора. Таким образом, считается, что чем меньше по размеру Y-хромосома, тем более вырожденной, и, как следствие, более эволюционно древней, является хромосома. Однако в последние годы данная концепция подвергается сомнению. Ряд исследований, в первую очередь на хурме (Diōspyros), показали, что после возникновения первичной мутации, ответственной за дифференциацию цветков на мужские и женские, дальнейшего подавления рекомбинации и увеличения размера Y-хромосомы может не происходить, и концепция «большая Y-хромосома – эволюционная молодость, маленькая – зрелость» утрачивает свое господство. Однако, почему именно в одних случаях нерекомбинирующая хромосома начинает накапливать некодирующие участки ДНК и сначала разрастается, а затем частично элиминируется, а в других случаях этого не происходит, на данный момент не ясно. Наличие половых хромосом на разных этапах развития у близкородственных видов, как в семействе Cannabaceae, может дать ключ к разгадке этой тайны.

В своей работе мы провели секвенирование репитомов мужских и женских растений трех видов семейства Cannabaceae. Полученные сиквенсы проанализировали на наличие повторяющихся последовательностей ДНК в программном обеспечении RepeatExplorer2. Анализ геномов подтвердил большое количество повторяющихся последовательностей ДНК. Так на долю повторяющихся последовательностей в геноме изученных видов приходится порядка 61–65 % от всего генома. У хмелей большая часть выявленных последовательностей относятся к неклассифицированным семействам, среди известных около 8 % приходится на Ty3/Gypsy ретротранспозоны. В конопле 85 % обнаруженных кластеров повторяющихся последовательностей приходится на различные группы LTR, около 12 % – на сталлеитную ДНК и повторяющиеся последовательности органелл, только 2 % были отмечены как неизвестные. Возможно, это связано с большей изученностью Cannabis sativa, по сравнению с видами рода Humulus.

Мы сравнили репитомы мужских и женских растений хмелей между собой, по каждому виду отдельно, а также с использованием стратегии сравнительной кластеризации, выявили общие и видоспецифические повторы, сравнивая объединенные репитомы мужских и женских растений (мужские и женские последовательности H.lupulus с мужскими и женскими последовательностями H.japonicus). В настоящее время аналогичная работа ведется на третьем виде, Cannabis sativa.

В результате было выявлено 88 видоспецифичных кластеров для хмеля обыкновенного, и 10 видоспецифичных кластеров для хмеля японского.

На самые высококопийные кластеры были подобраны праймеры. Предварительные результаты ПЦР показали, что большая часть выявленных кластеров не является видоспецифичными и амплифицируется на всех геномах, однако ряд праймеров показывал специфичную амплификацию. На настоящий момент можно выделить три группы достоверно амплифицирующихся повторов – универсальные для семейства Cannabaceae (для обоих видов хмеля и для конопли); универсальные для рода Humulus и видоспецифичные для Humulus lupulus L. или Humulus japonicus L.

Работа продолжается, в настоящее время в сравнение добавлены сиквенсы репитома мужского и женского растения конопли. После проведенного сравнения трех видов планируется физическая локализация обнаруженных повторяющихся последовательностей на хромосомах, с последующим построением модели эволюции пола в данном семействе.

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

УДК 577.21

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ТРАНСКРИПТОМА РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ПРЯМОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РНК НА ПЛАТФОРМЕ OXFORD NANOPORE

А.И. Глушкевич, А.Н. Князев, И.А. Фесенко

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Современные технологии Oxford Nanopore позволяют проводить прямое секвенирование молекул нуклеиновых кислот. Такие методы нанопорового секвенирования основаны на измерении электрического сигнала в белковой поре при протягивании через них нативных молекул. Генерируемые сигналы переводят в нуклеотидные последовательности, причем в случае РНК секвенирования каждое прочтение соответствует одному полноразмерному транскрипту. Полученные результаты позволяют устанавливать экзон-интронную структуру каждой молекулы мРНК без дополнительной биоинформатической сборки и дает возможность определять длину 3`-полиА хвоста.

Недавнее использование прямого секвенирования РНК с помощью нанопор на модельном растении Arabidopsis thaliana позволило выявить 38 тысяч новых изоформ, слитые транскрипты, альтернативные сайты полиаденилирования и начала транскрипции [12]. Также было установлены и эпитранскриптомные изменения в виде метилирования аденина, которые происходят обычно в 3` некодирующей области и регулируют циркадные ритмы у Arabidopsis [8]. Однако, исследований транскриптомных изменений в процессе роста и развития растений до недавнего времени проведено не было.

Для изучение структуры транскриптома растений методом прямого секвенирования РНК на платформе Oxford Nanopore нами был выбран мох Physcomitrium patens (Hedw.) Mitt., который широко используется в молекулярно-биологических исследованиях. Геном этого растения секвенирован и аннотирован, что позволяет исключить сборку транскриптома de novo. Кроме того, простой жизненный цикл мха позволяет провести сравнительную характеристику структуры транскриптомов на разных этапах развития. Нами были получены растения на двух стадиях развития – протонемы и гаметофор, которые использованы в качестве вариантов исследований. Выделение тотальной РНК проводили с использованием TRIzol™ Reagent, чистую полиА фракцию РНК получали с помощью poly(A)Purist kit, ThermoFisher. Для секвенирования использовался прибор MinION (Oxford Nanopore) с рекомендуемыми ячейками FLO-MIN106 и наборами для приготовления библиотеки SQK-RNA002, позволяющими секвенировать непосредственно молекулы мРНК в направлении 3`-5`. В процессе пробоподготовки к молекулам матричной РНК на полиаделинированный конец лигируются адаптеры, синтезируется кДНК цепь SuperScript III обратной транскриптазой. Данный комплекс позволяет стабилизировать молекулу мРНК. На заключительном этапе к 3` концу РНК присоединяют адаптеры с моторными белками, которые обеспечивает направленное движение молекулы РНК через пору. Каждый эксперимент был выполнен в трех биологических повторах.

Полученные прочтения в виде fasta5 файлов были переведены в нуклеотидные последовательности программой Guppy 3.6.0, Oxford Nanopore Technologies. Выравнивания на геном осуществляли с использованием minimap2 [5], а обработку полученных результатов – samtools 1.9 [4] и bedtools [10]. Для анализа дифференциальной экспрессии применяли featureCounts [6] и пакет DESeq2 [7]. Экспрессию изоформ определяли с помощью FLAIR [11]. Для идентификации длины полиА хвоста использовался Nanopolish, а для визуализации результатов пакет NanoTail (https://github.com/smaegol/nanotail). Поиск модификаций оснований осуществляли с помощью Nanocompore [3]. Использованные скрипты и пайплайн обработки представленны на https://github.com/Liverworks/moss_nanopore.

Для каждой стадии развития было получено более 4 миллионов ридов, каждый из которых представлял отдельную единицу транскриптома. Среднее качество всех прочтений (q-score) составляло 8.7. В дальнейшем анализе использовались риды со средним качеством нуклеотида больше 7, которые составляли более 90 % всех полученных. Последующее выравнивание на геном Physcomitrella patens, сборка V3 [2] позволило локализовать 92 % ридов. Причем 13 % выравненных прочтений принадлежат неаннотированным областям генома. Было обнаружено 2200 новых локусов, что составляет 9 % от всех экспрессирующихся локусов.

Сравнение экспрессии аннотированных генов на стадии протонем и гаметофоров показывает глобальные различия между этими двумя жизненными формами на транскриптомном уровне (рис. 1). Анализ в терминах Gene Ontology показал, что в протонеме активнее гены, связанные с транскрипцией и трансляцией, рибосомальные белки. В гаметофорах выявлено увеличение экспрессии большого количества транскрипционных факторов.

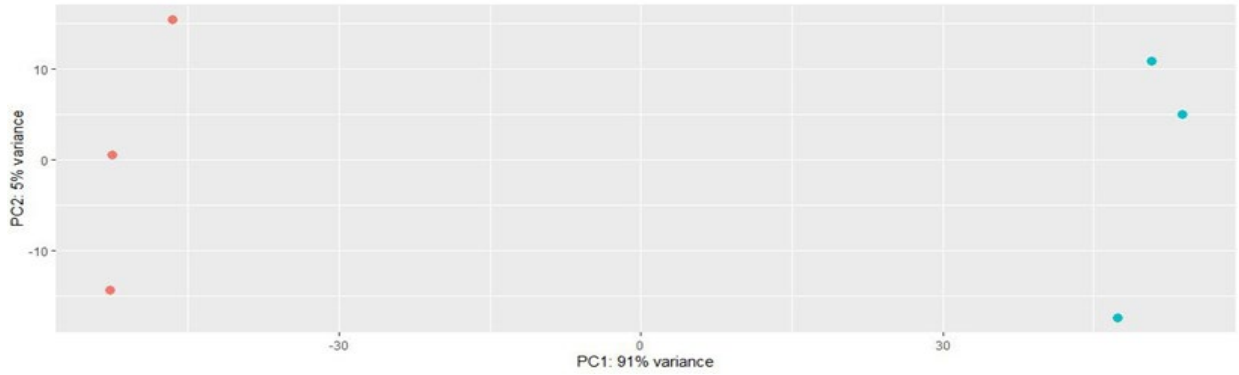


Рис. 1. PCA протонем и гаметофоров по экспрессии генов. Красными точками обозначены образцы гаметофоров, зелеными – протонем. В анализ включены все аннотированные гены

Существенные различия между двумя стадиями развития были установлены при идентификации конкретных изоформ и оценке их экспрессии. Именно благодаря уникальной технологии нанопрового секвенирования возможно определять всю последовательность мРНК одним прочтением и устанавливать соответствующую экзонную структуру (варианты сплайсинга). Всего было идентифицировано 37 000 различных транскриптов. Менее половины (14000) всех установленных транскриптов совпадают с существующими изоформами в аннотации. При этом из транскриптов, представленных в аннотации, более 90 % представлены как в гаметофорах, так и в протонемах. Многие из них экспрессируются с разной активностью и, как и при анализе экспрессии отдельных генов, показывают значительную разницу между двумя состояниями. В наших экспериментах удалось выявить транскрипты, которые содержали большое количество экзонов (например, 60 экзонов – локус Pp3c22_8910). Около половины изоформ из представленных в аннотации и около 35 % из всех транскриптов имеют более одного экзона. На рис. 2 представлены изоформы локуса Pp3c7_3990 (Chr07:2,476,701–2,482,165), в котором идентифицированные нами варианты сплайсинга не были предсказаны ранее.

а

б

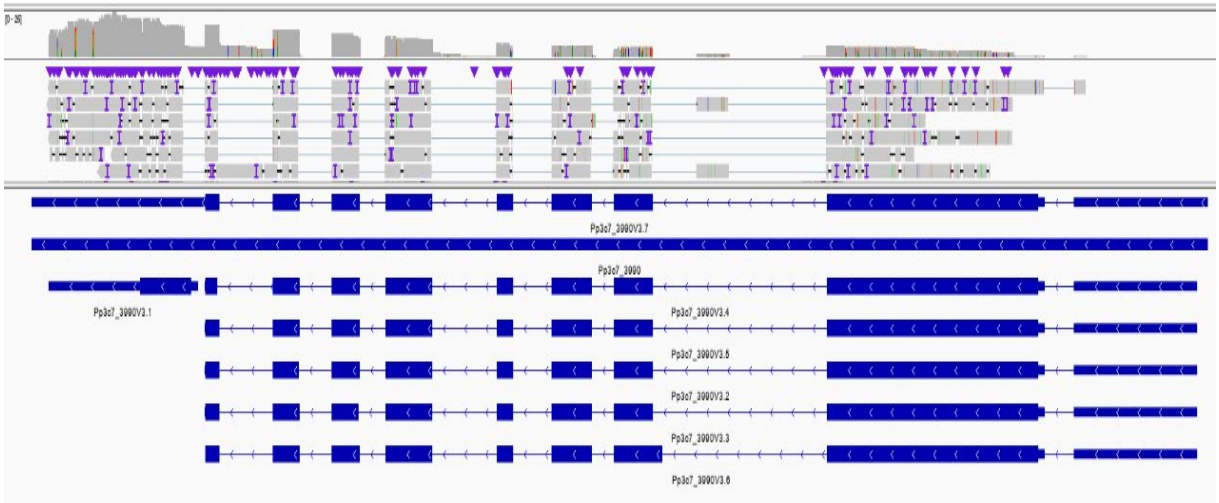


Рис. 2. Локус Pp3c7_3990 в геномном браузере IGV [9]. а) транскрипты, полученные в результате нанопорового секвенирования б) аннотация локуса с предсказанными изоформами

Несомненным преимуществом нанопрового секвенирования является возможность устанавливать длину 3` хвоста полиаденилированных молекул РНК. Нами установлена средняя длина полиА хвоста мРНК на стадиях гаметофор и протонемы в размере 70 нуклеотидов. При этом показана слабая отрицательная корреляция между средней длиной полиА хвоста транскриптов гена и количеством этих транскриптов (коэффициент корреляции Спирмена ρ = -0.205, p = 0.0). Подобную закономерность указывают и для Arabidopsis [8]. Сравнение результатов по каждому гену в отдельности позволило обнаружить достоверную разницу по длине полиА хвостов для 110 генов на разных стадиях развития. На рис. 3 представлен пример транскрипта, для которого длина полиА хвоста идентифицируется по двум пикам частоты и составляет 40 и 60 нуклеотидов. Причем представленность коротких 3`-концов значительно выше на стадии протонемы. Также интересно, что белковый продукт этого транскрипта имеет селективный сайт связывания с РНК [1].

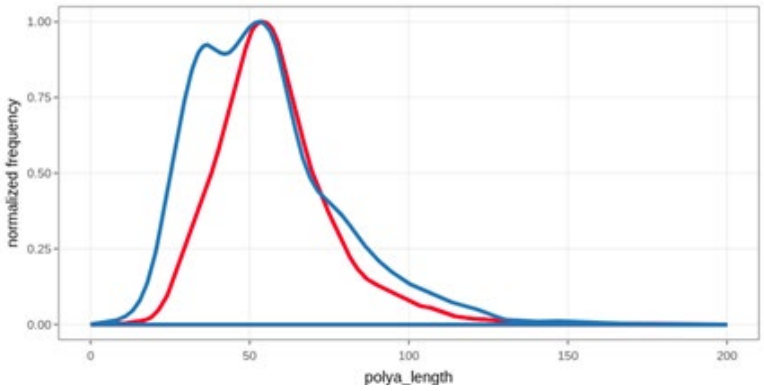


Рис. 3. Распределение длин полиА хвостов транскриптов гена Pp3c7_6560. Красным обозначены гаметофоры, синим – протонемы.

Нанопоровое секвенирование РНК у растений позволяет расширить возможности исследований транскриптома растений. В настоящем исследовании дана подробная характеристика транскриптома модельного растения Physcomitrium patens на двух стадиях жизненного цикла. Нами выявлены транскрибируемые участки генома, в том числе неаннотированные, и определены уровни их транскрипционной активности.

Найдены неизвестные транскрибируемые изоформы генов, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга. Установлены различия длин полиаденилированных 3` концов для ряда генов в зависимости от стадии развития растения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20–04–00938 А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goodstein D.M. [и др.]. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics // Nucleic Acids Research. 2012. № D1 (40). С. D1178-D1186.
2. Lang D. [и др.]. The Physcomitrella patens chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution // The Plant Journal. 2018. № 3 (93). С. 515–533.
3. Leger A. [и др.]. Genomics. RNA modifications detection by comparative Nanopore direct RNA sequencing. 2019.
4. Li H. [и др.]. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools // Bioinformatics. 2009. № 16 (25). С. 2078–2079.
5. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences // Bioinformatics. 2018. № 18 (34). С. 3094–3100.
6. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // Bioinformatics. 2014. № 7 (30). С. 923–930.
7. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biology. 2014. № 12 (15). С. 550.
8. Parker M.T. [и др.]. Nanopore direct RNA sequencing maps the complexity of Arabidopsis mRNA processing and m6A modification // eLife. 2020. (9). С. e49658.
9. Robinson J.T. [и др.]. Integrative genomics viewer // Nature Biotechnology. 2011. № 1 (29). С. 24–26.
10. Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features // Bioinformatics. 2010. № 6 (26). С. 841–842.
11. Tang A.D. [и др.]. Full-length transcript characterization of SF3B1 mutation in chronic lymphocytic leukemia reveals downregulation of retained introns // Nature Communications. 2020. № 1 (11). С. 1438.
12. Zhang S. [и др.]. New insights into Arabidopsis transcriptome complexity revealed by direct sequencing of native RNAs // Nucleic Acids Research. 2020. С. gkaa588.

УДК 577

РЕТРОТРАНСКРИПТОМ РАСТЕНИЙ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ И МАСШТАБЫ

М.Р. Омаров, П.Ю. Меркулов, С.А. Гварамия, Е.И. Колганова, И.В. Киров

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

Ретротранспозоны (РТ) занимают значительную часть растительных геномов. Наиболее распространенный класс мобильных элементов у растений – LTR-ретротранспозоны. Несмотря на их вклад в эволюцию геномов, экспрессия и мобильность РТ в клетке находятся под строгим контролем различных эпигенетических систем сайленсинга. Долгое время считалось, что экспрессия мобильных элементов, за исключением единичных случаев, практически полностью подавлена в соматических клетках при нормальных условиях и проявляется лишь в генеративных клетках, клетках эндосперма и в ответ на стресс [1]. Но работы нескольких последних лет, показавшие присутствие большого числа транскриптов, имеющих сходство к РТ в не стрессовых условиях, поставили под сомнение сложившуюся парадигму [2, 3]. Однако масштаб, а также закономерности геномной организации и транскрипции РТ в растительных клетках и её связи с мобильностью остаются неизученными. **Целью** нашей работы стало проведение полногеномного анализа экспрессии LTR-ретротранспозонов в геномах семи различных видов растений при нормальных и стрессовых условиях, а также выявление особенностей геномной организации экспрессирующихся РТ. В связи с высокой копийностью РТ в геноме, существует ряд сложностей в аннотации и анализе транскрипции РТ в масштабах генома [4]. Для решения этой задачи был разработан специальный алгоритм для обнаружения экспрессирующихся РТ.

Данные секвенирования РНК (RNA-seq) для 7 видов растений (Helianthus annuus, Arabidopsis thaliana, Physcomitrella patens, Brachypodium distachyon, Glycine max, Oryza sativa и Vitis vinifera) были загружены с базы Sequence Read Archive NCBI (SRA). Мы использовали инструменты LTRdigest [5] и LTRharvest [6] для предсказания LTR-ретротранспозонов в геномах de novo. Прочтения RNA-seq были картированы на геномы использованием HiSat2 [7]. Сборка транскриптов была произведена программой StringTie2 [8]. Инструменты bedtools [9] и samtools [10] применялись для расчета покрытия РТ и промежуточных операций с файлами формата sam, bam соответственно. Эти инструменты и набор собственных программ на языках Python 3 и R были реализованы в новом алгоритме. Статистическая обработка, а также визуализация полученных результатов проводилась в специализированной среде разработки RStudio.

Мы применили разработанный алгоритм для 7 видов растений и обнаружили десятки (до 105 у Vitis vinifera) транскрипционно активных ретротранспозонов в соматических клетках при нормальных и стрессовых условиях во всех исследуемых видах. Таким образом, наши результаты показывают, что некоторые ретротранспозоны повсеместно экспрессируются в растениях при отсутствии стресса и масштабы их экспрессии могут быть различны у разных видов. Для определения особенностей геномной организации экпрессирующихся РТ был проведён биоинформатический анализ РТ в геноме подсолнечника, в котором мы предсказали около 35 тысяч LTR-РТ. Далее с помощью разработанного алгоритма было отобрано 44 экспрессирующихся на высоком уровне хотя бы в одном из 13 образцов (различные органы, условия стресса) мобильных элемента. Биоинформатические результаты были подтверждены с помощью ОТ-ПЦР с праймерами, подобранными на канонические белковые домены РТ. Затем, используя различные подходы, мы обнаружили некоторые существенные различия между транскрибирующимися и транскрипционно неактивными РТ. Мы выявили, что экспрессирующиеся РТ:

Обладают более длинными потенциальными открытыми рамками считывания.

Чаще располагаются близко к генам.

Имеют больший потенциал запускать транскрипцию соседних участков.

Относительное недавно вставились в геном (более «молодые» копии).

Чаще кодируют белок оболочки GAG с РНК-связывающим мотивом.

Кроме того, в ходе исследования был обнаружен ретротранспозон, демонстрирующий достаточно сильную транскрипцию во всех исследуемых образцах, названный Tyran.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-2360.2019.4

ЛИТЕРАТУРА

1. Slotkin K.R, Vaughn M., Borges F., Tanurdžić M., Becker J.D., Feijó J.A, Martienssen R.A. (2009) Epigenetic Reprogramming and Small RNA Silencing of Transposable Elements in Pollen. Cell. 136(3): 461–472
2. Oberlin S., et al. (2017) A genome-wide transcriptome and translatome analysis of Arabidopsis transposons identifies a unique and conserved genome expression strategy fot Ty1/Copia retroelements. Genome Res. 27: 1549–1562.
3. Guffanti G., et al. (2018) Novel Bioinformatics Approach Identifies Transcriptional Profiles of Lineage-Specific Transposable Elements at Distinct Loci in the Human Dorsolateral Prefrontal Cortex / // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – 2435–2453 p.
4. Shadid S., Slotkin K.R. (2020) The current revolution in transposable element biology enabled by long reads. Current Opinion in Plant Biology. 54: 49–56
5. Steinbiss S, Willhoeft U, Gremme G, Kurtz S. (2009) Fine-grained annotation and classification of de novo predicted LTR retrotransposons. Nucleic Acids Research. 37(21): 7002–7013
6. Ellinghaus D., Kurtz S. & Willhoeft U. (2008) LTRharvest, an efficient and flexible software for de novo detection of LTR retrotransposons. BMC Bioinformatics. 9(18)
7. Kim D., Paggi J.M., Park C., Bennet C., Salzberg S.L. (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nat Biotechnol. 37: 907–915
8. Kovaka, S. et al. (2019) Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. Genome Biol. 20 (278)
9. Quinlan A.R., et al.. (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics. 26(6): 841–842
10. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., (2009) The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. Bioinformatics. 25(16): 2078

УДК 575.18, 634.742

АНАЛИЗ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ И РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ SHEPHERDIA ARGENTEA (PURSH) NUTT

К.Д. Боне[1,2], О.В. Разумова[2], И.В. Киров[2], Г.И. Карлов[2]

[1] Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия
[2] ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

Шефердия серебристая (Shepherdia arg.) – это двудомное растение семейства Elaeagnaceae, близкий родственник облепихи, родиной которой является Северная Америка. Широко используемое растение в традиционной медицине. В ягодах шефердии серебристой содержится высокое количество витамина С, каротина, катехинов. Среди экономически значимых признаков шефердии, можно отметить такие признаки, как способность обогащать почву азотом, благодаря наличию азотфиксирующих бактерий на корнях.

В нашей работе мы провели секвенирование двух растений Shepherdia с последующей аннотацией репитома. Тандемные повторы и мобильные элементы, включая как транспозоны ДНК, так и ретротранспозоны, были идентифицированы, классифицированы, а также предсказано их количество в геноме. Сравнительный анализ повтора мужского и дополнительного растения Shepherdia с неизвестным полом выявил различия в нескольких повторах. С полученными Illumina сиквенсами двух растений Shepherdia провели кластеризацию с помощью программы RepeatExplorer. При этом были обнаружены тандемные повторы и ретротранспозоны. Более глубокий биоинформатический анализ и аннотирование повторов ДНК мужского и неизвестного пола растений шефердий выявили 8 и 7 сателлитных повторов соответственно. Среди ретротранспозонов Ty1/Copia мы обнаружили пятнадцать кластеров, соответствующих подсемействам Ale, двенадцать кластеров, соответствующих подсемействам Angela/Tork, три кластера, соответствующих подсемействам TAR, семь кластеров, соответствующих подсемействам Ivana, и два кластера, соответствующих подсемействам SIRE. Среди ретроспозонов Ty3/Gypsy мы обнаружили одиннадцать подсемейств Athila, три подсемейства Tekay, одно подсемейство Galadriel, четыре подсемейства CRM и шестьдесят подсемейств Reina. Эти данные позволили нам построить филогенетическое дерево на основе Ty1/Copia и Ty3/Gypsy.

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

ЛИТЕРАТУРА:

Fastqc Version 0.11.8: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
Bolger, A.M.,. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics, btu170.
Novak, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., Macas, J. (2013) – RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next generation sequence reads. Bioinformatics 29:792–793.
Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." Genome Res. 7:649–656. PubMed.

УДК 577.151.4:615.276

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ МОДЕЛЕЙ ФЕРМЕНТОВ ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КАК МИШЕНЕЙ ДЛЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Н.В. Гроза*, В.Н. Егорычева*, А.В. Веселовский**, И.В. Иванов*

**МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия*
***НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия*

Липоксигеназы (LOXs) в организме человека участвуют в окислении полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и, вместе с эпоксиоксигеназами цитохром Р450-зависимого пути и циклооксигеназами (COXs), ответственны за синтез различных липидных медиаторов (эйкозаноидов), которые вовлечены во многие паталогии человека: воспаление, сердечно-сосудистые, почечные заболевания, развитие различных типов опухолей [1]. ПНЖК являются длинноцепными гидрофобными молекулами, которые этерифицированы в глицерофосфолипиды мембран эукариотических клеток. Высвобождаясь из мембран клеток при активации фермента фосфолипазы А2, ПНЖК выступают предшественниками многочисленных оксигенированных липидных производных со специфической биологической активностью. Многие из этих медиаторов, включая "классические" эйкозаноиды, простаноиды и лейкотриены, образуются в результате реакций биотрансформации арахидоновой и линолевой кислот (первичных субстратов), и имеют ярко выраженный провоспалительный характер. Молекулярный докинг аналогов природных субстратов (лигандов) в различные терапевтические мишени каскада арахидоновой кислоты представляет интерес для изучения молекулярных основ возникновения и развития различных патологий и методов борьбы с ними.

В ходе работы с применением методов молекулярного докинга были построены следующие структурные модели взаимодействия человеческой 15-липоксигеназы-2 (h15-LOX-2): со сложными эфирами линолевой кислоты (ЛК) и олеиновой кислоты (ОК) тимола и пропофола; с мембранотропными производными (сложными эфирами ЛК и ОК) полифенолов (ресвератрола и пиносильвина). Также были построены модели взаимодействия человеческой циклооксигеназы-2 (hCOX-2) с этерифицированной линолевой кислотой в составе лизофосфолипидов, характерных для мембран эукариот. Для расчета и построения структурных 3D моделей «фермент-лиганд» были использованы программные продукты: Sybyl-X 2.1.1; AutoDockTools; AutoDockVina и PyMOL.

В качестве исходных праметров для докинга использовали опубликованные данные рентгеноструктурного анализа липоксигеназы. Кристаллическая структура h15-LOX-2 предполагает U-образный субстрат-связывающий канал, дно которого определяется аминокислотными остатками. Для h15-LOX-2 этими аминокислотами являются Phe365, Ser430, Ala606 (детерминанты Джисака). Стенки субстрат-связывающего кармана h15-LOX-2 выстланы гидрофобными остатками, за исключением двух полярных боковых цепей Glu369 и Asp602. Гидрофобный карман активного сайта h15-LOX-2 образован следующими аминокислотами: Phe184, Ala188, Glu369, Leu374, Ile412, Ala416, Leu420, Val426, Val427, Val603, Ala606, Leu609, Leu610. Ядро активного сайта h15-LOX-2 расположено в С-каталитическом домене и содержит негемовое Fe^{3}+, координированное His373, His378, His553, Ile676 и двумя молекулами воды.

Анализ полученных нами моделей показал, что данные лиганды проявляют сродство к активным сайтам ферментов окисления липидов, а комплексы фермент-лиганд стабилизируются гидрофобными контактами. Однако, в случае сложных эфиров тимола и пропофола с алифатической цепью, каталитическая реакция типа «фермент-субстрат» неосуществима, что открывает перспективу для биологических исследований этих соединений как возможных конкурентных ингибиторов ферментов окислительного каскада ПНЖК.

Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0706–2020–0019).

ЛИТЕРАТУРА

1. Lagarde, Michel Oxygenated metabolism of PUFA: Analysis and biological relevance / Michel Lagarde, Anna Nicolaou // Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and cell biology of lipids – 2015. – Vol. 1851, № 4. – P. 307.

УДК 640

СБОРКА DE-NOVO И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ШТАММОВ BACILLUS PUMILUS – ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Д.С. Пудова, А.А. Тойменцева, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Протеиназы являются универсальными гидролитическими ферментами, которые благодаря повсеместному распространению, устойчивости к различным условиям среды и широкой субстратной специфичности, находят применение в медицине, пищевой промышленности и биотехнологии. Штамм Bacillus pumilus 7P был идентифицирован как продуцент рибонуклеазы и различных внеклеточных протеиназ. Для получения суперпродуцента промышленно важных ферментов штамм 7P культивировали на среде с антибиотиками. Полученный при этом штамм 3–19, устойчивый к стрептомицину, приобрел способность к повышенному синтезу гидролитических ферментов, в том числе и протеиназ. Целью данной работы является полная сборка, аннотация и сравнение геномов двух штаммов.

Полногеномное секвенирование штаммов B. pumilus 3–19 и 7P проводили на платформах Ion Torrent, 454 GS Junior и Oxford Nanopore MiniION, что обеспечило общее покрытие геномов в 50x (для 3–19) и 42x (для 7P). Сборку генома проводили с использованием геномного ассемблера SPAdes v. 3.12.0, качество сборки проверяли с помощью программы QUAST 2.3. В результате были получены полные сборки геномов, каждый длиной 3.61 Мб, которые депонировали в базу данных NCBI под номерами CP054310.1 для штамма 3–19 и CP058911.1 для штамма 7P. Для подтверждения филогенетической принадлежности штаммов рассчитывали значение средней нуклеотидной идентичности (ANI) между анализируемыми геномами и 12 закольцованными геномами других штаммов B. pumilus, доступных в базе данных NCBI. Исследуемые штаммы показали максимальное значение идентичности (98,5 %) со штаммами B. pumilus ZB201701 и PDSLzg-1. Аннотацию генома проводили, используя программу Prokka 1.11. Наличие в геномах штаммов генов протеолитических ферментов устанавливали с помощью базы данных MEROPS. В результате в геномах было найдено по 143 гена протеиназ, среди которых 12 генов кодируют внеклеточные ферменты. Потенциал штаммов, по продукции антибиотиков и вторичных метаболитов, определяли, используя сервер antiSMASH. В геномах было идентифицировано по 3 кластера генов для терпеноид-подобных веществ, кластеры биосинтеза микроцина и бактериоцина, которые обладают значительными антибиотическими свойствами. Для поиска уникальных для штамма 3–19 мутаций проводили полногеномное выравнивание геномов двух штаммов. С помощью программы SNPEff v. 4.3 было идентифицировано 20 радикальных нуклеотидных замен (SNP) в геноме штамма 3–19. Среди них обнаружены мутация в 56 кодоне гена rpsL, кодирующего белок S12 30S рибосомы, которая, вероятно, является причиной устойчивости штамма 3–19 к стрептомицину. Кроме того, мутации в генах rpoB, кодирующем РНК-полимеразу, и nusA, кодирующим фактор терминации транскрипции Rho, могут быть связаны с повышенной активностью ферментов.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ № 19–08–00853 (А).

УДК 573.2: 577.15

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ЛИПОКСИГЕНАЗНОГО КАСКАДА

С.С. Горина, Я.Ю. Топоркова

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Липоксигеназы (ЛОГ) [ЕС 1.13.11.12] представляют собой обширное семейство негемовых железосодержащих белков, которые широко распространены в аэробных организмах: грибах, растениях и животных [1, 2]. ЛОГ катализируют регио- и стереоспецифическое диоксигенирование полиеновых жирных кислот, содержащих (1Z, 4Z) – пентадиеновую систему в своей структуре [3]. Превращение полиеновых жирных кислот в растениях, происходящее при участии липоксигеназ и последующие реакции, в совокупности получили название липоксигеназного каскада [4, 5]. Основными субстратами для ЛОГ в растениях являются линолевая и альфа-линоленовые кислоты, метаболизирующиеся с образованием соответствующих гидроперекисей (Рис. 1), которые в дальнейшем выступают субстратами, по меньшей мере, для семи различных ферментов (пероксигеназ (ПОГ), редуктаз, алленоксидсинтаз (АОС), гидропероксидлиаз (ГПЛ), дивинилэфирсинтаз (ДЭС), эпоксиалкогольсинтаз (ЭАС)), в том числе самих ЛОГ [6]. Благодаря такому разнообразию ферментов, метаболизирующих гидроперекиси жирных кислот, липоксигеназный каскад распадается на семь различных ветвей, приводящих к образованию различных продуктов. АОС, ГПЛ, ДЭС и ЭАС образуют клан CYP74 неклассических цитохромов P450.

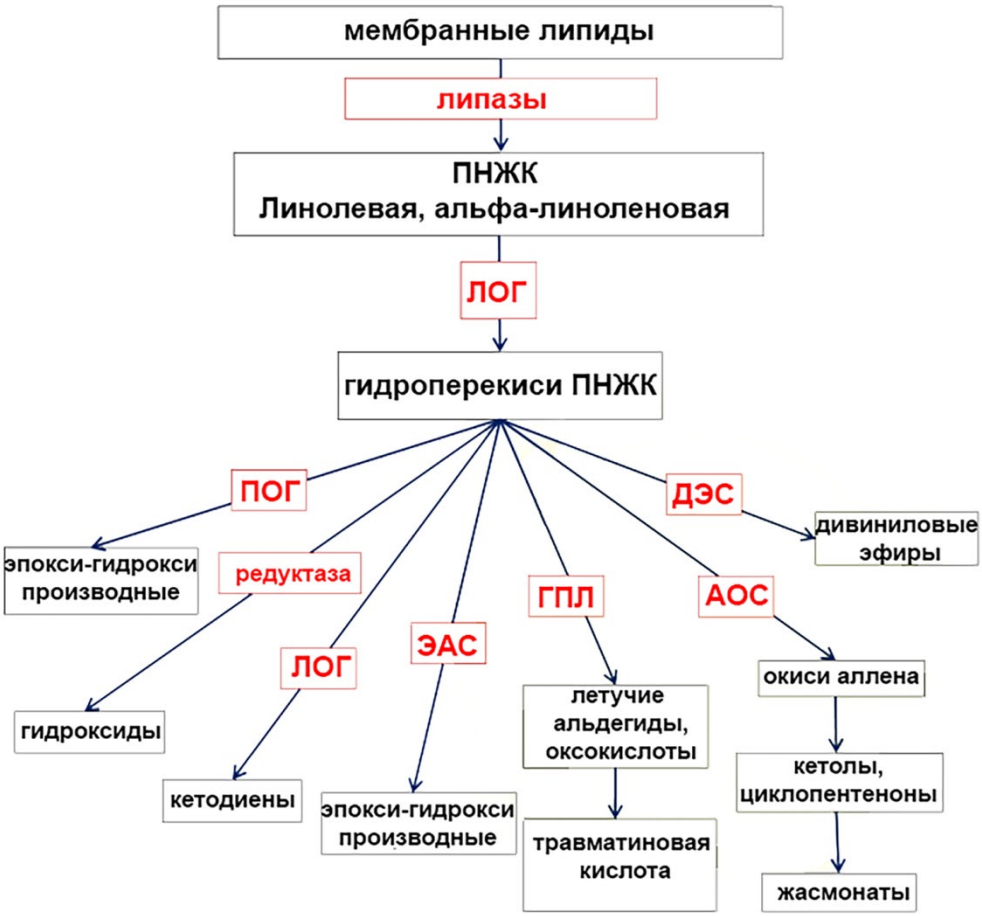


Рисунок 1. Схема превращений ПНЖК в растениях [10]. Красным цветом обозначены ферменты, черным цветом обозначены синтезируемые метаболиты.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

Отличительной особенностью ферментов CYP74 от монооксигеназ является отсутствие необходимости в молекулярном кислороде и восстановительных партнерах для протекания реакции; гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) выступают в качестве субстрата и донора кислорода [7, 8]. Синтезируемый в результате совместного действия ЛОГ и ферментов CYP74 широкий спектр метаболитов (гидроперокси-, гидрокси-, оксо- и эпокси-производные жирных кислот, дивиниловых эфиров, летучих альдегидов) (Рис. 1) задействован в процессах роста и развития растений, в ответных реакциях на механическое повреждение, воздействие патогенов и факторов окружающей среды, таким образом участвуя в поддержании гомеостаза [9, 10].

Долгое время ферменты CYP74 обнаруживались только в высших растениях, однако в 2008 году они были описаны у метилобактерий и ланцетника [11]. В ходе наших исследований ферменты клана CYP74 были обнаружены у представителей споровых растений [12], бурых водорослей [13], кишечнополостных [8], была проведена характеристика их каталитических свойств. Целью данного исследования является сравнительный биоинформационный анализ представителей ферментов CYP74 растений и не растительных организмов. В качестве объектов исследований выступали представители ферментов CYP74 Solanum tuberosum, Physcomitrella patens, Asparagus officinalis, Nematostella vectensis, а также предполагаемые ферменты CYP74 Dendronephthya gigantea и Acropora millepora.

Для выявления закономерностей доменной организации и последующего филогенетического анализа было проведено выравнивание первичных последовательностей целевых ферментов. Установлено, что предполагаемый фермент CYP74 A. officinalis, наряду с референсными последовательностями ферментов CYP74 S. tuberosum, P. patens, N. vectensis, обладает классическим расположением доменов и аминокислотных мотивов: «F/L toggle», гидропероксид-связывающий домен (ГСД), мотивы **E**TL**R** и P(E/D) **R**F, которые формируют так называемую ERR-триаду, а также аминокислотным остатком цистеина в гем-связывающем кармане. На рисунке 2а представлено Logo, формируемое последовательностями целевых ферментов.

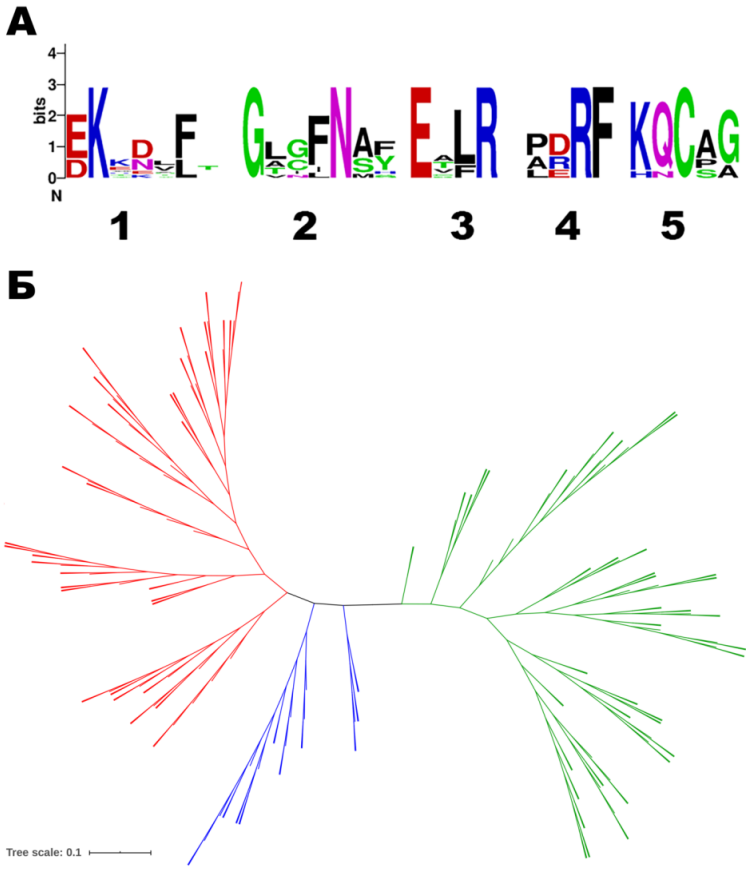


Рисунок 2. А) Logo основных аминокислотных мотивов, формируемое целевыми последовательностями ферментов: 1 – «F/L toggle», 2 – ГСД, 3 – мотив ETLR, 4 – мотив P(E/D) RF, 5 – аминокислотный остаток цистеина в гем-связывающем кармане и его окружение. Б) Филогенетическое древо ферментов CYP74 растений (красные линии), ферментов относящихся к клану CYP74 не растительных организмов (синие линии) и каталазо-подобных AOC (зеленые линии) обнаруженных в базе данных NCBI

В отличие от фермента A. officinalis, ферменты D. gigantea и A.millepora, не показали наличия структур, характерных для ферментов CYP74 и цитохромов P450. В структуре этих белков обнаружились 3 домена: домен, относящийся к белкам семейства каталаз, PLAT-домен и липоксигеназный домен. Ферменты с подобной организацией белковых молекул были выявлены у представителей коралловых полипов, таких как Plexaura homomalla [14]. Их каталитическая активность приводит к биосинтезу соединений подобных продуктам AOC, поэтому данные ферменты были обозначены как каталазо-подобные алленоксидсинтазы.

Проведенные филогенетические исследования также указывают на принадлежность фермента A. officinalis к семейству CYP74, тогда как ферменты D. gigantea и A. millepora, группируются с каталазо-подобными ферментами (Рис. 2б).

Для визуализации предполагаемой структуры обнаруженного фермента CYP74 A. officinalis, а также ранее охарактеризованного нами фермента CYP74 N. vectensis (NvEAS), было проведено гомологичное моделирование на основе установленной кристаллической структуры АОС арабидопсиса (AtAOS) [11] (Рис. 3а). Установлено, что общая топология третичной структуры целевых ферментов, относительно расшифрованной структуры AtAOS, сохраняется. На рисунке 3б показан результат молекулярного докинга с субстратом – 13-гидроперекисью альфа-линоленовой кислоты (13-ГПОТ). Конформация активного центра целевых белков сохранена, цистеиновая тиолатная группа способна образовывать связь с железом гема; расположение аминокислотных остатков ГСД целевых белков совпадает с таковым расположением у AtAOS.

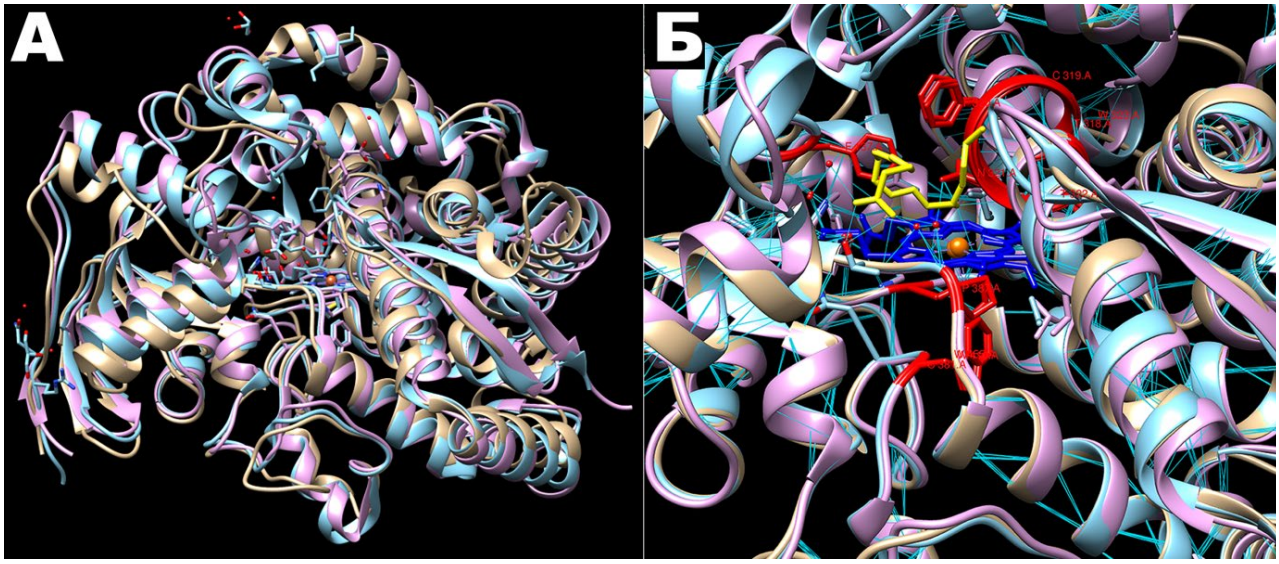


Рисунок 3. А) Результат наложения третичных структур фермента CYP74 A. officinalis (сиреневый) и NvEAS (светло-коричневый) относительно расшифрованной структуры AtAOS (голубой), Б) Активный центр после молекулярного докинга с субстратом 13-ГПОТ. Желтым цветом обозначен субстрат, синем цветом обозначен гем, красным окрашены основные аминокислотные остатки, взаимодействующие с субстратом и гемом, голубыми линиями указаны водородные связи.

Таким образом, в результате биоинформационного анализа проведенного на основе ферментов CYP74 S. tuberosum, P. patens, N. vectensis с ранее установленными каталитическими свойствами, было показано, что анализируемый фермент A. officinalis также принадлежит к представителям ферментов CYP74, тогда как анализируемые ферменты D. gigantea и A.millepora обладают структурой, характерной для каталазо-подобных алленоксидсинтаз.

Работы по поиску первичных последовательностей ферментов, в том числе ферментов CYP74 S. tuberosum, P. patens, а также по созданию аминокислотной базы данных проводились при финансовой поддержке гранта МК-903.2020.4. Эксперименты по фолдингу белковых молекул и молекулярному докингу проводились при финансовой поддержке гранта РФФИ 20–04–01069-а. Филогенетические исследования ферментов CYP74 проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".

ЛИТЕРАТУРА

[1] Brash A.R. J Biol Chem. 1999 Aug 20; 274(34):23679–82. doi: 10.1074/jbc.274.34.23679.
[2] Grechkin A.N. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. Prog Lipid Res. 1998 Nov; 37(5):317–52. doi: 10.1016/s0163–7827(98)00014–9.
[3] Feussner I., Kühn H. Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. In Enzymes in Lipid Modification, ed. U.T. Bornscheuer. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000, pp. 309–336.
[4] Andre E., Hou K. 1932. Sur la présence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja, Glycine soja Lieb. Compt. Rend. Acad. Sci. 194: 645–647.
[5] Gardner H.W. Lipoxygenase pathway in cereals, in: Advances in Cereal Science and Technology, Y. Pomeranz, ed., 1988. Vol. 9, pp 161–215.
[6] Feussner I., Wasternack C. The Lipoxygenase pathway. Annual Review of Plant Biology. 2002. V. 53. P. 275–297.
[7] Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. Phytochemistry. 2009. V. 70. P. 1522–1531.
[8] Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova .FK., 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 Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2017 Oct; 1862 (10 Pt A):1099–1109. doi: 10.1016/j.bbalip.2017.07.015.
[9] Wasternack C., Feussner I. The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function Annu Rev Plant Biol. 2018 Apr 29; 69:363–386. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817–040440.
[10] Vincenti S., Mariani M., Alberti J. – C., Jacopini S., Brunini-Bronzini de Caraffa V., Berti L., Maury J. Biocatalytic Synthesis of Natural Green Leaf Volatiles Using the Lipoxygenase Metabolic Pathway. Catalysts 2019, 9, 873.
[11] Lee D.S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes Nature. 2008 Sep 18; 455(7211):363–8. doi: 10.1038/nature07307.
[12] Gorina S.S., Toporkova Y.Y., Mukhtarova L.S., Smirnova E.O., Chechetkin I.R., Khairutdinov B.I., Gogolev Y.V., Grechkin A.N. Oxylipin biosynthesis in spikemoss Selaginella moellendorffii: Molecular cloning and identification of divinyl ether synthases CYP74M1 and CYP74M3. Biochim Biophys Acta. 2016 Apr; 1861(4):301–9. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.01.001.
[13] Toporkova Y.Y., Fatykhova V.S., Gogolev Y.V., Khairutdinov B.I., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Epoxyalcohol synthase of Ectocarpus siliculosus. First CYP74-related enzyme of oxylipin biosynthesis in brown algae Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2017 Feb; 1862(2):167–175. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.11.007.
[14] Boeglin W.E., Brash A.R. Cytochrome P450-type Hydroxylation and Epoxidation in a Tyrosine-liganded Hemoprotein, Catalase-related Allene Oxide Synthase J Biol Chem. 2012 Jul 13; 287(29):24139–47. doi: 10.1074/jbc. M112.364216.

УДК 640

NANOTRF: ПРОГРАММА ДЛЯ DE NOVO ПОИСКА ВЫСОКОКОПИЙНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ В ДАННЫХ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК РАСТЕНИЙ

Е.И. Колганова, И.В. Киров

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

Высококопийные тандемно организованные повторы (ТП) могут занимать значительную часть (до 30 %) генома растений. В большинстве случаев они локализованы в (пери) центромерной и (суб) теломерной областях генома и участвуют в структурной организации генома, делении клеток, а также могут кодировать РНК. Функции, происхождение, эволюция и геномная организация ТП слабо изучены. Одной из главных причин этого является сложность сборки полноразмерных кластеров ТП в геноме из коротких ридов, что приводит к сильному уменьшению размера кластера ТП и искажению реального сиквенса. Новым инструментом в секвенировании генома является нанопоровое секвенирование (ONP), которое позволяет получить достаточно протяжённые риды, длина которых ограничена длиной выделенных молекул ДНК и может достигать нескольких сотен тысяч пар нуклеотидов. Число видов растений, для которых выкладываются в свободный доступ данные ONP, растёт в геометрической прогрессии. Однако, из-за высокого процента ошибок секвенирования использование таких данных для прямого поиска ТП обычными инструментами (например, Tandem Repeat Finder, (Benson, 1999)) невозможно.

В данной работе мы разработали специальный подход, названный nanoTRF, который позволяет найти высококопийные ТП, рассчитать их копийность в геноме и собрать их консенсусные последовательности для последующего анализа (например, с помощью FISH). NanoTRF состоит из нескольких модулей и получает первичные данные по ТП в каждом риде ONP с помощью недавно опубликованной программы, TideHunter (Gao et al., 2019). BLAST – модуль проводит реципрокное сравнение всех найденных тандемных повторов в ONP ридах и генерирует таблицу пар схожих ТП. Далее с помощью Louvain-модуля проводится кластеризация всех повторов на основе Лувенского метода (Louvain Method). Filtering – модуль, предназначенный для выбраковки тандемных повторов, и Consensus – модуль для построения консенсуса на основе массива выровненных последовательностей.

В качестве входных данных для запуска nanoTRF требуются данные полногеномного секвенирования Oxford Nanopore Technologies (ONT) в формате FASTQ или FASTA.

Успешность работы инструмента была доказана на данных нанопорового секвенирования Deschampsia antarctica. Используя nanoTRF, нами были идентифицированы более 40 ТП и получены их сиквенсы. Ранее в работах по изучению генома данного вида были обнаружены 14 высококопийных тандемных повторов с применением инструмента TAREAN (Novák et al., 2017, González et al., 2018). Мы сравнили обнаруженные ранее тандемные повторы с теми, которые были собраны nanoTRF. Результаты показывают высокую корреляцию между нашими данными и данными TAREAN по числу копий в геноме индивидуальных повторов. Кроме этого, нам удалось выявить 13 новых ТП, чья геномная организация ещё не изучена

Таким образом, nanoTRF позволяет точно определять высококопийные ТП в «сырых» данных ONP и позволит в дальнейшем существенно увеличить число новых ТП и расширить наши знания об их организации и эволюции. NanoTRF доступен по ссылке: https://github.com/Kirovez/nanoTRF.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ грант № 17–00–00336).

ЛИТЕРАТУРА

1. Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences / G. Benson // Nucleic Acids Research. – 1999. – Vol. 27 – Issue 2. – pp. 573–580
2. Gao, Y. TideHunter: efficient and sensitive tandem repeat detection from noisy long-reads using seed-and-chain / Y. Gao, B. Liu, Y. Wang, Y. Xing // Bioinformatics. – 2019. – Vol. 35. – Issue 14. – pp. i200-i207
3. González, M.L. Characterization of some satellite DNA families in Deschampsia antarctica (Poaceae) / M.L. González, J.O. Chiapella, J.D. Urdampilleta // Polar Biology. – 2018. – Vol. 41. – Issue 3. – pp. 457–468
4. Novák, P. TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads / P. Novák, L.A. Robledillo, A. Koblížková, I. Vrbová, P. Neumann, J. Macas // Nucleic Acids Research. – 2017. – Vol. 45. – Issue 12. – P. e111

УДК 579.25

ПОЛНОГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ И БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ PASTEURELLA MULTOCIDA

А.О. Амиргазин, К.К. Муканов, М.А. Куйбагаров, Т.Б. Карибаев, Е.М. Раманкулов, А.Б. Шевцов

РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии», Нур-Султан, Казахстан

В Казахстане пастереллёз является эндемичной инфекцией, со спорадическими случаями среди домашних животных и пандемическими вспышками среди популяций сайги. Целью данной работы было изучить генотипы P. multocida приводящие к острой геморрагической септицемии домашних животных.

В работе были использованы три изолята P. multocida депонированные в коллекции РГП на ПХВ «Национальный референтный центр по ветеринарии» КВКиН МСХ РК. Изоляты P-mult-5-KZ, P-mult-15-KZ и P-mult-10-KZ были выделены в 2006, 2015 и 2013 годах, в Костанайской, Алматинской и Восточно-Казахстанской областях, из патологического материала двух лошадей и КРС, соответственно. ДНК выделяли с использованием набора «QIAamp DNA Mini Kit» QIAGEN (США). Приготовление библиотек ДНК осуществлялось с использованием набора Nextera XT DNA Library Prep Kit, согласно инструкции производителя. Секвенирование проводилось с использованием Reagent Kit v3 (600-циклов) на платформе MiSeq. Контроль качества полученных прочтений оценивалось в программе FastQC v0.11.9, с последующей обрезкой от низкокачественных данных используя плагин BBDuk trimmer v1.0 до значений Q30. Полученные прочтения были собраны de novo используя Skesa v2.3.0 [1]. Идентификация капсульных и липополисахаридных локусов проводилось сравнением в BLAST+ v2.9.0 и подтверждено мультиплексной ПЦР [2, 3]. Идентификация сиквенс типов было проведено на ресурсе PubMLST [4]. Аннотирование геномов проводилось с использованием веб-сервиса RASTtk [5]. Все упомянутые программы использовались со стандартными настройками.

Характеристики сборки и аннотирования секвенированных геномов представлены в таблице 1. Согласно результатам генотипирования все изоляты имеют генотип B:L2:multihost ST64, что согласуется с данными описанными ранее в работе Орынбаева с соавторами [6]. Поэтому можно судить о том, что для территории Казахстана характерен именно данный генотип. Интересным также является то, что оба штамма выделенные от лошади (ранее не доступные) проявляют сходство в длине генома и количестве генов, несмотря на дальнее географическое расположение и год выделения. Полногеномные данные были депонированы в базу данных NCBI под номерами: JAAILE000000000, JAAILE000000000 и JAAILE000000000.

Таблица 1 – Характеристики сборки и аннотирования секвенированных геномов.

Изолят	Кол-во прочтений	Размер генома (bp)	Кол-во контигов	Средняя глубина	N_{50}	GC (%)	Кол-во генов (CDCs)
P-mult-5-KZ	318693	2,256,412	29	32.69	237,868	40.28	2141
P-mult-10-KZ	365028	2,300,365	30	37.18	382,962	40.25	2203
P-mult-15-KZ	225053	2,255,675	28	25.81	220,435	40.29	2142

Данная работа финансировалась грантом № AP05133053 Министерства образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

1 Souvorov A., Agarwala R., Lipman D.J. SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies //Genome biology. – 2018. – Т. 19. – №. 1. – С. 153.
2 Townsend K.M. et al. Genetic organization of Pasteurella multocida cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system //Journal of Clinical Microbiology. – 2001. – Т. 39. – №. 3. – С. 924–929.
3 Harper M. et al. Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype Pasteurella multocida strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus //Journal of Clinical Microbiology. – 2015. – Т. 53. – №. 2. – С. 477–485.
4 Pasteurella multocida multihost multilocus sequence type (MLST) database [Электронный ресурс]. URL: http://pubmlst.org/pmultocida/multihost/introduction.shtml.
5 Brettin T. et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes //Scientific reports. – 2015. – Т. 5. – С. 8365.
6 Orynbayev M. et al. Biological characterization of Pasteurella multocida present in the Saiga population //BMC microbiology. – 2019. – Т. 19. – №. 1. – С. 37.

Секция 5. Клеточная и генетическая инженерия

УДК 66.047

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ КАК ФИДЕРНЫЕ СЛОИ ДЛЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

Ю.А. Осипова, Д.Г. Коровина, Е.А. Савченкова

ВНИИ экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Москва, Россия

Процесс поддержания фенотипа эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) без признаков дифференцировки клеток зависит от определенных молекулярных стимулов, которые могут создавать поддерживающие монослои клеток (фидерные слои) и смеси ростовых факторов (1). Представляло интерес оценить мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК) сельскохозяйственных животных в качестве фидерных слоев для культивирования ЭСК. Для этого ЭСК мыши высевали на поддерживающие монослои в плотности 10^4 клеток/см^2. В качестве фидерных слоев использовали ММСК, выделенные из подкожно-жировой ткани (ПЖТ) лошади и костного мозга (КМ) крупного рогатого скота (КРС). Положительным контролем было культивирование ЭСК на диплоидных фибробластах эмбрионов мыши (МЭФ). Все клетки были взяты из Криобанка лаборатории стволовой клетки ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Эффективность фидерных слоев для поддержания ЭСК оценивали по морфологии колоний (размер, форма), скорости их пассирования и количеству колоний с признаками дифференцировки. Результаты показали, что на фидерном слое, представленном ММСК ПЖТ лошади, ЭСК мыши образуют колонии вытянутой формы, в которых уже на 2-м пассаже визуализируются колонии с признаками дифференцировки. На ММСК КМ КРС мышиные ЭСК росли колониями по размеру и форме более схожими с контрольной группой, в которых визуализировались мелкие круглые клетки с высоким ядерно / цитоплазматическим соотношением. ЭСК на монослоях МЭФ, ММСК ПЖТ лошади и КМ КРС образовали колонии в плотности для пассирования на 2-е, 3-и и 3-и сут, соответственно. Доля колоний ЭСК с фенотипическими признаками дифференцировки была выше на ММСК ПЖТ лошади (до 36 %), а на ММСК КМ КРС (до 13 %) по сравнению с контролем. Использование ММСК сельскохозяйственных животных в качестве фидерных слоев для культивирования мышиных ЭСК может помочь выявить молекулы, которые важны как для поддержания ЭСК в культуре так и для их дифференцировки.

Работа выполнена в рамках НИР № 0578–2014–0028 «Изучить стволовые клетки в качестве новой клеточной системы для лентивирусов животных in vitro»

ЛИТЕРАТУРА

1. Савченкова И.П., Сергеев Н.И., Айтбаев Н.Е. Сравнительный анализ развития предымплантационных эмбрионов кролика на различных монослоях. Цитология. 1994; 36(9–10): 955–58.

УДК 66.047

НОВЫЙ ФЕРМЕНТ CYP74 ЛАНЦЕТНИКА *BRANCHIOSTOMA BELCHERI*

Е.О. Смирнова, Н.В. Ланцова, Я.Ю. Топоркова, А.С. Гречкин

КИББ ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Цитохромы Р450 клана CYP74 являются ключевыми участниками окислительного метаболизма полиненасыщенных жирных кислот. Клан CYP74 включает в себя алленоксидсинтазы (АОС), гидропероксидлиазы (ГПЛ), дивинилэфирсинтазы (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). Продуктами функционирования ферментов CYP74 являются биологически активные вещества – оксилипины.

Настоящая работа посвящена характеристике нового фермента клана CYP74 ланцетника *Branchiostoma belcheri*. Данный фермент инкубировали с 9– и 13–гидроперекисями линолевой и альфа-линоленовой кислот, а также с 15-гидроперекисями эйкозатетраеновой и эйкозапентаеновой кислот. Фермент был активен по отношению ко всем перечисленным субстратом. Однако наиболее предпочтительным субстратом для фермента ланцетника была 13-гидроперекись альфа-линоленовой кислоты (13-ГПОТ), которая при участии фермента превращается преимущественно в оксиранил карбинол-(9*Z,* 11*R,* 12*R,* 13*S,* 15*Z*)–11-гидрокси–12,13–эпокси–9,15–октадекадиеновая кислота. Данное соединение является продуктом функционирования ЭАС. Дополнительным продуктом данной реакции был α-кетол–12-оксо-13-гидрокси–9,15–октадекадиеновая кислота (продукт АОС). В реакциях с другими субстратами образовывались аналогичные оксиранил карбинолы и α-кетолы.

Таким образом, фермент ланцетника *B. belcheri* проявлял двойную ЭАС/АОС активность. Ферменту присвоено тривиальное название BbEAS/AOS. Данный фермент является первым ферментом клана CYP74, обладающим АОС активностью, который обнаружен у Хордовых.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–34–70126 Стабильность.

УДК 577

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ И ПРЕЖДЕВРЕМЕННАЯ ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

П.Ю. Меркулов, М.Р. Омаров, И.В. Киров

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

Ретротранспозоны (РТ) – мобильные генетические элементы, которые составляют значительную часть эукариотических геномов и вносят существенный вклад в их регуляцию и эволюцию. Данные элементы способны распространяться внутри генома путём РНК-опосредованной репликации и последующей инсерции в последовательность геномной ДНК. Известно, что в нормальных условиях активность РТ подавляется множеством посттранскрипционных и эпигенетических механизмов. Под действием стресса данные механизмы снижают своё репрессивное действие, тем самым позволяя РТ проявлять свою активность.

К настоящему моменту нет полного представления о процессе того, как РТ выходят из-под контроля защитных механизмов клетки и становятся активными в нормальных условиях. Секвенирование транскриптома позволяет выявить по умолчанию активные ретротранспозоны и особенности их транскриптов (полиаденилирование, альтернативный сплайсинг). Одной из технических трудностей анализа данных секвенирования является картирование прочтений на эталонный геном, что в случае РТ усугубляется наличием множества нуклеотидных повторов в их структуре. Подобные проблемы возможно решить, используя длинные прочтения, полученные при помощи технологий секвенирования Oxford Nanopore Technologies (ONT). Такой подход позволяет не только сравнительно точно осуществить транскрипционную аннотацию РТ и выявить варианты сплайсинга, но и детектировать химерные транскрипты, а также события сквозной транскрипции. Однако, данный подход был применён для аннотации транскрипционно активных РТ только у мутантных линий *Arabidopsis thaliana* (Panda and Slotkin, 2020).

Нами было проведено прямое нанопоровое секвенирование мРНК подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus* L.). Полученные транскрипты мы картировали на референсный геном HA412-HO, в результате чего нами были идентифицированы в высокой степени транскрибирующиеся последовательности РТ класса LTR (англ. Long Terminal Repeats). Для многих из них удалось детектировать ряд транскрипционных изоформ, отличающихся открытыми рамками считывания и кодирующих разные белки, характерные для РТ. С помощью ОТ-ПЦР были вылидированы результаты нанопорового секвенирования, а также получены сиквенсы малопредставленных изоформ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-2360.2019.4.

ЛИТЕРАТУРА

Panda K, Keith Slotkin R. Long-read cDNA Sequencing Enables a “Gene-Like” Transcript Annotation of Arabidopsis Transposable Elements. doi:10.1101/2020.02.20.956714

УДК 640

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БАЦИЛЛЯРНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ДРОЖЖАМИ *PICHIA PASTORIS*

Ю.А. Васильева, Д.С. Пудова, М.Р. Шарипова

«Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

В настоящее время возрастает интерес к ферментным препаратам, применяемым в области сельского хозяйства, в частности как компоненты кормов для сельскохозяйственных животных и птиц. К ним, в частности, относятся ферменты протеиназы, которые расщепляют высокомолекулярные белковые соединения до коротких пептидов и аминокислот. Субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* 3–19 обладает широкой субстратной специфичностью, сохраняет стабильность в широком диапазоне pH и температуры и проявляет максимальную активность при температуре 37^{o} C и pH 9.0 [1]. Это позволяет предположить, что использование сериновой протеиназы *B. pumilus* 3–19 в качестве кормовой добавки может значительно улучшить качество кормов. На сегодняшний день, упрощение и снижение стоимости промышленного производства ферментов является актуальной задачей для биотехнологии. Одним из решений данной проблемы является использование гетерологичных систем экспрессии на основе клеток дрожжей *Pichia pastoris*. Система экспрессии на основе метилотрофных дрожжей *P. pastoris* обладает такими преимуществами, как низкая стоимость и легкость культивирования, способность производить функционально активные белки с правильной посттрансляционной модификацией, безопасный статус дрожжей, а так же высокая скорость увеличения биомассы за относительно короткое время [2].

Целью данного исследования являлось получение стабильной экспрессии оптимизированного гена протеиназы в дрожжах *P. pastoris*. В работе использовали сигнальные пептиды киллер-белка Saccharomyces *cerevisiae*, лизоцима *Gallus gallus* и интегративные вектора pPINK-HC/pPINK-LC. Клонирование конструкций проводили в клетках *E. coli* DH5a, целостность конструкций подтверждали секвенированием. Для эффективной экспрессии белка, клетки *P. pastoris* трансформировали дрожжевыми векторами с интегрированным геном протеиназы. Эффективность трансформации для конструкций с вектором pPINK-HC составила ~0.97x103 трансформантов/мкг ДНК, для конструкций с вектором pPINK-LC ~1.42x103 трансформантов/мкг ДНК. С помощью ПЦР анализа подтвердили наличие интегрированного в геном дрожжей гена бактериальной протеиназы. Внеклеточное накопление рекомбинантного фермента проверяли с помощью белкового электрофореза и измерения протеолитической активности по гидролизу специфического субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Было показано, что активность протеиназы у штаммов дрожжей, в геном которых были клонированы конструкции на основе низкокопийного вектора pPINK-LC показали более высокую специфическую активность, чем конструкции на основе вектора pPINK-HC. Максимальная активность была установлена у штамма дрожжей, в геном которого интегрировали ген протеиназы под контролем сигнального пептида лизоцима – 5.4 Ед./мл.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РНФ № 16–16–04062.

ЛИТЕРАТУРА

Михайлова, Е.О. Выделение и характеристика субтилизиноподобной протеиназы *Bacillus intermedius*, секретируемой рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* aj73 на разных фазах роста бацилл [Текст] / Е.О. Михайлова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан, Г.Н. Руденская, М.Р. Шарипова // Биохимия. – 2007. – Т.2. – Р. 228–235.

Balamurugan, V. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins – Vaccines [Text] / V. Balamurugan, G.R. Reddy, V.V.S. Suryanarayana // Indian Journal of Biotechnology. – 2007. – V.6. – P. 175–186.

УДК 577.214.622 + 577.27 + 615.37

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ПРОКАРИОТ

А.Н. Антипов, Н.Н. Мордкович, Н.А. Окорокова, Т.Н. Сафонова, К.М. Поляков, В.П. Вейко

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

Нуклеозидфосфорилазы (NP) – ферменты, относящиеся к классу трансфераз, катализируют обратимый фосфоролиз нуклеозидов и их аналогов. Продуктами этой реакции являются соответствующие гетероциклические соединения (основания) и рибозо-(дезоксирибозо-) – 1-фосфат. NP подразделяются на два подкласса: NP1 (пурин-нуклеозидфосфорилазы, 5'–дезокси-5'–метитиоаденозинфосфорилаза, уридинфосфорилаза) и NP2 (тимидинфосфорилаза, пиримидин-нуклеозидфосфорилаза). Данные ферменты присутствуют практически во всех высших организмах и микроорганизмах, включая экстремофильные (например, термофильные археи и бактерии). NP являются объектами пристального внимания исследователей, что предопределено тремя аспектами: 1. выявление молекулярного механизма функционирования этих ферментов; 2. разработка высокоспецифичных и эффективных ингибиторов самих NP, что необходимо при терапии многих заболеваний, включая и онкологические, у человека; 3. практическим использованием NP в ферментативном синтезе («зеленая химия») аналогов нуклеозидов, являющимися терапевтическими средствами. Не менее важным является выяснение принципов формирования термостабильных (ТС) форм NP, что может быть отнесено к фундаментальным знаниям. В работе на основе клеток *E.coli*, нами была сконструирована библиотека штаммов-продуцентов (16 вариантов) рекомбинантных NP, их мутантных и гибридных форм из различных мезофильных и экстремофильных микроорганизмов. Экспериментально показано, что субстраты стабилизируют структуру NP при термальном воздействии на эти белки. При этом именно неорганический фосфат-ион является решающим в этом процессе. С использованием биоинформатических методов анализа высказано предположение, что N-концевая структура белков во многом определяет термостабильность NP. Выявлено, что структура межсубъединичных контактов в этих мультисубъединичных белках влияет на термостабильность белков, но не является решающей при формировании толерантности нуклеозидфосфорилаз к температурному воздействию. Сконструирован гибридный белок тимидинфосфорилазы (TPP) из *E.coli*, в котором N-концевой фрагмент (1–62 аминокислотные остатки) заменен на соответствующий фрагмент из термостабильной TPP из *G.stearothermophilus*. Показано, что термостабильность полученной гибридной TPP повысилась примерно в 7 раз. В первичной структуре уридинфосфорилазе (UDP) из *E.coli* в N-концевой структуре выявлена аминокислотная последовательность 25-PGDP-30, высококонсервативная у UDP из мезофильных микроорганизмов. Сконструирована мутантная форма (D27G) UDP из *E.coli*, которая также обнаружила повышенную термостабильность (примерно в 11 раз) по сравнению с исходной формой. Получена кристаллическая форма этого мутантного белка и с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА, разрешение 1,75А) раскрыты структурные особенности строения этого белка. Высказано предположение, что именно архитектура строения фосфат-связывающего сайта у уридинфосфорилаз и особенности его функционирования, имеют решающее значение в придании этому ферменту термостабильности. На основании полученных нами ранее данных РСА для UDP из *Shewanella oneidensis* MR-1, отмечены подвижные петлевые участки (159–173 и 236–226 аминокислотные остатки), принимающие участие в связывании неорганического фосфат-иона и формировании активного центра фермента. Эти фрагменты полипептидной цепи рассматриваются как мишени для дальнейшего исследования принципов образования термостабильных форм NP.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18–04–00784).

УДК 60.606

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИК СОЗДАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.), УСТОЙЧИВЫХ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

А.А. Вербицкая, М. Мувинги, А.К. Гапоненко

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Пшеница (*Triticum aestivum* L.) является наиболее важной культурой из всех зерновых культур для большинства населения мира. Она является наиболее важным продуктом питания около двух миллиарда человек (36 % населения земного шара). Пшеница обеспечивает 55 % углеводов и 20 % пищевых калорий, потребляемых во всем мире (Breiman and Graur, 1995). Потери урожая пшеницы в различных экологических условиях, возникают из-за дефицита воды (засухи), засоленности, морозов, жары, грибных и вирусных болезней и насекомых. Каждый из перечисленных факторов среды может снижать урожайность, в среднем, на 15 %. Для увеличения урожайности культуры, в условиях быстро меняющегося климата, и сокращения природных ресурсов необходимы сорта нового поколения, широко адаптивные и эффективно использующие ресурсы среды. По данным ФАО засоленные почвы занимают огромные площади – около 20 % всей поверхности суши. Наличие солей снижает осмотический потенциал и растению сложно получить воду из почвы. GATA – это транскрипционный фактор (ТФ), который играет значимую роль в клеточных процессах. ТФ GATA являются ДНК – связывающие белки, которые имеют последовательность IV цинка WGATAR. Эти ТФ экспрессируются в ответ на абиотические стрессы, такие как засоление, засуха и АБК.

За последние тридцать лет были разработаны различные трансгенные методики, позволяющие передавать гены от широко спектра организмов злаковым культурам. Трансгенные технологии позволяют повысить устойчивость растений к болезням и абиотическим стрессам, улучшить качество зерна, увеличить уровень микроэлементов и витаминов в растении, модифицировать фотосинтез и повысить продуктивность и многое другое. Тем не менее, наличие эффективного способа трансформации для введения чужеродной ДНК в геном является существенным барьером для большинства видов однодольных, в том числе кукурузы, риса, овса, ячменя, и, в частности пшеницы.

Цель эксперимента – сравнение эффективных методик доставки генов и получение пшеницы, устойчивой к засолению, путем введения гена ТФ OsGATA.

Эффективную регенерацию трансгенных побегов данный способ обеспечивает, если в качестве мишени для трансформации используются незрелые зародыши с морфогенным каллусом, полученные от растений-доноров после холодового шока. Морфогенный каллус получают на среде содержащей пиклорам. Для введения чужеродной ДНК применяют биобаллистический способ – прямое введение генов с помощью пушки PIG (particle inflow gun). Также может быть использована любая генная пушка, например фирмы Biorad или DuPont. Перед баллистикой, экспланты выдерживают на осмотической среде с мальтозой. Трансформированные клетки размножают на среде для пролиферации. Селективный отбор трансформированных побегов начинают на этапе регенерации побегов. Укоренение побегов проводят при пониженных температурах на средах с селективным агентом. Данная система трансформации может быть использована с различными маркерными системами отбора, в том числе селекция с помощью гербицидов, таких как глифосат и биалафос (фосфинотрицин), а также антибиотиками, такими как канамицин, гигромицин. Амплификацию гена ТФ OsGATA из кДНК риса проводили методом ПЦР в TTP Labtech (Университет Джавахарлала Неру, Индия). кДНК риса была получена постановкой ОТ ПЦР на матрице пула РНК, выделенной из 7-ми дневных проростков риса. В эксперименте мы сравнивали две системы баллистической трансформации на 4-х сортах T. aestívum. В варианте 1 использовали протокол Huw D. Jones с соавторами (2009), а в варианте 2 – Гапоненко А.К. с соавторами (2016). Оба варианта используют среду Мурасиге и Скуга, витамины Гамбурга. В варианте 1 используют AgNO3 и CuSO4 и регуляторы роста 2,4 – D и зеатин, а в варианте 2–2,4–D и пиклорам.

Методика была использована на яровых и озимых сортах мягкой пшеницы отечественной селекции – Злата, Амир, Агата, Эстер. На каждом этапе эксперимента наблюдались различия по всем 4 сортам. Эффективность трансформации варианта 1 составила от 0 % до 3 %, а в варианте 2 от 0 % до 7,1 %.

Созданные трансгенные растения, несущие ген OsGATA, могут быть использованы для дальнейшего изучения функциональной роли ТФ OsGATA в регулировании устойчивости растений к стрессу, вызываемому и другими абиотическими факторами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–31–27001

ЛИТЕРАТУРА

Breiman A., Graur D. Wheat evolution //Israel Journal of Plant Sciences. – 1995. – Т. 43. – №. 2. – С. 85–98.
Sparks C.A., Jones H.D. Biolistics transformation of wheat //Transgenic Wheat, Barley and Oats. Humana Press, 2009. С. 71–92.
Гапоненко А.К., и др. Патент РФ № 2646108 РФ на изобретение «Способ получения трансгенных растений пшеницы с использованием биобаллистики» 07 декабря 2016 г.»

УДК 579.663

ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ И ПРАВОВОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ПРОМЫШЛЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Т.А. Воейкова[1,2], А.Ю. Скороходова[3], О.А. Журавлева[1,2], А.Д. Новиков[1,2], В.С. Кулигин[1,2], В.Г. Дебабов[1,2]

[1] НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия
[2] НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия
[3] ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Производство биологически активных веществ – аминокислот, ферментов, витаминов, органических кислот является приоритетной задачей микробиологической промышленности Российской Федерации (РФ). Синтез целевых промышленно-значимых соединений достигается с использованием направленно сконструированных микроорганизмов, способных конвертировать источники питания сред для культивирования, а также возобновляемое сырье растительной биомассы в ценные химикаты. Методология генной инженерии, включающая разработки последних лет, позволяет за короткий срок направленно изменять активность генов, приводя к усилению синтеза целевого продукта. Во всех странах генетически модифицированные микроорганизмы (ГММ) являются предметом государственного регулирования, имеющих целью оценку потенциального риска и управление этими рисками. Правовое регулирование промышленного использования ГММ различается в законодательных базах РФ, США и Евросоюза (ЕС). Принципы оценки рисков, связанных с ГММ, довольно близки в США и ЕС [1,2]. Это применение безопасного штамма реципиента (GRAS в США и QPS в ЕС). Штаммы, получившие статус GRAS и QPS, а также созданные на их основе продуценты, могут быть использованы в биотехнологии без дополнительных проверок их безопасности, что способствует быстрому внедрению штаммов в промышленное производство. Требования, касающиеся вносимого генетического материала, сводятся к запрещению введения генов, кодирующих токсины или их фрагменты. Не желательны гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Вводимый материал должен быть хорошо охарактеризован, ограничен в размерах и содержать только необходимые гены. Генетические манипуляции должны способствовать низкой мобилизационной активности вводимого гена. Следует отметить, что принципы отнесения штаммов к ГММ различаются в правовых системах США, ЕС и РФ. Нормативная база США признает за ГММ только организм, который несет чужеродный полноценный ген, который может кодировать белок или функционально важную РНК. Специальное название таких организмов «трансгены». Таким образом, в США объектом регуляции является организм. Этим законодательство США отличается от законодательства ЕС и РФ, где объектом регуляции является метод (генная инженерия), что ограничивает круг штаммов и усложняет продвижение их в промышленное производство. В РФ законодательство относительно ГММ носит противоречивый и скорее запретительный характер, что объясняется отсутствием до недавнего времени потребности в практическом использовании ГММ, поэтому на сегодня в РФ нет полноценной нормативной базы, позволяющей оценить риски и одобрить внедрение в промышленное производство ГММ. Необходимо включение в законодательную базу РФ научно обоснованных принципов создания и биобезопасного использования ГММ и ряда положений, доказавших свою эффективность: создать высококвалифицированный научный совет по оценке рисков ГММ; разработать принципы и на их основе утвердить список безопасных штаммов и вводимого в реципиенты генетического материала; узаконить исключение из ГММ микроорганизмов, не имеющих в своем геноме чужеродных генов.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–29–14005.

ЛИТЕРАТУРА

http://www2.epa.gov/laws-regulations/summary-toxic-substances-control-act
http://oba.od.nih.gov/oba/rac/Guidelines NIH_Guidelines.htm

УДК 577

НАНОПОРОВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ РНК МУТАНТА АРАБИДОПСИСА (DDM1) С АКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ

С.А. Гварамия, П.Ю. Меркулов, М.Р. Омаров, И.В. Киров

ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

Повторяющиеся генетические элементы широко распространены в геномах высших растений и оказывают большое влияние на их эволюцию [1]. Подавляющее большинство из них составляют LTR-ретротранспозоны – мобильные генетические элементы, перемещающиеся в геноме хозяина посредством транскрипции РНК, обратной транскрипции с образованием кДНК и ее вставки в геном.

Последние исследования отмечают наличие экспрессии транспозонов и в стрессовых, и в нормальных условиях, несмотря на то, что их активность подавляется на транскрипционном и пост-транскрипционном уровнях. Такое ингибирование активности ретротранспозонов осложняет изучение их биологии [2]. Однако, для модельного растения, *Arabidopsis thaliana*, были получены различные мутантные линии с нарушением активности систем сайленсинга ретротранспозонов. Один из таких мутантов – *ddm1* (Decreased DNA Methylation I), несущий однонуклеотидную замену в гене *DDM1* и обладающий высокой активностью различных транспозонов. Кроме низкой активности самих ретротранспозонов, существенным препятствием к их изучению является низкое качество сборки их геномных и транскриптомных сиквенсов, что связано с высокой (по сравнению с генами) копийностью в геноме.

Чтобы решить сразу обе проблемы изучения ретротранспозонов, в данной работе нами было проведено прямое секвенирование полиА РНК *ddm1* мутанта на приборе ONT MinION. Нами было получено более 700 000 качественных ридов. С помощью этих и ранее полученных данных для «дикого типа» мы выявили большое количество транскрипционно активных ретротранспозонов и определили их изоформы. В частности, были идентифицированы изоформы известного ретротранспозона EVD [6], [7] с доказанной активностью у *ddm1*. Полученные данные будут использованы для дальнейшего изучения биологии и активности ретротранспозонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ грант № 20–34–70032).

ЛИТЕРАТУРА

[1] Slotkin R.K., Martienssen R.A. (2008) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. Nature Rev. Genet. 8: 272–285.
[2] Oberlin S., Sarazin A., Chevalier C., Voinnet O., Mari-Ordonez A. (2017) A genome-wide transcriptome and translatome analysis of Arabidopsis transposons identifies a unique and conserved genome expression strategy fot Ty1/Copia retroelements. Genome Res. 27: 1549–1562.
[3] Quadrana L., Etcheverry M., Gilly A., Caillieux E., Madoui M.A., Guy J… & Aury J.M. (2019). Transposition favors the generation of large effect mutations that may facilitate rapid adaption. Nature communications, 10(1), 3421.
[4] Vongs A., Kakutani T., Martienssen R.A., Richards E.J. (1993) Arabidopsis thaliana DNA methylation mutants. Science. 260: 1926–1928.
[5] Ozsolak F., Platt A., Jones D., Reifenberger J., Sass L., McInerney P., Thompson J., Bowers J., Jarosz M., Milos P. (2009). Direct RNA sequencing. Nature. 461: 814–818.
[6] Reinders J., Mirouze M., Nicolet J., Paszkowski J. (2009) Parent-of-origin control of transgenerational retrotransposon proliferation in Arabidopsis. EMBO reports. 14(9): 823–828.
[7] Tsukahara S., Kobayashi A., Kawabe A., Mathieu O., Miura A., Kakutani T. (2009) Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis. Nature. 461: 423–426.

УДК 582.26:574/577

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ – КРИТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ БИОТЕХНОЛОГИИ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Н.А. Давидович

Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН, г. Феодосия, Россия

Диатомовые водоросли привлекают все большее внимание как объект не только лабораторного, но и промышленного культивирования. Они перспективны по следующим направлениям: нанотехнологии и материаловедение, биосенсорика и судебная лимнология, иммуноизоляция, иммунодиагностика и производство иммуносенсоров, фильтрация и очистка воды, корма для аквакультуры, производство метаболитов и биотоплива, солнечных панелей, биоремедиация, доставка лекарств (1). Значительные усилия прилагаются для получения генетически модифицированных диатомовых. При этом средства и время, потраченные на их получение могут оказаться неэффективными по простой причине – отсутствии знаний об их жизненном цикле. Последний у диатомовых состоит из двух основных фаз: вегетативной и генеративной, причем онтогенез и переход из одной фазы в другую в норме у большинства из них регулируется размерами клеток – апикальным размером у пеннатных и полярных центрических и диаметром у радиальных центрических. В начале жизненного цикла клетки, появившиеся в результате полового воспроизведения и ауксоспорообразования, имеют наибольшие характерные для вида размеры. Из-за особенностей строения панциря, детально описанных в литературе (2), клетки в результате каждого митотического деления уменьшаются и при достижении критической границы размеров, составляющей приблизительно 50 % от максимального видоспецифического, переходят в генеративную фазу, становясь сексуально потентными. Половое воспроизведение, таким образом, является неотъемлемым атрибутом жизненного цикла, обеспечивающим его повторяемость благодаря восстановлению исходных размеров. Однако, следует заметить, что при половом воспроизведении генетические последовательности претерпевают определенные изменения, и в потомстве они уже не будут такими же, как у родителей. Поэтому для успешного и продолжительного культивирования генмодифицированного клона необходимо решить одну из задач – увеличить фактическую продолжительность существования клона, т. е. "замедлить" переход в генеративную фазу. Для этого могут быть предложены разные подходы. Во-первых, следует изучить систему скрещивания вида, и убедившись, что изучаемый вид является раздельнополым, отобрать для последующего культивирования клоны одного пола, не смешивая их в культуре, поскольку известно, что в отсутствие полового партнера гомоталлизм проявляться не у всех видов и нередко у представителей только одного пола. Особый интерес в этом плане представляют центрические диатомовые. У них гомоталлизм является базовой моделью воспроизведения, и теоретически, вышеописанный подход неприменим. Однако, как показал наш опыт (3), представитель полярных центрических *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow имеет неоогмный способ воспроизведения и гетероталлическую систему скрещивания. Цель настоящей работы состояла в изучении системы скрещивания близкородственного вида – *Toxarium undulatum* Bailey. Как оказалось, у него гомоталлизм также является основным в системе скрещивания. Следовательно, при культивировании представляется возможным относительно продолжительное (без вступления в процесс полового воспроизведения) содержание клоновых культур. Вторая положительная для культивирования особенность *T. undulatum* состоит в относительной скорости уменьшения апикальной длины клеток. Эта одна из крупнейших диатомовых (нами получены клетки длиной 1504 мкм при минимальных размерах около 360 мкм) уменьшалась в условиях лабораторной культуры со скоростью от 5 до 10 мкм/мес, т. е. общая продолжительность онтогенеза клона может составить несколько лет.

Работа поддержана грантом РФФИ №19–04–00070_а «Изучение видоспецифичности эволюционного перехода от оогамии к неоогамному половому воспроизведению у полярных центрических диатомей (Mediophyceae)».

1. Mishra, M., Arukha, A.P., Bashir, T., Yadav, D., Prasad, G.B.K.S. All new faces of diatoms: potential source of nanomaterials an d beyond. Front Microbiol. 2017. V. 8, № 1239. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01239
2. Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G. The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera // Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 747 pp.
3. Davidovich, N.A. et al. *Ardissonea crystallina* has a type of sexual reproduction that is unusual for centric diatoms. Scientific Reports. 2017. V. 7, No 14670. P. 1–16.

УДК 640

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЙ БИОЧИП С «УМНЫМИ» ГИДРОГЕЛЕВЫМИ ЯЧЕЙКАМИ

А.М. Золотов, А.Ю. Иконникова, В.Е. Кузнецова, В.Е. Шершов, А.В. Чудинов

[1] *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

Лаборатория на чипе – это устройство, совмещающее несколько лабораторных функций в единый миниатюрный прибор, называемый чипом, на базе которого возможен многопараметрический анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Цель работы – разработка агарозных ячеек биочипа, содержащие термоотщепляемые праймеры. Задача заключается в получении «умного» геля, который при внешнем воздействии отщепляет присоединенные к гелю целевые молекулы, но и сохраняет свои механические свойства.

В данной работе реакцией агарозы с ангидридом метакриловой кислоты часть первичных гидроксильных групп замещается на фрагменты метакриловой кислоты. Затем на первичные гидроксильные группы агарозы конденсируются олигомеры полигликолевой кислоты, как описано в работе [1]. Условия модификации агарозы оптимизировали с контролем степени замещения гидроксильных групп углеводного полимера. Модифицированный агарозный гель сохраняет способность к термозависимому фазовому переходу плавления-гелеобразования. Также в работе представлен метод получения флокулированного осадка модифицированной агарозы, который при растворении в смеси воды, диоксана и диметилформамида приводит к критическому раствору агарозы – раствор способен при комнатной температуре необратимо гелеобразоваться. Раствор солюбилизированной модифицированной агарозы с метиленбисакриламидом и фотоинициатором в виде матрицы микрокапель наносили иглой робота манипулятора на активированную поверхность полимерной подложки при комнатной температуре. Диаметр капель 150 мкм, шаг 300 мкм, капли при стоянии затвердевают. При фотооблучении происходит кросс-сшивание агарозы с образованием плотных ячеек, связанных ковалентными связями с подложкой. Карбоксильные группы на полигликолевых линкерах при этом сохраняются. После активации карбоксильные группы связывали пептидной связью с парой олигонуклеотидов, несущих на 5`-конце первичную аминогруппу и флуоресцентный краситель Cy3. Количество олигонуклеотидов, связанных с подложкой контролировали методом цифровой флуоресцентной микроскопии по флуоресценции красителя Cy3.

При 95^{o} С олигонуклеотиды, связанные с агарозой, отщепляются и переходят в гель, из которого они легко вымываются водой. По флуоресценции агарозных ячеек в диапазоне Cy3 оценивали количественные характеристики термоотщепления олигонуклеотидов от агарозного геля.

Олигонуклеотиды отщепившиеся от агарозных ячеек использовали в качестве праймеров в симметричной ПЦР с фрагментом ДНК участка последовательности 7 экзона гена АВО человека, который детерминирует серологический фенотип группы крови АВО. Результаты ПЦР контролировали методом электрофореза в 4 % агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. На электрофореграмме четко фиксируются продукт ПЦР, соответствующей длины.

Установлено, что модификация агарозы позволяет получить «умный» гель, который выполняет подаваемую с помощью нагрева команду, отщепляет присоединенные к гелю целевые молекулы ДНК с сохранением их функциональных свойств.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 17–04–02062а.

ЛИТЕРАТУРА

1 Pinkus A.G., Subramanyam R. New high-yield, one-step synthesis of polyglycolide from haloacetic acids //Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition. – 1984. – Т. 22. – №. 5. – С. 1131–1140.

УДК 615.277

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА И ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

А.В. Зубков, Н.С. Кузьмина, М.А. Андреева, А.В. Сидоров, Л.Г. Бутова

НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Получение рекомбинантных белков рецептора тиреотопного гормона (рТТГ) и тиреопероксидазы (ТПО) человека открывает новые возможности в исследовании взаимосвязи антигенной структуры аутоантигенов щитовидной железы и аутоантител в патогенезе таких аутоиммунных заболеваний как диффузный токсический зоб (ДТЗ) и аутоиммунный тиреодит (АИТ). В представленной работе были клонированы фрагменты последовательности мРНК α-субъединицы рТТГ, и фрагменты внеклеточного домена ТПО, не содержащие нуклеотидных замен. Получены рекомбинантные векторы для экспрессии белков α-субъединицы рецептора тиреотропного гормона и фрагментов внеклеточного домена ТПО.

Рецептор тиреотропного гормона играет основную роль в патогенезе ДТЗ – аутоиммунного заболевания щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), характеризующейся гиперпродукцией аутоантител (аутоАТ) к рТТГ, вызывающей, в свою очередь, устойчивый гипертиреоз [1].

В структуре рТТГ выделяют три домена: внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный. Внеклеточный домен содержит обогащённый лейцином участок и шарнирную область, связанную с трансмембранным доменом. рТТГ, при расщеплении рецептора, выделяется фрагмент (α)–субъединицы, состоящей из обогащённого лейцином участка и шарнирной области, и (β)–субъединицы, состоящей из С-концевой части рецептора и трансмембранного домена. Для понимания механизмов взаимодействия антител и эпитопов рТТГ, необходимо выявить отдельные популяции аутоантител стимулирующие (стимулирующие аутоАТ), блокирующие (блокирующие аутоАТ) либо регулирующие передачу сигнала от рецептора к внутриклеточным эффекторам тиреоцита. Известно, что α-субъединица рТТГ является основным участком рецептора, к которому формируются аутоАТ [2–4]. Определение аутоантител, может быть использовано как для прогноза клинических исходов болезни Грейвса, так и для коррекции состояния пациентов с помощью специфической терапии. В настоящее время, усилия многих ученых направлены на создание лабораторных тестов нового поколения для раздельного выявления блокирующих и стимулирующих аутоАТ к рТТГ.

Тиреопероксидаза человека – основной фермент в процессе синтеза гормонов щитовидной железы: трийодтиронина и тироксина. Аутоантитела к ТПО выявляются в сыворотке крови пациентов при ряде аутоиммунных заболеваний: ДТЗ, АИТ и являются одним из важных показателей для постановки диагноза аутоиммунного заболевания.

Клонирование фрагментов рТТГ и ТПО позволяет расширить возможности для изучения аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, Целью работы являлось клонирование фрагментов рТТГ и ТПО человека, получение и анализ рекомбинантных белков аутоантигенов щитовидной железы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали: ткань ЩЖ оперированного пациента с ДТЗ. Для получения мРНК ткань ЩЖ замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Нуклеиновые кислоты очищали от белков и разделяли методом ультрацентрифугирования при 100 000 g в градиенте цезия хлорида. Для получения кДНК использовали ферментативный синтез двухцепочечной кДНК на poly (A)+–мРНК.

Для трансформации использовали компетентные клетки E. coli, штамм DH5α.

Олигонуклеотидные праймеры были подобраны на основе последовательностей нуклеотидов, собранных в Gen Bank с использованием онлайн-программы Primer Blast. Синтезированы пять пар праймеров на участок, соответствующий внеклеточному (экстрацеллюлярному, ЭД) домену рТТГ, и пять пар праймеров на внеклеточный участок ТПО, в компании «Синтол» (Россия).

Для амплификации участков ДНК, необходимых для создания конструкций, содержащих участки ЭД рТТГ и ЭД ТПО различной длины, использовали метод ПЦР, который проводили с помощью ПЦР – амплификатора T-100 (Bio-Rad). Полученные ПЦР-продукты и на этапах клонирования пробы ДНК разделяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. ПЦР – продукты очищали из агарозного геля, используя набор реактивов Cleanup Standart по методике, рекомендованной производителем.

Лигирование проводили с помощью набора Quick-TA kit без предварительной обработки рестриктазами в соответствии с инструкцией к набору. Для клонирования полученных ПЦР – продуктов были использованы векторы: pUC19, pAL2-T.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые молекулярное клонирование гена рТТГ собаки было выполнено Парментье и его коллегами в 1989 г.: была получена кДНК 4,9 Kb, кодирующий пептид, состоящий из 744-х аминокислотных остатков. [5].

На первом этапе наших экспериментов было проведено выделение РНК из ткани ЩЖ человека. Полученные образцы содержали (от 0, 2 до 0,7) мкг/мкл РНК, что было подтверждено методом электрофореза проб РНК в 1,5 % агарозном геле.

Для получения генно-инженерных конструкций, содержащих фрагменты гена рТТГ, соответствующие ЭД, нуклеотидная последовательность которого включает в себя (1 – 1239) п.н. синтезированы пять пар праймеров. В указанной области были выбраны пять участков, на которые были синтезированы специфические олигонуклеотиды: 1-й участок – 1160 п.н.; 2-й участок – 1156 п.н.; 3-й участок – 432 п.н.; 4-й участок – 414 п.н.; 5-й участок – 389 п.н. Для получения рекомбинантных фрагментов ТПО были выбраны участки нуклеотидной последовательности, соответствующие аминокислотным участкам: 599–617, 606–629 и 706–720 а.о.

На следующем этапе была синтезирована кДНК на матрице РНК в двух вариантах, с использованием oligo(dT) и random праймеров. На матрице кДНК, полученной с использованием random праймеров для рТТГ, удалось синтезировать ПЦР – продукты длиной: 1160 п.н., 1156 п.н., 432 п.н., 389 п.н.

Амплифицированные продукты были клонированы в плазмидный вектор pAl-2T, который трансформировали в компетентные клетки *E.coli*, штамм DH5α.

Содержание плазмиды со вставкой проверяли методом ПЦР с праймерами M13 и дальнейшей визуализацией ПЦР – продуктов и исходных плазмид в агарозном геле. В результате были получены три варианта вектора pAL2-T, содержащие фрагменты рТТГ – векторы pAL2-T с ПЦР-продуктами участка 1 (1160 п.н.), участка 3 (432 п.н.) и участка 5 (389 п.н.). Для секвенирования были отобраны три клона. Секвенирование нуклеотидной последовательности клонов показало, что на фрагменте 432 п.н. обнаружены 5 замен нуклеотидов; фрагменты, размером 1160 п.н. и 389 п.н., полностью идентичны опубликованным последовательностям (GenBank). Затем протяжённый участок (1160 п.н.), кодирующий фрагмент альфа – субъединицы рТТГ, переведен в экспрессирующий вектор pVAX1, предназначенный для работы с клеточными линиями млекопитающих.

Антигенные детерминанты ТПО были выбраны на основании литературных данных. Два участка соответствуют линейным антигенным детерминантам молекулы ТПО, находящимся в иммунодоминантной области А (513–633) а.о. и иммунодоминантной области В (633–933) а.о., и играют важную роль при формировании гуморального ответа у больных с АИЗ ЩЖ [12]. Первая и вторая детерминанты (иммунодоминантная область А) были перекрывающимися и несли в своем составе фрагменты ТПО рекомбинантный белок А1 (599–617) а.о. и рекомбинантный белок А2 (606–629) а.о., соответственно. Третья детерминанта (из иммунодоминантной области В) – рекомбинавнтный белок А3 включала последовательность (706–720) а.о. Электрофореграммы рекомбинантных белков А1, А2 и А3 ТПО в 12,5 % ПААГ подтвердили отсутствие примесей в препаратах рекомбинатных белков, что позволило считать препарат пригодным для дальнейшей работы.

На ограниченной коллекции образцов сывороток крови больных с заболеваниями ЩЖ (n=90) с уровнем АТ к ТПО в диапазоне (100 – 10 000) МЕ/мл изучали эпитопную специфичность аутоантител в сыворотках с использованием трех рекомбинантных белков ТПО: А1, А2, А3.

В конкурентном ИФА исследовали образцы рекомбинантных белков ТПО, белка носителя без детерминант ТПО и нТПО в концентрации 3 мкг/мл и образцы сыворотки крови в конечном разведении 1:100.

Данные наших опытов подтверждают, что химерные белки А1, А2 вызывали 30–60 % торможение связывания аутоантител из образцов сыворотки крови больных с АИЗ ЩЖ с повышенным содержанием аутоантител к ТПО. При этом наблюдалось ингибирование связывания аутоантител сыворотки крови пациента с субклиническим гипотиреозом (низкое содержание антител) только на 20 %. Это позволило сделать предположение, что у пациентов с АИЗ ЩЖ присутствуют аутоантитела, направленные к линейной детерминанте (599–629) а.о. ТПО.

Аналогичные данные представлены в работе *Gardas A*. et al [6]. При изучении эпитопной специфичности аутоантител из сывороток крови больных с АИЗ ЩЖ с 14-ю рекомбинантными белками также было установлено, что химерный белок и пептид, содержащие детерминанту ТПО (599–626) а.о., вызывали торможение связывания на (30 – 40) % в 60 % сывороток. Очевидно, что этот участок ТПО может быть вовлечён в патогенез различных аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Это позволяет подтвердить предположение, что у пациентов с АИЗ ЩЖ присутствуют аутоантитела, направленные к линейной детерминанте (599–629) а.о. ТПО.

Постановка конкурентного ИФА с химерным белком А3, ТПО и белком-носителем на планшете, сенсибилизированном нативной ТПО в концентрации 10 мг/мл, использованной для исследования химерных белков А1, А2, не выявила торможения связывания аутоАТ из сывороток крови пациентов с АИЗ ЩЖ. Однако при сенсибилизации планшета химерным белком А3 в оптимальной концентрации 10 мкг/мл, были выявлены образцы сыворотки крови пациентов с ДТЗ с высоким уровнем АТ к ТПО (3600 МЕ/мл, 10 000 МЕ/мл), которые имели титры 160 и 640, соответственно, и содержание аутоАТ было пропорционально тяжести заболевания (рис. 1). Исследования сыворотки крови пациентов с высоким уровнем АТ к ТПО: АИТ (1074,2 МЕ/мл) и ДТЗ (10 000 МЕ/мл) – в иммуноблоттинге с химерным белком А3 подтвердили, что в сыворотке крови больного ДТЗ, с очень высоким уровнем АТ к ТПО, содержатся аутоантитела, направленные к (710–720) а.о. ТПО.

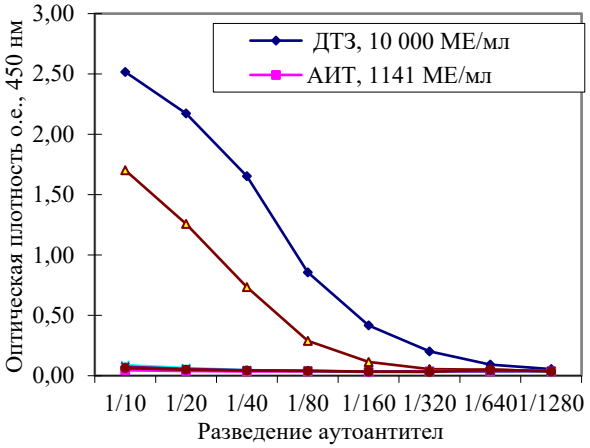


Рис. 1. Результаты титрования сывороток крови на сорбенте – химерном белке А3 ТПО в концентрации 10 мкг/мл

На рис. 1 представлены результаты титрования 5 сывороток крови пациентов и одного донора. В сыворотках крови пациентов с ДТЗ (10 0000 МЕ/мл) и ДТЗ (3600 МЕ/мл) выявлены антитела к рекомбинантному белку А3 ТПО, в титрах 1/640 и 1/160, соответственно. В других предствленных образцах, включая сыворотку здорового донора, эти антитела не выявляются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные рекомбинантные белки рТТГ и ТПО могут быть использованы для создания высокочувствительных иммунохимических тестов нового поколения, позволяющих определять специфические аутоантитела в сыворотке пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. Дальнейшие исследования на расширеннной панели сывороток крови больных с различными формами патологии щитовидной железы и изучение гетерогенности аутоантител к основным аутоантигенам щитовидной железы: рецептору тиреотропного гормона и тиреопероксидазе человека позволит выявить новые эпитопы, ответственные за формирование аутоантител при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы и определить критические точки для ранней эффективной диагностики и лечения этих заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith T.J. TSHR as a therapeutic target in Graves' disease. Expert Opin Ther Targets. 2017; 21(4): 427–432.
2. Rapoport B., McLachlan S.M. TSH receptor cleavage into subunits and shedding of the A-subunit; a molecular and clinical perspective. Endocrine Reviews. 2016; 37(2): 114–34.
3. Sanders J., Bolton J., Sanders P., Jeffreys J., Nakatake N., Richards T., Evans M., Kiddie A., Summerhayes S., Roberts E., Miguel R.N., Furmaniak J., Smith B.R. Effects of TSH receptor mutations on binding and biological activity of monoclonal antibodies and TSH. Thyroid. 2007; 17(2): 1195–1206.
4. Furmaniak J., Sanders J., Núñez Miguel R., B. Rees Smith. Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies. Horm Metab Res. 2015; 47: 735–752.
5. Parmentier M., Libert F., Maenhaut C., Lefort A., Gerard C., Perret J., Van Sande J., Dumont J.E., Vassart G. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. Science. 1989; 246(4937): 1620–1622.
6. Gardas A., Watson P.F., Hobby P., Smith A., Weetman A.P., Sutton, B.J. and Banga J.P. Human thyroid peroxidase: mapping of autoantibodies, conformational epitopes to the enzyme surface. Redox. Rep., 2000, 5, p. 237–241

УДК 579.23.4:579.246:579.253.55:579.253.43

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ МЕХАНОСЕНСОРНОЙ РОЛИ ПОЛЯРНОГО ЖГУТИКА БАКТЕРИИ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp245

Е.И. Кацы, А.В. Шелудько, Л.П. Петрова, С.С. Евстигнеева, Ю.А. Филипьечева, Д.И. Мокеев, Е.М. Телешева, И.В. Борисов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Стимулирующие рост растений бактерии рода *Azospirillum*, используемые в сельскохозяйственных биотехнологиях, приспособлены к обитанию в разнообразных природных средах и организмах и обладают выраженной генетической и фенотипической пластичностью. Так, некоторые виды азоспирилл, включая *Azospirillum brasilense*, отвечают на вариации в плотности среды небольшими, но статистически значимыми изменениями длины клеток, характера их жгутикования (только конститутивный полярный жгутик [Fla] или Fla и индуцибельные латеральные жгутики [Laf]) и образа жизни (плавание, роение или строительство колоний и биопленок). Однако механизмы восприятия механических сигналов и выработки ответа на них у этих и других микробов мало изучены. Тем не менее, есть данные о том, что механосенсорные функции могут выполнять жгутики, первыми вступающие в контакт с микроокружением бактерий.

Цель работы – анализ роли жгутиков в механоответах модельной бактерии *A. brasilense* Sp245. Использованы методы молекулярной генетики, микробиологии, биоинформатики. Показано, что у нескольких классов инсерционных мутантов этой бактерии дефекты в жгутиковании сопровождаются снижением количества биомассы в зрелых биопленках, а комплементация мутантов соответствующими генами штамма Sp245 приводит к восстановлению жгутикования, увеличению количества накопленной биомассы в биопленках и повышению их стабильности, в том числе, в условиях гидродинамического сдвига. При этом в биопленках, сформированных на интерфазе между плотными и жидкими средами, выявляется только Fla. Показано, что для восстановления у комплементированных мутантов штамма Sp245 способности к образованию Laf в ответ на попадание в вязкие или на плотные среды важна не только способность Fla к вращению (и, соответственно, к восприятию препятствий для этого вращения), но и правильная, полярная, локализация Fla на клетке.

Бактериальные жгутики состоят из базального тела, крюка и филамента. Базальное тело выполняет функции якоря жгутика в оболочке клетки, мотора и экспортной машины и включает несколько кольцевых белковых комплексов, стержень и систему секреции III типа. Одним из ключевых компонентов этой системы секреции является белок FlhB. В геноме штамма Sp245 (accession nos. HE577327-HE577333) есть два предполагаемых гена *flhB*, расположенные в разных репликонах. Нами установлено, что хромосомный ген *flhB1* (локус AZOBR_150177) необходим для образования и Fla, и Laf. У инсерционного *flhB1* мутанта Sp245.1063 дефекты в сборке конститутивного Fla и индуцибельных Laf и подвижности были комплементированы в результате экспрессии гена *flhB1* штамма Sp245 с векторной плазмиды pRK415. Обнаружено, что мутант Sp245.1063 потерял способность к укорочению клеток после их попадания с плотной в жидкую среду (и наоборот), а у комплементированного мутанта Sp245.1063 (pRK415-*flhB1*) эта способность к морфологическому ответу на изменения в плотности среды восстановилась. После приобретения штаммами Sp245 и Sp245.1063 конструкции pRK415–150176 с клонированным соседним с *flhB1* геном AZOBR_150176 их клетки перестали удлиняться на плотных средах. По-видимому, продукт трансляции AZOBR_150176 – предполагаемая мультисенсорная гибридная гистидинкиназа–регулятор ответа (HSHK–RR) – и белок FlhB1 важны для реализации механоответов азоспирилл. Разработаны подходы к направленному мутагенезу разных сегментов AZOBR_150176 у штамма Sp245. Анализ особенностей фенотипа целевых мутантов с дефектами в разных доменах HSHK–RR будет использован для верификации вышеназванного предположения.

Авторы благодарят к.х.н. А.М. Бурова и ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН (Саратов, Россия) за помощь в работе. Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–04–00006-А.

УДК 640

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ В КЛЕТКАХ HEK293

А.В. Колосов, А.С. Волынкина, Л.Д. Тимченко

Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия
Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) – особо опасная трансмиссивная природно-очаговая арбовирусная инфекция, эндемичная для многих стран, в том числе юга европейской части России, характеризующаяся тяжелым течением болезни с высоким уровнем летальности (3–20 %). Возбудитель КГЛ – вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (вирус ККГЛ), принадлежащий к роду *Orthonairovirus* семейства *Nairoviridae* порядка *Bunyavirales* [1]. Вирус ККГЛ относится ко II группе патогенности и уровню биологической опасности BSL-4 по международной классификации [2].

Для серодиагностики КГЛ показана возможность применения в качестве антигена рекомбинантного белка нуклеопротеина (NP) вируса ККГЛ [4]. Нуклеопротеин вируса ККГЛ являюшийся структурным белком, кодируется открытой рамкой считывания (ORF) малого (S) сегмента генома вируса ККГЛ, размером 1449 п.н., (482 аа), имеет молекулярную массу 53 кДа [3].

В большинстве случаев, для экспрессии белка NP используют прокариотические экспрессионные системы, но из-за отсутствия необходимых посттрансляционных модификаций эффективнее использовать другие экспрессионные системы [5]. Наиболее подходящими для исследования, на наш взгляд, являются клетки млекопитающих линии HEK293, обеспечивающие необходимый посттрансляционный процессинг для рекомбинантных белков.

Цель исследования – конструирование плазмиды для экспрессии рекомбинантного нуклеопротеина (NP) вируса ККГЛ в клетках эукариот.

На основе плазмидного вектора pcDNA3.1(+) (ThermoFisher Scientific, США), была сконструирована рекомбинантная плазмида pcDNA3.1 CCHFV-NP-GFP (7619 п.н.) для экспрессии нуклеопротеина вируса ККГЛ в эукариотических клетках под контролем промотора цитомегаловируса CMV, содержащая кодирующую область гена нуклеопротеина, соединенную с последовательностью зеленого флуоресцентного белка (GFP) на С-конце. Дизайн конструкции выполняли в программе SnapGene 2.8.3.

Эффективность экспрессии рекомбинантного нуклеопротеина вируса ККГЛ оценивали при трансфекции клеточной линии HEK293 рекомбинантной плазмидой pcDNA3.1_CCHFV-NP-GFP.

Клеточные линии выращивали на среде ИГЛА МЕМ с добавлением FBS (бычья сыворотка крови) до концентрации 10 %. Клеточный монослой культивировали в CO_2-инкубаторе при относительной влажности 85 % и температуре 37º С и содержании CO_2 5 %.

Трансфекцию клеточных линий HEK293, плазмидой pcDNA3.1 CCHFV-NP-GFP, проводили с использованием реагента Lipofectamine 2000, в соответствии с инструкцией производителя. После трансфекции клеточный монослой инкубировали при 37 °С в CO_2-инкубаторе, в течение 96 ч. В качестве положительного контроля проводили трансфекцию монослоя клеток HEK293 плазмидой phMGFP, в качестве отрицательного – трансфекцию клеток HEK293 плазмидой pcDNA3.1(+).

При исследовании монослоя трансфецированных клеток методом люминисцентной микроскопии специфическое зеленое свечение наблюдалось в клетках монослоя, трансфецированных плазмидой pcDNA3.1_CCHFV-NP-GFP и плазмидой phMGFP (положительный контроль) (рис. 1 и 2). Максимальное количество светящихся клеток при трансфекции плазмидой pcDNA3.1_CCHFV-NP-GFP составляло 3 %.

Таким образом, наличие специфического свечения зеленой флуоресцентной метки при трансфекции монослоя HEK293 плазмидой pcDNA3.1_CCHFV-NP-GFP подтверждает наличие в трансфицированных клетках продукта экспрессии целевого гена – рекомбинантного нуклеопротеина вируса ККГЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куличенко, А.Н. и др. Крымская геморрагическая лихорадка в Евразии в XXI веке: эпидемиологические аспекты. // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2012. – № 3. – С. 42–53.
2. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза // Вестник Российской академии наук. 2003. Т. 73, № 3. С. 195–204.
3. Lasecka L., Baron M.D. The molecular biology of nairoviruses, an emerging group of tick-borne arboviruses // Archives of virology. 2014. Vol. 159, № 6. P. 1249–1265.
4. Marriott A.C., et al. J. Gen. Virol. 1994. Vol. 75, Pt. 9, P. 2157–2161.;
5. Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. Biomolecules, 2014.

УДК 579.258

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА Л5 НА БИОГЕНЕЗ ВНЕШНЕМЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ LYSOBACTER SP. XL1

И.В. Кудрякова, А.С. Афошин, Т.В. Ивашина, Н.Е. Сузина, Н.В. Васильева

ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Россия
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Россия

Бактериолитическая протеаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1 является компонентом высокоэффективного антимикробного комплекса Лизоамидаза. Этот белок попадает в окружающую среду посредством внешнемембранных везикул, образуемых клетками *Lysobacter* sp. XL1 [1]. С использованием методов биохимии и электронной иммуноцитохимии были получены результаты, указывающие на то, что белок Л5 принимает участие в биогенезе определённой группы секреторных везикул, содержащих его в своем составе [2–4]. Целью данной работы было подтвердить роль белка Л5 в этом процессе. Для решения поставленной цели был проведен нокаут гена Л5 (*alpB*) и изучено влияние этой мутации на процесс формирования везикул.

Для введения мутации в геном *Lysobacter* sp. XL1 на основе суицидного вектора pJQ200SK сконструирована плазмида, содержащая фрагмент ДНК с делеционным вариантом *alpB* (соответствует делеции 40 – 331 а.о в последовательности Л5-протеазы) и фланкирующими ген последовательностями геномной ДНК. Плазмиду вводили в клетки *Lysobacter* sp. XL1 методом электропорации с отбором меродиплоидных клонов. Об интеграции плазмиды в геном *Lysobacter* sp. XL1 свидетельствовала устойчивость трансформантов к гентамицину (маркер плазмиды) и тетрациклину (маркер кассеты, встроенный в участок делеции) и чувствительностью к сахарозе. В результате разрешения меродиплоидов отобраны Suc^R Tc^R Gm^S клоны, в которых произошел двойной обмен между мутантным и диким аллелями гена *alpB*. Наличие делеции в гене *alpB* подтверждено методом ПЦР с использованием специфических праймеров и секвенированием.

Анализ бактериолитической активности отобранных делеционных мутантов выявил, что по сравнению с диким типом литическая активность мутантного штамма была в 1,5 раза меньше. Из равных объемов культуры мутантного штамма *Lysobacter* sp. XL1 и дикого типа были выделены препараты везикул методом дифференциального центрифугирования. Методом электронной микроскопии, а также аналитическими методами установлено, что мутантный штамм образует меньшее количество везикул. Данный результат свидетельствует в пользу того, что бактериолитический белок Л5 действительно принимает участие в процессе формирования везикул *Lysobacter* sp. XL1. Полученные результаты позволяют предложить новый механизм биогенеза везикул у грамотрицательных бактерий.

В целом, успешный нокаут гена *alpB Lysobacter* sp. XL1 открывает многие перспективы как в изучении особенностей секреции бактериолитических ферментов и регуляции их генов, так и в создании гомологичной системы экспрессии литических белков, значимых для биомедицины.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Проект № 19–74–0086).

ЛИТЕРАТУРА

1. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Suzina N.E., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of Lysobacter sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles // FEBS J. – 2008. – V.275. – № 15. – p. 3827–3835.
2. Kudryakova I.V., Suzina N.E., Vasilyeva N.V. Biogenesis of Lysobacter sp. XL1 vesicles // FEMS Microbiol Lett. – 2015. – V.362. – № 18. – fnv137.
3. Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Винокурова Н.Г., Шишкова Н.А., Васильева Н.В. Изучение факторов биогенеза везикул Lysobacter sp. XL1 // Биохимия. – 2017. – Т.82. – № 4. – с. 677–686.
4. Kudryakova I.V., Gabdulkhakov A.G., Tishchenko S.V., Lysanskaya V. Ya., Suzina N.E., Tsfasman I.M., Afoshin A.S., Vasilyeva N.V. Structural and functional properties of antimicrobial protein L5 of Lysobacter sp. XL1 // Appl Microbiol Biotechnol. – 2018. – V.102. – № 23. – p. 10043–10053.

УДК 640

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ, ВОССТАНОВЛЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ЛЮДЕЙ СТАРШЕ 40 ЛЕТ

А.В. Печерский[1]*, В.И. Печерский, А.Б. Смолянинов[2], В.Н. Вильянинов[3], Ш.Ф. Адылов[2], А.Ю. Шмелёв[1], О.В. Печерская[1], В.Ф. Семиглазов[4]

[1] Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,Россия
[2] Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия
[3] Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия
[4] НИИ онкологии им. профессора Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия

Цель исследования – изучение связи между снижением пула плюрипотентных стволовых клеток, обусловленного этим нарушения обновления (регенерации) тканей, и повышением риска развития онкологических заболеваний у людей старше 40 лет (повышением образования у них промоторных факторов канцерогенеза).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В первой части исследование проводилось у 11 больных раком почки, мочевого пузыря, предстательной железы III–IV стадии заболевания в возрасте от 54 до 76 лет. Во второй части исследование проводилось у 4-х пациентов 60–82 лет, которым в целях восстановления обновления тканей (регенерации) было проведено от 4 до 7 переливаний мононуклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 19–23 лет одинакового пола и групп крови с реципиентами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой части исследования через 1 месяц после проведения химиотерапии или таргетной терапии у всех 11 онкологических больных развивалась лейкопения, сопровождавшаяся увеличением содержания основного фактора роста фибробластов (FGFb) в крови в среднем в 1,74 раза. Из них у 4-х пациентов наблюдалось увеличение уровня человеческого васкулоэндотелиального фактора роста А (human VEGF-A) в среднем в 1,25 раза, у 3-х пациентов – увеличение уровня эпидермального фактора роста человека (human EGF) в среднем в 1,13 раза. Во второй части исследования у 4-х пациентов через 3–6 месяцев после завершения курса из 4–7 трансфузий мононуклеарной фракции периферической крови содержание ГКП CD34+ периферической крови увеличилось в среднем в 3,25 раза до уровня молодых лиц, а уровень FGFb уменьшился в среднем в 1,78 раза. Из них у 2-х пациентов уровень human VEGF-A уменьшился в среднем в 1,48 раза, у 3-х пациентов уровень human EGF уменьшился в среднем в 4,12 раза. В буккальном эпителии у всех 4-х пациентов экспрессия p53 снизилась в среднем в 6,02 раза, у 3-х из них – экспрессия Bcl-2 снизилась в среднем в 60,0 раз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушение обновления тканей (регенерации) является основной причиной канцерогенеза у людей старше 40 лет. Недостаточность возмещения погибших старых клеток молодыми клетками-предшественниками приводит к компенсаторному избыточному образованию клеточных ростовых факторов (промоторных факторов канцерогенеза), стимулирующих деление оставшихся клеток. Избыточную стимуляцию митотической активности у людей старше 40 лет можно снизить до нормального уровня посредством восстановления численности пула плюрипотентных стволовых клеток при переливании мононуклеарной фракции периферической крови от молодых доноров 18–23 лет одних с реципиентом групп крови и пола. Обновление донорскими плюрипотентными стволовыми клетками эпителиально-ретикулярных клеток тимуса, обучающих Т-хелперы, приводит к восприятию иммунной системой реципиента тканеспецифичных атигенов донора как «своё». Развивается иммунологическая толерантность, при которой донорские плюрипотентные стволовые клетки и клетки, в которые они дифференцируются, не отторгаются иммунной системой реципиента. Теоритически после предварительной трансфузии мононуклеарной фракции периферической крови, содержащей плюрипотентные стволовые клетки, последующая трансплантация тканей и органов от того же донора не будет приводить к их отторжению (Pechersky A.V. et al., 2015, Патент РФ № 2350340).

ЛИТЕРАТУРА

1. Pechersky AV, et al.Several aspects of the regeneration process carried out by means of pluripotent stem cells. *Tsitologiya* 2008; 50(6): 511–520.
2. Pechersky AV, et al.. Regeneration and carcinogenesis. *Journal of Stem Cells* 2015; 10(4): 255–270.
3. Pechersky AV, et al.. Immune system and regeneration. *Journal of Stem Cells* 2016; 11 (2): 69–87.

УДК 640

АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ МОДЕЛЬНОГО ГЕНА GFP У КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЛАВОНОИДОВ

О.В. Чубукова, З.Р. Вершинина, Р.Т. Матниязов, Ал. Х. Баймиев

Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, Россия

Биологическая азотфиксация является природным процессом чрезвычайной важности. Наибольший вклад в него вносит симбиоз, образованный бобовыми растениями и почвенными грамотрицательными клубеньковыми бактериями с общим названием ризобии (Andrews , 2017). Также ранее было показано, что ризобии могут выступать в качестве PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), вступая в ассоциативные взаимодействия с небобовыми растениями, такими как томат, пшеница и др., улучшая рост последних за счет различных механизмов (Mehboob et al., 2012).

В настоящее время ризобии нашли широкое применение в качестве биоудобрений в сельском хозяйстве. Эффективность этих бактерий зависит в большой степени от способности используемых «производственных» штаммов выдерживать конкурентную борьбу за экологическую нишу с местными ризосферными бактериями. Одним из способов повышения выживаемости вносимых полезных бактерий может быть использование регулируемого включения целевых генов, экспрессия которых индуцируется корневыми выделениями растений. Нами предлагается использование механизма регуляции экспресии nod генов ризобий.

На предварительном этапе формирования бобово-ризобиального симбиоза происходит накопление клубеньковых бактерий в ризосфере растения за счет хемотаксиса ризобий на флавоноиды, содержащиеся в корневых выделениях растений (Liu , Murray, 2016). Флавоноиды взаимодействуют с белком NodD на поверхности клубеньковых бактерий, продуктом единственного конститутивно экспрессирующегося nod-гена, вследствие чего происходит активация транскрипции остальных nod-генов, отвечающих за синтез Nod-факторов (Тихонович, Проворов, 2009). Также оказалось, что nodD ризобий проявляет себя как ген хозяйской специфичности, поскольку одни и те же флавоноиды с разной эффективностью индуцируют nodD различных видов ризобий. (Suominen et al., 2003). Nod-гены в геномах клубеньковых бактерий расположены компактно под общим промотором в виде «nod-box». У Rhizobium leguminosarum и Rhizobium galegae гены nodD имеют соседнее расположение с участками «nod-box» и при этом имеют разное направление кодирования (Suominen, 2001). Подобное расположение целевых генов позволяет клонировать их в одном фрагменте ДНК.

Цель работы – получение индуцируемых флавоноидами генно-инженерных конструкций широкого круга хозяев, которые позволяют клонировать целевые гены под контролем промотора NodA гена вместе с геном nodD R.leguminosarum bv viciae и R. galegae.

Для создания генно-инженерных конструкций использовали вектор pTurboGFP-b («Евроген», Россия) и вектор широкого круга хозяев pJN105 («Addgene», США). Для получения генно-инженерных конструкций были использованы методы молекулярного клонирования. Полученные плазмиды проверяли методом ПЦР, секвенированием ДНК.

Нами были амплифицированы высокоточной Pfu-полимеразой фрагменты ДНК R. leguminosarum bv trifoli и R. galegae, содержащие полноразмерную последовательность гена nodD и промоторный участок «nod-box» с помощью праймеров, в состав которых были введены сайты рестрикции BglII. Дополнительно в состав заднего праймера был введен ATG кодон и в рамке считывания после него сайт SmaI. Размер амплифицированного продукт составил 1608 и 1432 п. н., соответственно. Далее под промотор «nod-box» был клонирован репортерный ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP. Для этого амплификат был порезан рестриктазой BglII и клонирован по сайту BamHI в векторе pTurboGFP. Фрагмент, включающий nodD+промотор «nod-box»+TurboGFP, из конструкции pTurboNodDGFP был переклонирован по сайтам рестрикции XhoI и DraI в плазмиду широкого круга хозяев pJN105.

Таким образом, нами были получены генно-инженерные конструкции pJNNodDGFP1 и pJNNodDGFP2, которые содержат гены NodD R.leguminosarum bv. trifoli и R. galegae соотвественно, с собственным промотором и GFP, под управлением промотора гена nodA. Данные плазмиды были трансформированы в штаммы ризобий R. galegae CIAM 0702 и R. leguminosarum bv. viciae.

Далее планируется исследовать условия активации экспрессии целевого гена GFP в рекомбинантных штаммах ризобий с использованием синтетических флавоноидов. После подбора условий успешной активации экспрессии в дальнейшем под регуляцию промотора nod-box нами предполагается встраивать кодирующие последовательности других целевых генов.

Использование данных векторных конструкций с GFP позволит визуально оценивать эффективность работы и подбирать оптимальные условия активации регуляторной системы при разных условиях существования трансгенных микроорганизмов: в свободноживущем состоянии, при культивировании на питательных средах с добавлением экссудатов корней различных растений, при взаимодействии трансгенных бактерий с поверхностями корней бобовых и небобовых растений.

Работа была выполнена в рамках госзадания (тема № АААА-А16–116020350028–4) при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 18–34–00033 мол_а, № 18–34–20004 мол_а_вед.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andrews M., et al. Specificity in legume-rhizobia symbioses // Int. J. Mol. Sci. 2017. 18(4): 705. doi:10.3390/ijms18040705.
2. Mehboob I., Naveed M., Zahir A.Z. Ashraf M. Potential of Rhizobia for Sustainable Production of Non-legumes // Crop Production for Agricultural Improvement. Springer Netherlands. 2012. P.659–704.
3. C. Liu , J.D. Murray. The Role of flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update // Plants (Basel). 2016. 5(3):33. doi: 10.3390/plants5030033.
4. Тихонович, И.А., Проворов, Н.А. (2009). Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. Издательство Санкт-Петербургского университета. С. 209.
5. Suominen L. at al. Activation of the nodA promoter by the nodD genes of Rhizobium galegae induced by synthetic flavonoids or Galega orientalis root exudate // FEMS Microbiol. Lett. 2003. V. 219(2). P. 225–232.
6. Suominen L., Roos C., Lortet G., Paulin L., Lindström K. Identification and structure of the Rhizobium galegae common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer // Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18(6). P. 907–916..

УДК 57.577

ДЕТЕКЦИЯ ПРОМУТАГЕННЫХ ДЕЗАМИНАЗ СЕМЕЙСТВА AID/APOBEC В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

Е.С. Шилов, А.А. Власова, О.Н. Шилова

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

Цитидин-дезаминазы семейства AID/APOBEC являются ключевыми участниками процессов индуцированного мутагенеза и редактирования РНК. Их повышенная активность свойственна клеткам многих опухолей и является одним из механизмов геномной нестабильности. В данной работе был определен уровень экспрессии генов цитидин-дезаминаз AID/APOBEC человека в трех клеточных линях В-лимфобластного происхождения: IM-9 (CCL-159), Daudi (CCL-213) RPMI 8226 (CCL-155). IM-9 по своему происхождению представляют собой клетки множественной миеломы, трансформированные вирусом EBV, Daudi ведут происхождение от лимфомы Бёркита, RPMI являются производными плазмацитомы, в качестве контроля специфичности экспрессии дополнительно использовали линию HeLa (производная рака шейки матки). В работе анализировался уровень экспрессии характерной для активированных В-лимфоцитов дезаминазы AID (ключевой фермент в процессах переключения изотипа антител и соматического мутагенеза, кодируется геном *Aicda*), а также APOBEC1, APOBEC2 и APOBEC3 (восемь паралогов, обозначаются буквами от A до H).

Было показано, что в ряду RPMI 8226 – Daudi – IM-9 уровень экспрессии AID при каждом переходе повышается примерно на порядок, в клетках HeLa экспрессия AID отсутствует. Экспрессия APOBEC1 и APOBEC2 отсутствует во всех проанализированных клеточных линиях, а экспрессия APOBEC3 несколько варьирует в зависимости от паралога и клеточной линии, но в целом демонстрирует стабильный паттерн – преобладание паралогов 3C, 3D и 3G. Специфической для линии Daudi была экспрессия APOBEC 3F, а для линии IM-9 – соответственно APOBEC 3H, линии RPMI 8226 и HeLa других APOBEC3-дезаминаз помимо 3C, 3D и 3G не экспрессировали. При этом экспрессия дезаминаз в клетках лимфоидных линий являлась конститутивной и не зависела от сигналов активации через рецепторы врожденного иммунитета – активация клеток при помощи липополисахарида, полного адъюванта Фрейнда и тотального лизата кишечной палочки не приводила к принципиальным изменениям паттерна экспрессии.

В работе показано, что исходный характерный для В-лимфоцитов паттерн экспрессии дезаминаз AID/APOBEC сохраняется в клеточных линиях, однако уровень экспрессии AID в разных лимфобластоидных линиях может значительно варьировать, влияя на их нестабильность генома.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19–34–51014

УДК 577.21

ВЕДУЩАЯ РОЛЬ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ POLQB CRISPR/CAS9-В ИНДУЦИРОВАННОМ ГЕННОМ ТАРГЕТИНГЕ У ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЕНОЙ ВОДОРОСЛИ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

И.А. Сизова[1,2], В.И. Шалгуев[1,2], S. Kelterborn[3], P. Hegemann[3], В.Н. Вербенко[1,2]

[1] «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

[2] Курчатовский Геномный центр-ПИЯФ, Гатчина, Россия

[3] Institute of Biology, Experimental Biophysics, Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Известно, что двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР), внесенные в геном сайт-направленными эндонуклеазамисистемы CRISPRCas, могут восстанавливаться посредством гомологичной рекомбинации (HR), классического негомологичного соединения концов (cNHEJ) и альтернативного соединения концов (altEL/TMEJ). Целью нашей работы является выяснение ролипутей репарации cNHEJ и TMEJ в восстановлении ДЦР, внесенных эндонуклеазойCRISPRSpCas9/gRNA, для повышения эффективности редактирования генов у одноклеточной зеленой микроводоросли Chlamydomonasreinhardtii. С использованием SpCas9-опосредованного мутагенеза, проведенного по нашей методике (Greineretal., 2017), были инактивированы ключевые гены KU80, KU70 пути cNHEJ и ген POLQпутиTMEJу штамма CC125 дикого типа и трансгенного штамма CC3403-D5, содержащего дефектный ген устойчивости к паромомицину (mut-aphVIII). Инактивация генов репарации была подтверждена фенотипически по повышению чувствительностимутантных клеток к ДНК-повреждающему антибиотику зеоцину (Zc). Причем клеткиpolQ были более чувствительны к Zc, чем клеткиku80, ku70, что указывало на доминирующую роль пути TMEJв репарациионреждений ДНК. Клетки мутантныхштаммовku80, ku70, polQбыли использованы в качестве реципиентов для сайт-направленного мутагенеза и генного таргетингапутем трансформации с использованием препаратов, содержащих рибонуклеопротеиновые комплексы (RNP) SpCas9/gRNA, а также, при необходимости, селективные векторы для предварительного отбора клонов и донорные ДНК-матрицы для модификации генов. Анализнуклеотидных последовательностейSpCas9- индуцированных мутаций в гене APTпоказал, что у штамма дикого типа мутагенная репарация ДЦР является результатом комбинацииактивностей путей TMEJ и cNHEJ. Это следовало из того, что мутации включали специфические нуклеотидные участки – “подписи” характерные для репарации по пути TMEJ, а именно, делеции между участками микрогомологии и “шаблонные” вставки, а также 1–2 нуклеотидые вставки/делеции/обмены характерные для репарации посредствомNHEJ. Инактивация гена POLQ приводила к почти полному подавлению встраивания трансформированной плазмиды в случайные точки генома, что не наблюдалосьу мутантов ku80, ku70, у которых частота случайных вставок плазмиднойДНК практически не отличалась от клеток дикого типа. Генный таргетингуштамма дикого типа и мутантов проводили с использованием донорных одноцепочечныхолигонуклеотидов (ssODN) или плазмидной ДНК, содержащейпротяженный (~1,4 т. п.н.) фрагмент ДНК гомологичный гену-мишени, и RNP SpCas9/gRNA илиLbCas12a/gRNA. Оказалось, что инактивация гена KU80 приводила к стимуляции репарации дефектного гена mut-aphVIII и повышению частоты инактивации гена SNRK2.2 в результате целевого встраивания короткого фрагмента FLAG, только при использовании донаровssODN. Напротив, у мутанта polQ штамма CC3403-D5 инактивация гена POLQ приводила к подавлению репарации гена mut-aphVIII при использовании доноров ssODN. Тем не менее, у polQмутантаген mut-aphVIII может быть восстановлен посредством HR с протяженным фрагментом гена APHVIII, хотя и с частотой, которая в >10 раз ниже, чем у штамма дикого типа. Это показывает, что существует вклад как пути TMEJ, так и пути HRв репарацию ДЦР, причем роль TMEJ преобладает. Таким образом, наши результаты показали, что при редактировании генов с использованием эндонуклеазыSpCas9 в репарации хромосомных ДЦР принимают участие пути cNHEJ и TMEJ, а встраивание плазмидной ДНК в случайные точки генома и генный таргетинг посредством гомологичной репарации преимущественно происходят по пути TMEJ. При этом полимераза Theta POLQ может быть ответственной за большинство случайных и целевых вставок фрагментов ДНК в ядерный геном.

Работа выполнена как часть программы Курчатовского Геномного центра «Курчатовский Геномный центр-ПИЯФ – ПИЯФ» (соглашение No. 075–15–2019–1663), а также была частично поддержана грантом РФФИ 17–54–45088 ИНД_а (2017–2018 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

Greiner A, Kelterborn S, Evers H, Kreimer G, Sizova I, Hegemann P. Targeting of Photoreceptor Genes in Chlamydomonasreinhardtii via Zinc-Finger Nucleases and CRISPR/Cas9. PlantCell. 2017, 29(10):2498–2518.

УДК 57.577

ДЕЗАМИНАЗЫ СЕМЕЙСТВА AID/APOBEC И СЕЛЕКЦИЯ НОНСЕНС-ТРАНЗИЦИЙ У РНК-ВИРУСОВ

Е.С. Шилов, Л.Г. Данилов, А.А. Власова, В.С. Вьюшков

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

Цитидин-дезаминазы семейства AID/APOBEC вносят существенный вклад в работу противовирусных систем клеток, поскольку способны вносить мутации в однонитевые нуклеиновые кислоты, в том числе вирусные. При этом мишенями дезаминаз APOBEC обычно являются динуклеотиды CC и TC. Отбор, направленный на уменьшение частоты таких динуклеотидов в геноме, позволяет вирусу уменьшить эффективность клеточных систем защиты и потенциально выгоден для патогена, однако для некоторых вирусов высокий уровень мутагенеза позволяет менять последовательность антигенных эпитопов и уходить от иммунного ответа. Поэтому с точки зрения последствий активности цитидин-дезаминаз хозяина для размножения патогена вирусы можно разделить на две группы: для первой группы высокий уровень мутагенеза не является проблемой, для второй группы минусы от катализируемых белками APOBEC транзиций C→U (и возникновений большого количества мутаций, в том числе негативных) превышают потенциальную пользу. При этом наиболее радикально и однозначно негативно на размножение вируса влияют нонсенс-транзиции: замены C→U в кодонах CGA, CAG и CAA в плюс-цепи, и замены C→U в антикодоне CCA в минус-цепи (соответствует кодону UGG плюс-цепи).

В работе были проанализированы относительные частоты кодонов CGA (один из 6 аргининовых), CAG, CAA (оба кодируют глутамин) и UGG (кодирует триптофан) в геномах вирусов человека (сгруппированных в соответствии с классификацией Балтимора). Для сравнения использовались частоты тех же кодонов в геноме человека. Для кодона CGA использовался процент использования относительно всех аргининовых кодонов, для кодонов CAG + CAA и UGG – соответственно доля глутамина и триптофана относительно суммарной длины кодируемых последовательностей. Результаты суммированы в таблице ниже:

Геном	UGG (Trp/размер)	CAG+CAA (Gln/размер)	CGA/Arg	Размер
Человек	0.0128	0.0464	0.1118	19843791
плюс-РНК вирусы (n=22)	0.0179	0.0344	0.0662	4073
минус-РНК вирусы (n=23)	0.0134	0.0359	0.0958	4156
дцДНК вирусы (n=21)	0.0126	0.0401	0.0934	23888
дцРНК вирусы (n=5)	0.0104	0.0364	0.1110	6546
оцДНК вирусы (n=9)	0.0232	0.0526	0.1232	1222
Ретровирусы (n=3)	0.0217	0.0593	0.1377	3313

Ретровирусы и вирусы с оцДНК имеют достоверно более высокую частоту всех четырех кодонов, способных к нонсенс-транзициям, по сравнению с человеком и другими группами вирусов, что указывает на положительную роль APOBEC хозяина в их жизненном цикле, дцДНК вирусы не показывают отличий от человека по частотам кодонов. Как плюс-РНК, так и минус-РНК вирусы показывают уменьшение частоты кодонов с возможными нонсенс-транзициями в плюс-нити (CAA. CAG, CGA) и возможную селекцию геномов против потенциальных мишеней дезаминаз APOBEC.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19–34–51014

УДК 66.047

ПОИСК ГЕНОВ *CLE*, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ ФЛОЭМЫ У КАРТОФЕЛЯ

М.С. Ганчева, И.Е. Додуева, Л.А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Клубень у картофеля выполняет запасающую функцию, аккумулируя в своих клетках крахмал. Для выполнения своей функции он задействует флоэму – проводящую ткань, вовлеченную в транспорт фотоассимилятов из листьев в клубни. Для того чтобы полноценно снабжать все образующиеся клетки ассимилятами, в клубне образуются дополнительные тяжи флоэмы, которые формируют сеть, пронизывающую весь клубень. Помимо сахаров, по флоэме также происходит и транспорт других веществ, в том числе участвующих в регуляции самого процесса клубнеобразования. Нарушения в системе транспортировки, связанные с дефектами в развитии элементов флоэмы, ведут к значительному снижению биомассы растения (Ren et al., 2019). Выявление генов, вовлеченных в развитие флоэмы, а также управление их экспрессией позволит регулировать этот процесс и повышать продуктивность картофеля. Среди уже выявленных регуляторов образования флоэмы, наибольший интерес представляют гормоны, а точнее гормоны пептидной природы CLE. Эти пептиды вовлечены в регуляцию большого количества процессов развития растений, в том числе и в образование проводящих систем. Так, у модельного организма генетки растений, *Arabidopsis thaliana*, в развитие флоэмы вовлечен пептид CLE25 – его ген экспрессируется во флоэме, а сам пептид является позитивным регулятором развития флоэмы. Мутация в этом гене вызывала задержку в дифференцировке элементов флоэмы, транспорт фотоассимилятов нарушался, в результате чего биомасса растений снижалась (Ren et al., 2019). У картофеля, однако, гены *CLE* все еще не изучались, поэтому мы в первую очередь занялись поиском гомолога гена *CLE25*. В результате филогенетического анализа, у картофеля их было выявлено два, названные нами CLE6 (PGSC0003DMT400010739) и CLE19 (PGSC0003DMT400058287). При этом во флоэме проростков картофеля (Lin et al., 2015) было обнаружено значительное количество транскриптов только *CLE19*, но не *CLE6*. Также во флоэме картофеля присутствовали транскрипты гена PGSC0003DMT400072001, названного нами *CLE12*. Этот ген имеет большое сходство с генами *CLE41* и *CLE44 Arabidopsis thaliana*, которые экспрессируются также во флоэме и кодируют пептиды, вовлеченные в регуляцию деления клеток в росте утолщением (Kondo, Fukuda, 2015). Таким образом, в развитие клубня могут быть вовлечены минимум два пептида – CLE19, возможно, вовлечен в образование флоэмы, в которой начинает экспрессироваться *CLE12* для индукции делений клеток и дальнейшего утолщения клубня.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20–316–80004.

ЛИТЕРАТУРА

Ren SC, Song XF, Chen WQ, Lu R, Lucas WJ, Liu CM. CLE25 peptide regulates phloem initiation in Arabidopsis through a CLERK-CLV2 receptor complex. J Integr Plant Biol. 2019; 61(10):1043–1061. doi:10.1111/jipb.12846

Lin T, Lashbrook CC, Cho SK, et al. Transcriptional analysis of phloem-associated cells of potato. BMC Genomics. 2015; 16(1):665. Published 2015 Sep 3. doi:10.1186/s12864–015–1844–2

Kondo Y, Fukuda H. The TDIF signaling network. Curr Opin Plant Biol. 2015; 28:106–110. doi:10.1016/j.pbi.2015.10.002

УДК 573.6:631.527.8: [635.9:582.931.4]

ВЛИЯНИЕ СВЕТОДИОДНОГО ОСВЕЩЕНИЯ НА ФОРМИРОВАНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ СИРЕНИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Т.В. Никонович, А.В. Константинов, И.Е. Баева, Т.В. Кардис, Н.Г. Брель, А.В. Зубарев

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, г. Горки, Беларусь

Сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.) – популярное садовое растение. В ботанических садах и питомниках сирень размножают зелеными черенками или прививками, однако не все сорта хорошо размножаются этими способами. Применение методов *in vitro* открывает большую перспективу для успешного размножения и сохранения ценных сортов сирени. В регулируемых лабораторных условиях, возможно, контролировать все факторы, как химические, так и физические, от которых зависит рост и развитие растений. Одним из наиболее значимых физических факторов, влияющих на регенерационные процессы *in vitro*, является освещение. Возрастающее значение энергосберегающих технологий актуализирует использование светодиодных светильников, обеспечивающих возможность моделирования условий освещения с широким диапазоном характеристик, необходимых для оптимизации функционирования фотосистем растений при искусственном культивировании [1,2].

Цель работы – выявление особенностей влияния светодиодного освещения на формирование растений-регенерантов сирени в условиях *in vitro*.

Объектами исследования выступали три сорта сирени: Бюффон, Фрэнк Патерсон, Лунный свет. Источниками света являлись светодиодные светильники, в которых отношение ППФ (плотность потока фотонов в диапазоне 400–700 нм) оранжево-красной полосы (607–694 нм) к ППФ синей полосы (400–495 нм) варьировалось от 1 до 20. Всего 13 вариантов освещения. В качестве контроля использовались люминесцентные лампы с ППФ – 38,2±13,4 мкмоль /($м^2$·с).

В результате сравнительного анализа морфометрических параметров растений-регенерантов сортов сирени установлено, что в зависимости от условий освещения значительно изменялись диапазоны варьирования размерных показателей по высоте растения, количеству листьев, площади листа, длине и количеству корней. Также выявлены существенные генотипические различия в характере ответа растений сирени на условия освещения. Заметное стимулирующее влияние на высоту растений-регенерантов трех сортов оказала подсветка светодиодами зеленого цвета, при которой растения превышали контроль в среднем на 5–7 см. Однако, по количеству листьев и размеру листовой пластинки предпочтительными были варианты освещения с потоком фотонов на уровне 66,5 мкмоль/с и 73,9 мкмоль/с, при использовании которых размерные показатели превышали контроль в 1,7–2 раза. Состояние корневой системы, ее длина и количество являются значимыми признаками, при подготовке растений к адаптации *in vivo*. Выявлено, что при вариантах освещения с эффективностью излучения фотонов 1,85–2,05 мкмоль/(с·Вт) показатели длины и количества корней у регенерантов превышали значения указанных морфометрических признаков, полученных для корневых систем растений контрольной группы.

Установлено существенное влияние различных вариантов освещения на состояние растений-регенерантов сирени. Выявлена сортовая специфика в отношении качества света. Так для сортов Бюффон и Фрэнк Патерсон лучшим являлся вариант освещения с потоком фотонов 69,3 мкмоль/с и спектральным соотношением красный / синий 6,9. Для сорта Лунный свет по совокупности признаков наиболее приемлемым определен вариант освещения с потоком фотонов в диапазоне волн 400–800 нм – 73,9 мкмоль/с.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований, договор с БРФФИ № Б19–112.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никонович, Т.В. Влияние спектрального состава света на рост и развитие растений-регенерантов винограда в период адаптации к условиям *in vivo* / Т.В. Никонович, А.В. Левый, В.В. Французенок // «Вестник БГСХА». – Горки, 2012. № 2. – С. 70–75.

2. Никонович, Т.В. Анализ сортовых различий растений-регенерантов картофеля *in vitro* при использовании светодиодных светильников / Т.В. Никонович, А.В. Кильчевский, Т.В. Кардис, В.Л. Филипеня, О.В. Чижик, Ю.В. Трофимов, В.И. Цвирко, Е.В. Керножицкий // «Вестник БГСХА». – Горки, 2018. № 1. – С. 73–79.

УДК 66.047

ГЕНЫ *CEP* У КАРТОФЕЛЯ: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ

Е.А. Рутковская, М.С. Ганчева, Л.О. Полюшкевич, М.А. Лебедева, И.Е. Додуева, Л.А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Поглощение азота корнями определяет рост и продуктивность большинства растений. В почвах азот присутствует в формах нитрата, аммония, аминокислот, белков и других азотсодержащих веществ. В хорошо аэрированных почвах нитрификация проходит быстро и нитрат является основным источником азота. В природе концентрация нитрата в среде часто менее 1 мМ, в то же время в удобряемых сельскохозяйственных почвах его концентрация может достигать 70 мМ. Нитрат легко растворяется в почвенном растворе и эта мобильность приводит к резкому изменению концентрации, например, в пахотном поле, где концентрация нитрата может варьировать в 100 раз. Очевидно, что растения должны приспосабливаться к этим изменяющимся условиям для оптимизации поглощения нитрата. Это может происходить благодаря изменению архитектуры корня, корректировке поглощения и транспорта, а также за счет оптимизации метаболизма.

На модельном объекте генетики растений Arabidopsis thaliana было показано, что в передаче сигнала о недостатке азота в среде участвуют гормоны белковой природы, названные C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE (CEP). Они относятся к сигнальным пептидам и содержат короткий консервативный домен около С-конца, который вырезается, пост-трансляционно модифицируется и в результате становится зрелым пептидом CEP из 15 аминокислот. Гены, кодирующие пептиды CEP, присутствуют только у семенных растений и участвуют в развитии корневой системы и ответной реакции на азот (Roberts et al., 2013). В геноме Arabidopsis thaliana выявлено 15 генов CEP, экспрессирующихся в стеле боковых корней, и экспрессия семи из них повышается при голодании по азоту (Tabata et al., 2014). Передача сигнала о нехватке азота выглядит следующим образом: начинается экспрессия генов, кодирующих пептиды CEP, далее зрелые пептиды выбрасываются в апопласт и по сосудам ксилемы переносятся из корней в листья, где взаимодействуют с рецепторами – рецепторными киназами с лейцин-богатыми повторами CEP RECEPTOR1 (CEPR1) и CEPR2, активируя еще неизвестный сигнальный путь, мишенью которого являются гены CEP DOWNSTREAM 1 (CEPD1) и CEPD2, кодирующие белки длиной 99 и 102 АК. Эти белки транспортируются по флоэме из листьев в корни и активируют экспрессию генов нитратных транспортеров, таких как NRT2.1, для компенсации азотного голодания. Интересно, что индукция экспрессии NRT2.1 наблюдается только в корнях, находящихся в наиболее богатых по азоту условиях, хотя CEPD присутствуют во всей корневой системе (Ohkubo et al., 2017).

Функции пептидов CEP связаны с регуляцией роста стебля и корня, а также развития боковых корней и клубеньков в ответ на дефицит азота. Так, у Arabidopsis thaliana сверхэкспрессия CEP1 тормозит рост корня, особенно в условиях низкого содержания азота и высокого содержания CO2. У бобового растения, Medicago truncatula, сверхэкспрессия CEP1 и обработка синтетическим пептидом CEP1 вызывает снижение количества боковых корней и увеличение количества клубеньков (Imin et al., 2013).

В нашей работе впервые запланировано изучение роли пептидов CEP в развитии клубня картофеля. Картофель – одна из самых распространенных культур, которая возделывается почти во всем мире. В пищу у картофеля употребляются клубни – утолщенные видоизмененные подземные побеги (столоны). Одним из факторов, влияющих на развитие клубней, является содержание азота в среде, высокая концентрация которого задерживает клубнеобразование. Однако роль пептидов CEP в клубнеобразовании картофеля еще не изучена.

В результате проделанной нами работы были обнаружены 5 генов CEP у картофеля, Solanum tuberosum, (StCEP): StCEP1 (PGSC0003DMT400065507), StCEP3.1 (PGSC0003DMT400091086), StCEP3.2 (PGSC0003DMT400050850), StCEP14 (PGSC0003DMT400073300) и StCEP15 (PGSC0003DMT400028201). На основании филогенетического анализа было выявлено, что гомологами пептидов, закодированных этими генами, являются AtCEP1, AtCEP3, AtCEP14 и AtCEP15, соответственно. Помимо этого, мы выявили гены, кодирующие предположительно мишени пептидов CEP – гены CEPD (PGSC0003DMT400013650, PGSC0003DMT400029593, PGSC0003DMT400029673, названные нами StCEPD1, 2, 3, соответственно).

Для предварительной оценки наличия транскриптов генов CEP в различных частях картофеля использовались значения FPKM из базы данных SpudDB (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/), полученные по транскриптомным данным картофеля. По этим данным, транскрипты *CEP1* наблюдались в различных органах цветка и плодах.

В то же время, транскрипты *StCEP 3.1, StCEP 3.2, StCEP 14* и *StCEP15* наблюдаются в корнях, столонах и клубнях картофеля, что может свидетельствовать о возможном участии этих генов в клубнеобразовании картофеля и развитии его корневой системы.

Для анализа изменения уровней экспрессии генов StCEP картофеля в зависимости от наличия азота в среде нами была проведена ПЦР в реальном времени. Для реализации этой задачи черенки картофеля сорта Дезире растили in vitro на чашках Петри на двух средах – с азотом и без. Использовали модифицированную среду Мурасиге-Скуга, где в качестве источника азота использовались 10 мМ KNO3 и 10 мМ NH4 Cl и ½ других элементов, а в среде без азота – 10 мМ KCl и ½ других элементов, как это было предложено в статье Ohkubo et al., 2017. На чашку выкладывали по 5 черенков картофеля на среду с азотом или без него и растили 4 недели, пересаживая на свежие среды каждые 7 дней. По прошествии 4 недель, растения пересаживали на среды следующим образом – со среды с азотом на среду с азотом (++) и без азота (±); со среды без азота на среду с азотом (-+) и без азота (–). Через 48 часов после пересадки корни растений отрезали и замораживали в жидком азоте и в дальнейшем использовали для выделения РНК, постановки обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. В результате было выявлено, что уровни экспрессии только 2 генов *StCEP* изменялись при росте на средах с различным содержанием азота – это гены *StCEP3.1* и *StCEP3.2* – их уровень экспрессии был выше при росте растений на среде без азота по сравнению с экспрессией на среде с азотом. Это означает, что у картофеля, как и у *Arabidopsis thaliana*, экспрессия генов *CEP* ассоциирована с голоданием по азоту.

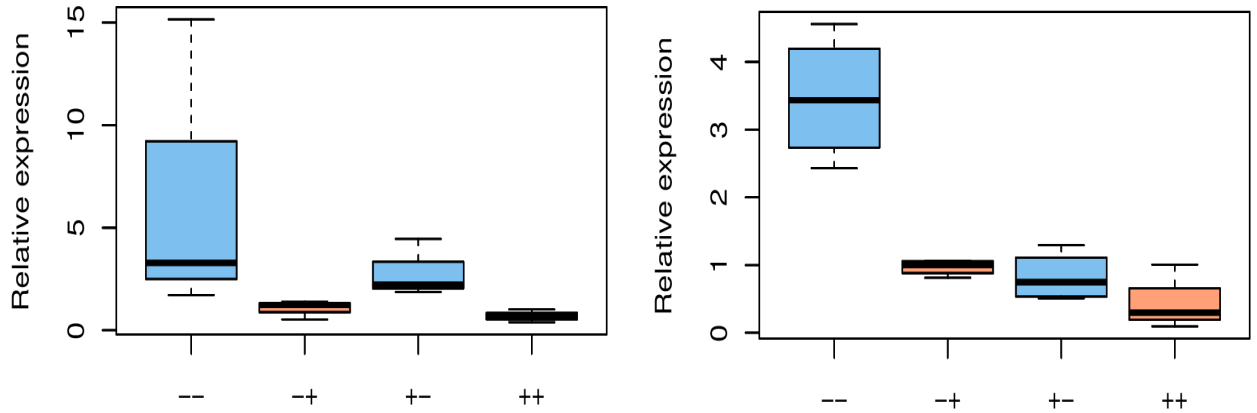


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии генов StCEP3.1 и StCEP3.2 на средах с азотом и без. Данные представлены по 4 биологическим повторностям. В качестве референсного гена использован ген убиквитина. Графики построены с использованием функции boxplot в программе R

Для анализа активности промоторов генов *StCEP3.1* и *St*CEP3.2 были выделены промоторные участки этих генов (2–3 тысячи нуклеотидов до старт-кодона). Далее промоторные области были помещены перед геном GUS, кодирующим ген глюкуронидазы. Таким образом, в случае посадки транскрипционных факторов на промоторы генов StCEP3.1 и StCEP3.2 в клетках активируется экспрессия репортерного гена GUS, кодирующего фермент, обуславливающий синее окрашивание при взаимодействии со специфическим субстратом. Мы трансформировали растения картофеля с помощью Agrobacterium rhizigenes для получения композитных растений с трансгенными корнями и показали, что промоторы этих генов активны в стеле корня (Рис. 2).

Таким образом, гены StCEP3.1 и StCEP3.2, по нашим данным, экспрессируются в ответ на отсутствие азота в среде, их промоторы, так же как и у Arabidopsis thaliana, активны в проводящем цилиндре корня и, возможно, эти гены вовлечены в регуляцию клубнеобразования благодаря передаче сигнала о содержании азота в среде. Гомологи этих генов у бобовых растений активно участвуют в передаче сигнала об отсутствии азота в среде, причем они вовлечены в системный ответ, отвечающий за образование азотфиксирующих клубеньков.



Рис. 2. Активность промоторных областей генов StCEP3.1 (слева) и StCEP3.2 (справа) в корнях картофеля. Промоторы активны в проводящем цилиндре корня

Интересно, что количество транскриптов гена *StCEPD2*, предположительной мишени действия пептидов StCEP, значимо выше в столонах растений картофеля, растущих в среде без азота, по сравнению с растущими в среде с азотом (Lin et al., 2015). Так как столон картофеля является органом, активно снабжающимся как ассимилятами из листьев, так и водой из корней, то вполне возможно, что при отсутствии азота, пептиды CEP у картофеля идут не только в листья, но и попадают в столоны, где также могут запускать экспрессию *CEPD* и влиять на азотный сигналинг.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–016–00177

ЛИТЕРАТУРА

Roberts I, Smith S, De Rybel B, et al. The CEP family in land plants: evolutionary analyses, expression studies, and role in Arabidopsis shoot development. J Exp Bot. 2013; 64(17):5371–5381. doi:10.1093/jxb/ert331

Tabata R, Sumida K, Yoshii T, Ohyama K, Shinohara H, Matsubayashi Y. Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. Science. 2014; 346(6207):343–346. doi:10.1126/science.1257800

Ohkubo Y, Tanaka M, Tabata R, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y. Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. Nat Plants. 2017; 3:17029. Published 2017 Mar 20. doi:10.1038/nplants.2017.29

Imin N, Mohd-Radzman NA, Ogilvie HA, Djordjevic MA. The peptide-encoding CEP1 gene modulates lateral root and nodule numbers in Medicago truncatula. J Exp Bot. 2013; 64(17):5395–5409. doi:10.1093/jxb/ert369

Lin T, Lashbrook CC, Cho SK, et al. Transcriptional analysis of phloem-associated cells of potato. BMC Genomics. 2015; 16(1):665. Published 2015 Sep 3. doi:10.1186/s12864–015–1844–2

УДК 57.085.23+ 577.21

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РИСА С ГЕНАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ПИРИКУЛЯРИОЗА

Е.Г. Савенко, Ж.М. Мухина, Т.Л. Коротенко

ФНЦ риса, Краснодар, Россия

Выведение сортов, устойчивых к возбудителю пирикуляриоза – экологическая стратегия рисоводства, т. к. сокращение применения фунгицидов, обеспечивает пищевую безопасность продукции рисовой отрасли. Основной целью исследований являлась разработка комплексной технологии ускоренной селекции риса на длительную устойчивость к пирикуляриозу на основе современных методов фенотипирования, генотипирования и экспериментальной гаплоидии с использованием образцов из коллекции *ФНЦ риса УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» и* китайских сортообразцов, полученных по программе обмена. В полевых условиях Краснодарского края китайские образцы риса изучены по биологическим, морфологическим признакам растений, таксономической принадлежности к ботанической разновидности, элементам структуры продуктивности, устойчивости к полеганию. В условиях вегетационного опыта эти образцы изучены на устойчивость к локальной (краснодарской) популяции возбудителя пирикуляриоза, фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae Cavara* (искусственный инфекционный фон). Культура гриба для получения инокулюма выделена из пораженных листьев, узлов и метелок растений, собранных в течение вегетационного периода развития риса в рисосеющих районах края. Учет поражения растений пирикуляриозом проведен дважды (через 10 и 20 дней после инокуляции). Сортообразцы китайской селекции, по результатам оценки, в основном проявили промежуточный тип реакции. Сорта Tongyu 401 и Liojing 168 проявили себя как устойчивые, сорт Kendao 34 – восприимчивый. Изучена отзывчивость на культуру пыльников *in vitro* китайских генотипов риса с генами устойчивости к пирикуляриозу. Установлено, что для культивирования пыльников изучаемых образцов риса наиболее пригодной является среда Блейдса с 2,0 мг/л фитогормона 2,4 – Д. Самым отзывчивым на культуру пыльников *in vitro* среди изученных китайских генотипов риса оказался образец с генами *Pigy8, Pita, Ptr* – Liaojing 168, у которого отмечены максимальные каллусогенез и регенерация; самая слабая ответная реакция наблюдалась у образца Liaoxing 21. У образца Liaojing 168 из морфогенных типов каллуса получены жизнеспособные регенеранты риса, сформированные по типу соматического эмбриоидогенеза и гемморизогенеза в клетках каллуса. Регенеранты адаптированы к условиям *ex vitro*. У большинства андрогенных растений в результате индуцированного дублирования хромосом спонтанно получены гомозиготные формы (удвоенные гаплоиды). Проведена молекулярно-генетическая идентификация эффективных генов устойчивости риса к пирикуляриозу *Pi-z, Pi-ta и Pi-b* у 42 образцов. В изученную выборку вошли образцы китайских партнеров, сорта-интродуценты, представляющие генофонд различных регионов рисосеяния мира, а также ряд сортов отечественной селекции. У китайских образцов Long jing 16 и Xieyov выявлены маркерные фрагменты генов *Pi-b и Pi-ta*, а у образцов IRIS 251–53324 – Takanari и К107–11 (Lider/Takanari) идентифицировано одновременное присутствие амплификации целевых фрагментов генов *Pi-z и Pi-b*. Данные образцы выделены как потенциальные наиболее ценные доноры данных генов. В ходе скрещивания образцов ФНЦ риса с китайскими образцами, получена 31 гибридная комбинация (F_1). Из этих комбинаций скрещиваний селекционерами отобраны 16 для получения ВС-поколений (беккроссирование). В результате гибридизации получено BC_1-поколение, семена которого планируется использовать для получения BC_2-поколения.

В ходе исследований собраны экспериментальные данные для формирования пополняемой базы, выделены генотипы риса китайской селекции, перспективные для российских селекционных программ. Ориентиром для сравнения показателей признаков интродуцируемых китайских сортообразцов послужили адаптированные к условиям региона местные сорта риса.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19–516–53001 ГФЕН_а «Создание и применение предселекционных ресурсов риса с пирамидированными генами широкого спектра устойчивости к возбудителю пирикуляриоза».

УДК 640

CRISPR/CAS9 КАК АЛЬТЕРНАТИВА КОНТРСЕЛЕКЦИИ ПО *URA3* ДЛЯ ПРИЦЕЛЬНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ДНК В ГЕНОМ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Д.С. Спасская, А.И. Давлетшин, Д.С. Карпов

Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Ген *URA3*, кодирующий один из ферментов биосинтеза урацила оротодин-5'-фосфатдекарбоксилазу, часто используется в качестве селективного маркера в клетках *Saccharomyces cerevisiae*. Этот маркер также нередко используется для последовательного внесения изменений в геном дрожжей, например, для удаления целевых генов и последующего выщепления *URA3* при помощи контрселекции на среде с 5-фтороротовой кислотой (5-FOA). Соответствующий метод «бесследного» выщепления *URA3* основан на использовании донора для гомологичной рекомбинации – фрагмента ДНК, содержащего фланки, гомологичные последовательностям, окружающим маркер. Транформация клеток URA+ таким донором и последущая контрселекция на среде с токсичным предшественником урацила в теории приводит к появлению колоний, в которых *URA3* заменен на последовательность донора, так как в присутствии рабочего маркера клетки погибают. Однако на практике отобрать таким способом клоны, в которых маркер действительно выщепился, достаточно сложно из-за высокого уровня мутагенеза по *URA3* [1]. Чтобы избежать времязатратного отбора клонов при неэффективном выщеплении, мы сделали плазмиду на базе технологии CRISPR-Cas9, кодирующую нуклеазу Cas9 и направляющую РНК против *URA3*. Ко-трансформация такой плазмидой и донором для гомологичной рекомбинации («заплаткой») приводит к появлению двуцепочечного разрыва в последовательности маркера, который, из-за предпочтения пекарских дрожжей репарации по пути гомологичной рекомбинации, залечивается преимущественно встройкой донора [2]. Отбор клонов в данном случае не требует контрселекции, а эффективность точного встраивания целевой последовательности донора вместо маркера достигает 50 процентов. При помощи данного метода мы успешно внесли мутацию в геномную последовательность гена фактора транскрипции *RPN4* [3], а также встроили ген цветного белка TinselPurple под промотор pADH1 вместо гена *ADH1*.

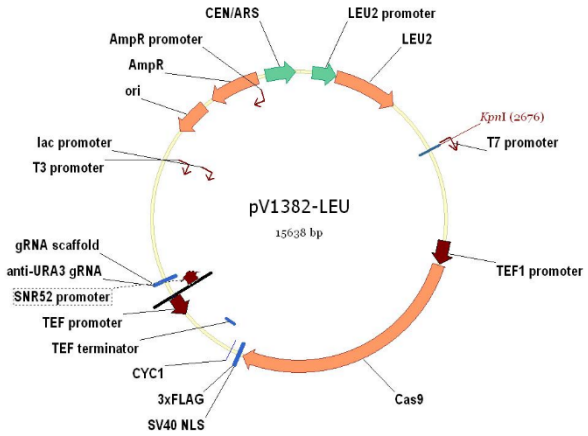


Рисунок 1. Схема CRISPR-плазмиды pV1382-antiURA

В экспериментах по замене геномных последовательностей использовали штамм *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Euroscarf). CRISPR-система для разрезания гена *URA3* была сконструирована на базе плазмиды pV1382 [2] путем замены селективного маркера на *LEU2* и клонирования под промотор SNR52 спейсера GAGTAAAAAATTGTACTTGG в составе комплементарных олигонуклеотидов, образующих соответствующие липкие концы, по сайту рестрикции BsmBI.

Внесение мутации Q516ST [4], создающей стоп-кодон сразу за последовательностью, кодирующей ДНК-связывающий домен, в геномную последовательность гена фактора транскрипции *RPN4*, проводили в два этапа. На первом этапе последовательность гена удаляли простым нокаутом с геном *URA3*, фланкированным гомологичными *RPN4* последовательностями (кассету получали в один этап при помощи ПЦР с длинными праймерами), и последующей селекцией на среде без урацила. Встройку *URA3* в нужное место проверяли с двумя парами праймеров, которые отжигались на *URA3* и фланкирующие локус области. На втором этапе отобранные URA+ клоны трансформировали плазмидой pV1382-antiURA и кассетой, содержащей последовательность гена RPN4-Q516ST, полученную ПЦР-мутагенезом, и фланкированной гомологичными локусу встройки последовательностями размером 50 п.н. Размер кассеты составил примерно 1700 п.н. Трансформанты высевали на селективную среду без лейцина. Отбор клонов проводили по способности расти на среде без урацила и при помощи ПЦР с геномной ДНК и последующего секвенирования для подтверждения наличия мутации. Эффективность встраивания нужной кассеты составила 33 процента (1 положительный клон из трех).

Встройку цветного белка TinselPurple (ATUM Chromogenic ProteinPaintbox) под сильный конститутивный промотор pADH1 проводили по аналогичной схеме в два этапа. На первом этапе ген *ADH1* вырезали URA-кассетой с гомологичными фланками, а на втором в полученные URA+ клоны вводили плазмиду pV1382-antiURA и донор для рекомбинации, содержащий последовательность гена TinselPurple, фланкированную гомологичными локусу последовательностями размером 50 п.н. Кассету размером около 1000 п.н. получали при помощи одностадийной ПЦР с длинными праймерами. Отбор клонов проводили при помощи ПЦР (к сожалению, заметного окрашивания колоний встройка гена в этот локус не дала). Эффективность встраивания в нужный локус по обоим фланкам при отборе только на среде без лейцина составила около 50 процентов (при проверке клонов в некоторых случаях были замечены также ПЦР-фрагменты другой длины, что указывает на небольшую вероятность встраивания в нецелевые локусы либо дефекты гомологичной рекомбинации).

По итогам обоих экспериментов можно заключить, что использование CRISPR-системы против гена *URA3* в клетках *Saccharomyces cerevisiae* представляет собой эффективную замену системе контрселекции на 5-FOA и позволяет встраивать экспрессионные кассеты в нужный геномный локус с точностью до нуклеотида.

Нужно отметить, что система CRISPR-Cas9 позволяет эффективно вносить в геном *Saccharomyces cerevisiae* мутации вообще без использования маркеров [5], однако этап отбора с *URA3* в ряде случаев имеет свои преимущества – так, внесение мутаций в кодирующую область генов в данном случае не требует замены последовательности PAM, которую распознает нуклеаза Cas9. Кроме того, в этом случае детектировать встройку донора можно только по ПЦР. Использование универсальной плазмиды pV1382-antiURA позволяет исключить этап конструирования CRISPR-плазмид и подбора направляющих РНК для каждого отдельного локуса. Однако, URA-опосредованный метод редактирования генома неприменим для генов, делеция которых летальна.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 18–04–00692 А и 18–29–07015 мк.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol*. 1987; 154:164–175.
2. Vyas VK, Bushkin GG, Bernstein DA, et al. New CRISPR Mutagenesis Strategies Reveal Variation in Repair Mechanisms among Fungi. *mSphere*. 2018; 3(2):e00154–18.
3. Mannhaupt G, Schnall R, Karpov V, Vetter I, Feldmann H. Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett*. 1999; 450(1–2):27–34.
4. González-Ramos D, van den Broek M, van Maris AJ, Pronk JT, Daran JM. Genome-scale analyses of butanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae reveal an essential role of protein degradation. *Biotechnol Biofuels*. 2013; 6(1):48.
5. Karpov DS, Spasskaya DS, Nadolinskaia NI, Tutyaeva VV, Lysov YP, Karpov VL. Deregulation of the 19S proteasome complex increases yeast resistance to 4-NQO and oxidative stress via upregulation of Rpn4 – and proteasome-dependent stress responsive genes. *FEMS Yeast Res*. 2019; 19(2):10.1093/femsyr/foz002.

УДК 66.047

СИСТЕМЫ WOX-CLAVATA В РЕГУЛЯЦИИ РАЗВИТИЯ ЗАПАСАЮЩЕГО КОРНЯ У РЕДИСА ПОСЕВНОГО RAPHANUS SATIVUS

К.А. Кузнецова, И.Е. Додуева, Л.А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Запасающий корень представляет собой важную с экологической и экономической точек зрения часть растения. Большое число сельскохозяйственных растений формирует запасающие корни, и редис посевной – один из таких видов. Редис посевной (*Raphanus sativus*) является модельным объектом кафедры генетики и биотехнологий СПбГУ; в СПбГУ также создана генетическая коллекция инбредных линий редиса [1]. В основе развития запасающих органов двудольных растений лежит вторичный рост, или рост утолщением, который осуществляется в основном за счет активности вторичной латеральной меристемы – камбия, а также его производных. Активность камбия зависит от баланса пролиферации дифференцировки различных типов клеток и регулируется работой систем WOX-CLAVATA, включающих в себя ген *WOX*, кодирующий гомеодомен-содержащий транскрипционный фактор, а также CLE-пептиды и их рецепторы – CLV1-подобные протеинкиназы, регулирующие экспрессию *WOX* [2–4]. Помимо этого, в регуляции активности меристем участвуют и другие компоненты, среди которых транскрипционные факторы HAM и KNOX. В настоящей работе исследовались гены, которые определяют продуктивность растений. Так, было идентифицировано два гена-кандидата из семейства *WOX – RsWOX4* и *RsWOX14*, а также их мишени: отдельные представители семейств генов *CLE*, генов биосинтеза цитокининов и ответа на цитокинины. В промоторах генов-кандидатов обнаружены последовательности для связывания транскрипционных факторов WOX. Изучен эффект изменения экспрессии этих генов (сверхэкспрессия и РНК-интерференция) на интересующие нас процессы, происходящие в запасающем корне. Предполагается, что исследованные гены могут являться кандидатами на роль мишеней для геномного редактирования. Работа поддержана грантом РФФИ 18–04–01017.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузовкина И.С., Лутова Л.А. Генетическая коллекция инбредных линий редиса: история и перспективы // Генетика. – 2007. – т. 42. № 10. – стр. 1411–1423.
2. Etchells J.P., Provost C.M., Mishra L.,. WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organization // Development. 2013. V. 140. P. 2224–2234.
3. Gancheva M.S., Dodueva I.E., Lebedeva M.A., Tvorogova V.E., Tkachenko A.A., Lutova L.A. Identification, expression, and functional analysis of CLE genes in radish (Raphanus sativus L.) storage root // BMC Plant Biology. 2016. V.16 (Suppl.1):7.
4. Hirakawa Y., Kondo Y., Fukuda H. Regulation of vascular development by CLE peptide-receptor systems // Journal of Integrative Plant Biology. 2010. V. 52. P. 8–16.

УДК 66.047

ТРАНСДУКЦИЯ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО КОНСТРУКТА НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГАМ BDNF АКТИВИРУЕТ ЗАЩИТНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ НЕЙРОНОВ ПРИ ГИПОКСИИ И ИШЕМИИ

Е.А. Туровский[1,2], А.А. Бабаев[2], М.В. Туровская[1]

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия,
НИИ Нейронаук, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Россия,

Известно, что кратковременная гипоксия, сменяющаяся реоксигенацией, оказывает как на клеточном уровне (Turovskaya et al., 2011), так и на уровне целого организма (Semenov et al., 2002) положительный эффект и способствует защите клеток мозга при длительном воздействии гипоксии или ишемии. При этом феномен гипоксического прекондиционирования активируется в глутаматергических нейронах, а в тормозных ГАМКергических нейронах данный эндогенный защитный механизм отсутствует (Turovsky et al., 2013). Кроме этого, наряду с положительным эффектом, кратковременная гипоксия оказывает и отрицательные эффекты в виде симптомов постгипоксического гипервозбуждения в виде генерации спонтанных Ca^2±импульсов во время реоксигенации ($[sCa^{2}+]_i$) (Turovskaya et al., 2014). Длительная ишемия, которая наряду с гипоксией сопровождается снижением уровня глюкозы во внеклеточной среде, что вызывает повреждение и гибель клеток мозга, и, в первую очередь, ГАМКергических нейронов (Turovskaya et al., 2019; Turovskaya et al., 2020). Следовательно, эпизоды гипоксии или длительная ишемии оказывают наиболее выраженное повреждающее действие на ГАМКергические нейроны, что говорит о необходимости разработки способов селективной активации защитных сигнальных систем этих нейронов с одновременным усилением эндогенных защитных механизмов в глутаматергических нейронах.

В последние несколько лет появляется все больше работ, которые показывают важную роль нейротрофических факторов в защите клеток мозга от повреждающих факторов ишемии и их участие в активации механизмов прекондиционирования (Gaidin et al., 2020). Одним из таких нейротрофинов является нейротрофический фактор мозга (BDNF), который широко представлен в различных отделах мозга. BDNF – нейротрофический фактор мозга, открытый в 1982 году, который представлен двумя типами – белком-предшественником, pro-BDNF и зрелым BDNF. Известно, что гипоксическое прекондиционирование крыс с помощью трех эпизодов умеренной гипоксии вызывает увеличение уровня BDNF уже через 1 день и способствует устойчивости животных при травматическом стрессе (Baranova et al., 2015), однако механизмы и возможные отрицательные обратные связи этого изменения не исследованы. Более того, механизмы защитного действия сверхэкспрессии BDNF на различные популяции нейронов остаются не исследованными, также как и пути трансдукции сигналов, активируемые во время гипоксического прекондиционирования. Для изучения эндогенных защитных механизмов глутаматергических и ГАМКергических нейронов гиппокампа нами был создан аденоассоциированный конструкт, селективно кодирующий последовательность BDNF в нейронах (рис. 1).

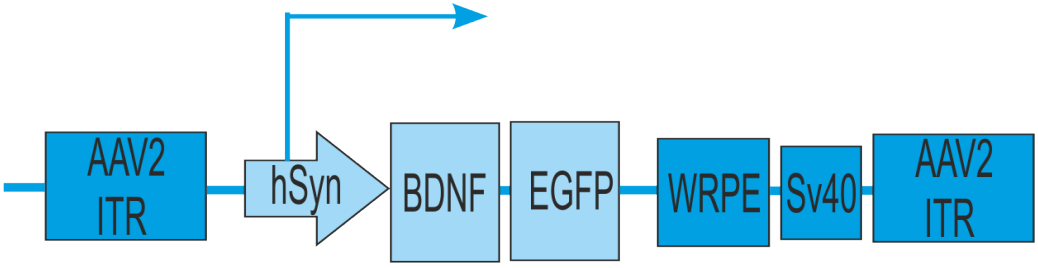


Рис. 1. Схема аденоассоциированного конструкта, несущего последовательность, кодирующую BDNF в нейронах. Обозначения: hSyn – ген человеческого промотора белка синапсина; BDNF – нейротрофический фактор головного мозга; Egfp (enhanced green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок; WPRE (Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element) – энхансер, регуляторный элемент, значительно усиливающий работу промотора синапсина hSyn; SV40 polyA – сигнальная последовательность, фланкированная ITR (Inverted terminal repeat) – повторами из AAV серотипа 2.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

На рисунке 2А представлены Ca^2±сигналы ГАМКергических (черная кривая) и глутаматергических (серая кривая) нейронов в ответ на кратковременные аппликации активатора NMDAR (10 мкМ NMDA в безмагниевой среде), эпизоды кратковременной гипоксии (Гип) и 10-минутные периоды реоксигенации (Реокс). Видно, что в среднем, амплитуда Ca^2±сигналов у глутаматергических нейронов уменьшается после каждого последующего эпизода гипоксии, о чем также свидетельствует уменьшение тангенса угла наклона прямой, аппроксимирующей Ca^2±ответы отдельных глутаматергических нейронов (рис. 2Б) на аппликацию NMDA. После первого эпизода гипоксии тангенс угла наклона прямой составляет 0,57±0,02, после второго и третьего эпизодов – 0,39±0,07 и 0,33±0,07, соответственно. Такой феномен гипоксия-индуцированного уменьшения Ca^2±ответов на активацию ионотропных рецепторов глутамата является проявлением гипоксического прекондиционирования. В тоже время, в ГАМКергических нейронах, наоборот, происходит увеличение амплитуд Ca^2±ответов на NMDA после эпизодов гипоксии (рис. 2А, черная кривая), а тангенс угла наклона прямой, аппроксимирующей эти ответы составляет 1,09±0,14 после первого эпизода и достигает 1,11±0,18 и 1,14±0,14 после второго и третьего эпизодов гипоксии (рис. 2Б, обозначены звездочкой), что говорит об отсутствии феномена гипоксического прекондиционирования.

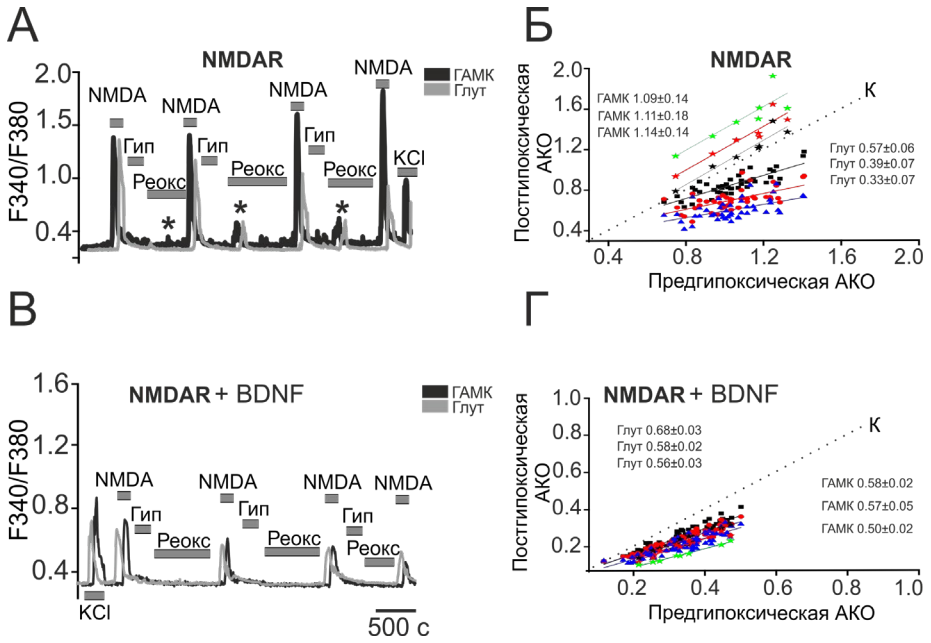


Рис. 2. Сверхэкспрессия BDNF активирует гипоксическое прекондиционирование NMDA-рецепторов в ГАМКергических нейронах. А, В – Усредненные Ca2±ответы не трансдуцированных (А) и трансдуцированных (В) BDNF-EGFP ГАМКергических (черная кривая) и глутаматергических (серая кривая) нейронов на аппликацию 10 мкМ NMDA в безмагниевой среде при действии кратковременных эпизодов гипоксии (Гип) и реоксигенации (Реокс). Б, Г – Зависимости амплитуды Ca2±ответа (АКО) на NMDA после эпизодов кратковременной гипоксии (Постгипоксическая АКО, отн. ед.) от амплитуды Ca2±ответа до гипоксии (Предгипоксическая АКО, отн. ед.) в ГАМКергических (ГАМК) и глутаматергических (Глут) нейронах, в которые трансдуцировали (Г) и не трансдуцировали BDNF-EGFP (Б). Представлены амплитуды Ca2±ответов и их аппроксимации линейной функцией для ГАМКергических (звездочки) и глутаматергических нейронов после одного (черные квадраты), двух (красные кружки) и трех (синие треугольники) эпизодов кратковременной гипоксии. Цифрами разного цвета показаны значения тангенса угла наклона аппроксимирующих прямых. Прямая К – линейная аппроксимация данных в контроле (без гипоксии).

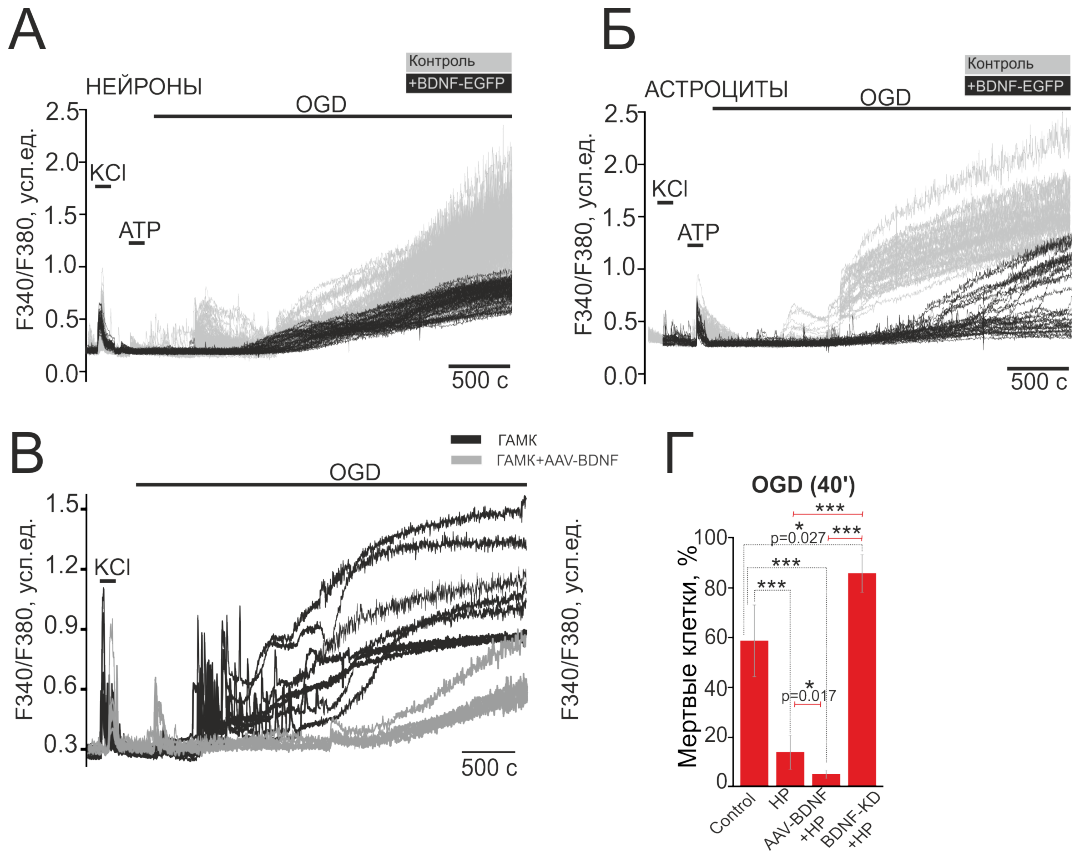


Рис. 3. Нейропротекторное действие сверхэкспрессии BDNF при ишемии (OGD). Эффекты, направленные на защиту ГАМКергических нейронов. А – Ca^2±ответы контрольных нейронов (в культуру не трансдуцировали конструкт, кривые серого цвета) и нейронов из культуры, трансдуцированной конструктом (AAV) – Syn-BDNF-EGFP (кривые черного цвета) на OGD длительностью 40 минут. Б – Ca^2±ответы контрольных астроцитов (в культуру не трансдуцировали конструкт, кривые серого цвета) и астроцитов из культуры, трансдуцированной конструктом (AAV) – Syn-BDNF-EGFP (кривые черного цвета) на 40 минут OGD. В – OGD-индуцированные Ca^2±ответы ГАМКергических нейронов гиппокампа, которые трансдуцировали (серые кривые) и нет (черные кривые) (AAV) – Syn-BDNF-EGFP-конструктом. Г – Процент клеток, погибших вследствие некроза (%± SE) после 40 минут OGD в экспериментальных группах: Control – контрольная группа; HP – клетки, прекондиционированные эпизодами гипоксии; AVV-BDNF+HP – культура гиппокампа, трансдуцированная (AAV) – Syn-BDNF-EGFP-конструктом и прекондиционированная эпизодами гипоксии; BDNF-KD+HP – клетки, трансфецированные siRNA против гена BDNF и прекондиционированные эпизодами гипоксии. Клетки прекондиционировали эпизодами гипоксии и на 24 часа возвращали в CO_2-инкубатор

В клеточных культурах гиппокампа, нейроны которых трансдуцировали аденоассоциированным конструктом (BDNF-EGFP), который в течение 2–3 суток приводит к сверхэкспрессии BDNF, наблюдается уменьшение предгипоксической амплитуды Ca^2±ответов на аппликацию 10 мкМ NMDA в безмагниевой среде (по сравнению с культурами без сверхэкспрессии BDNF) (не показано). Ca^2±ответы индивидуальных глутаматергических нейронов как до эпизодов гипоксии, так и после них, лежат правее по оси X (рис. 2Г), по сравнению с глутаматергическими нейронами. Тангенс угла наклона линейной функции, аппроксимирующей эти ответы составляет 0,68±0,03, 0,58±0,03 и 0,56±0,03 после каждого из трех эпизодов гипоксии. При этом в ГАМКергических нейронах (рис. 2В, черная кривая) культур, сверхэкспрессирующих BDNF, происходит уменьшение амплитуд Ca^2±сигналов на аппликацию NMDA, что говорит об индукции феномена гипоксического прекондиционирования. Тангенс угла наклона прямой, аппроксимирующей Ca^2±ответы этих ГАМКергических нейронов уже после первого эпизода гипоксии составляет 0,58±0,02 и с каждым последующим эпизодом гипоксии уменьшается до 0,57±0,05 и 0,5±0,02, соответственно (рис. 2Г, обозначены ГАМК).

Кроме того, для нейронов гиппокампа во время реоксигенации характерна генерация s$[Ca^{2}+]_i$, являющихся признаком постгипоксического гипервозбуждения (рис. 2А, обозначено *), приводящих к повреждению и гибели определенных популяций ГАМКергических нейронов (Туровский и др., 2017; Turovskaya et al., 2020). При этом для культур, в нейронах которых сверхэкспрессируется BDNF, характерно полное подавление этих s$[Ca^{2}+]_i$ (рис. 2В), т. е. высокий уровень BDNF ингибирует постгипоксическое гипервозбуждение нейронов гиппокампа.Ишемия-подобные условия (OGD), индуцируемые с помощью депривации глюкозы и кислорода во внеклеточной среде, вызывают двухфазные Ca^{2}±сигналы в нейронах (рис. 3А, серые кривые) и астроцитах (рис. 3Б, серые кривые), регистрируемые по увеличению флуоресценции витального Ca^{2}±чувствительного зонда Fura-2. Первая фаза OGD-индуцированных C^{a2}±ответов является обратимой, а вторая фаза – представляет собой глобальное (необратимое) повышение $[Ca^{2}+]_i$, приводящее к повреждению и гибели клеток гиппокампа *in vitro*. В клеточных культурах, нейронам которых трансдуцировали конструкт (AAV) – Syn-BDNF-EGFP (рис. 3А) наблюдалось полное ингибирование первой (обратимой) фазы OGD-индуцированных Ca^{2}±ответов, и подавление второй фазы глобального повышения $[Ca^{2}+]_i$ в 1,5 и 2,3 раза у нейронов (рис. 3А, черные кривые) и астроцитов (рис. 3Б, черные кривые), соответственно. Такое снижение Ca^{2}±сигналов в ответ на OGD при сверхэкспрессии BDNF ведет за собой снижение числа погибших клеток, которое составляет 6±5 %.

Для ГАМКергических нейронов при OGD характерны повышенные амплитуды Ca^{2}±сигналов во время первой фазы клеточной реакции без полной откачки $[Ca^{2}+]_i$ до уровня покоя, а также большие скорости нарастания $[Ca^{2}+]_i$ во время второй фазы (рис. 3В, черные кривые). Трансдукция (AAV) – Syn-BDNF-EGFP в нейроны гиппокампа приводит к существенному подавлению амплитуды Ca^{2}±сигналов во время первой фазы ответа ГАМКергических нейронов на OGD, а также к многократному снижению скорости увеличения $[Ca^{2}+]_i$ во время второй фазы Ca^{2}±ответов (рис. 3В, серые кривые), что способствует выживанию ГАМКергических нейронов. Интересно, что прекондиционирование клеточных культур гиппокампа эпизодами гипоксии приводит к снижению процента погибающих клеток от OGD до 20 %, тогда как в контроле через 40 минут OGD гибнет более 60 % нейронов (рис. 3Г). При этом прекондиционирование клеточных культур, трансдуцированных (AAV) – Syn-BDNF-EGFP-конструктом приводит к снижению процента погибающих клеток до 3 % и менее, тогда как нокдаун гена BDNF в клетках гиппокампа, наоборот, увеличивает гибель до 93 % (рис. 3Г).

Таким образом, сверхэкспрессия BDNF в нейронах гиппокампа вызывает появление феномена гипоксического прекондиционирования в ГАМКергических нейронах, направленного на уменьшение амплитуд Ca^{2}±сигналов при активации NMDA-рецепторов. При этом в глутаматергических нейронах культур со сверхэкспрессией BDNF происходит усиление прекондиционирующего действия эпизодов гипоксии. При ишемии сверхэкспрессия полностью подавляет обратимую фазу OGD-индуцированного повышения $[Ca^{2}+]_i$ у нейронов и астроцитов, а также значительно ограничивает повышение $[Ca^{2}+]_i$ во время фазы его глобального роста, и, снижает процент погибающих по типу некроза клеток. Данный защитный эффект полностью отменяется в случае нокдауна гена BDNF, что говорит о ведущей роли данного нейротрофина в активации феномена гипоксического прекондиционирования и выживаемости различных типов нейронов во время ишемии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Turovskaya M.V. et al.Repeated brief episodes of hypoxia modulate the calcium responses of ionotropic glutamate receptors in hippocampal neurons //Neurosci Lett. 2011. – V.496. – P.11–14.
2. Semenov D.G., et al.Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: involvement of NMDA receptors // Neurosignals – 2002. – V.11. – No.6. – P.329–335.
3. Turovsky E.A., et al. Short-term episodes of hypoxia induces posthypoxic hyperexcitability and selective death of GABAergic hippocampal neurons //Exp. Neurol. – 2013. – V.250. – P.1–7.
4. Turovskaya M.V., et al.. Short-term hypoxia induces a selective death of GABAergic neurons //Biochemistry (Moscow) supplement. series a: membrane and cell biology – 2014. – V.8. – No.1. – P.125–135.
5. Turovskaya M.V., et al. Taxifolin protects neurons against ischemic injury in vitro via the activation of antioxidant systems and signal transduction pathways of GABAergic neurons //Mol. Cell. Neurosci. – 2019. – V.96. – P.10–24.
6. Turovskaya M.V., et al.. BDNF overexpression enhances the preconditioning effect of short-term episodes hypoxia, promoting survival of GABAergic neurons //Neurosci. Bull. – 2020.
7. Baranova K.A., et al. The neurotrophin BDNF is involved in the development and prevention of stressInduced psychopathologies //Neurochem. J. – 2015. – V.9. – No.2. – P.108–115.
8. Туровский Е.А., et al. Кальций-связывающие белки защищают ГАМКергические нейроны гиппокампа от гибели при гипоксии и ишемии in vitro // Биологические мембраны – 2017. – Т.34. – № 5. – с. 77–89.
9. Gaidin S.G., et al.. The selective BDNF overexpression in neurons protects neuroglial networks against OGD and glutamate-induced excitotoxicity //Int j Neurosci. – 2020. – V.26. – P.1–21.

Секция 6. Инженерные аспекты биотехнологии

УДК 604.4:631.8

БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО ОРГАНИЧЕСКОГО СЫРЬЯ И ЕГО ОБОГАЩЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ КОМПОНЕНТАМИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ

В.П. Молчанов, Н.В. Фомичева, Ю.Ю. Косивцов, М.Г. Сульман

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Одним из наиболее эффективных путей интенсификации внедрения биотехнологических и химико-технологических процессов является проведение масштабных физико-химических исследований и выполнение на их основе соответствующих кинетических расчетов. Результаты указанных расчетов позволяют прогнозировать протекание процессов и проводить целенаправленный синтез различных химических соединений в промышленном масштабе. Такой переход от изучения кинетики реакций к их промышленной реализации может быть осуществлен при помощи моделирования. Теория моделирования химических и биотехнологических процессов в значительной мере основывается на законах кинетики. Для выполнения моделирования необходимы подробные и достаточно точные кинетические данные.

В связи с этим, для создания научных основ технологии получения продукции, обогащенной биологически активными веществами, на основе смесей растительных отходов и отходов животноводства проведены физико-химические и кинетические исследования, результаты которых позволяют сделать предположения о механизмах образования сахаров, витаминов и аминокислот, то есть представить последовательность молекулярных трансформаций в процессе биокаталитической конверсии.

Сложность решения этой задачи обусловливается неоднозначностью механизмов биохимических реакций, лежащих в основе исследуемого процесса, которые, как правило, сопровождаются образованием лабильных и реакционноспособных промежуточных соединений. Установление наличия, изучение строения и свойств этих промежуточных соединений, обнаружение корреляций между строением и их реакционной способностью и составляют сущность исследования механизма процесса. В свою очередь, выявление механизма позволяет решить вопросы прогнозирования поведения системы во времени и перейти к задачам оптимизации процесса с целью получения конечного продукта биокаталитической конверсии с максимальным содержанием биологически активных веществ.

Объектом представляемого исследования является процесс биокаталитической конверсии органических субстратов с дополнительным образованием биологически активных соединений под действием ферментативных систем микроорганизмов, первоначально находящихся в исходном субстрате. В качестве органического субстрата могут быть использованы торф, крупнотоннажные отходы сельскохозяйственных производств и перерабатывающей промышленности (солома, опилки, льняная костра, льняные и хлопковые очесы прядильных фабрик, жмыхи маслоперерабатывающих производств и др.). В качестве добавки к органическим субстратам могут применяться коммунальные отходы, а также химические стимуляторы, концентрация и состав которых могут оказать влияние на интенсивность образования биологически активных компонентов (витаминов, аминокислот, сахаров).

Компостирование навоза с торфом издавна используется для получения органических удобрений. Торф представляет собой экологически чистый природный материал, в котором содержится около 7 % сырого протеина, 6 % клетчатки, 0.7 % жира и микроэлементов, однако питательная ценность непереработанного торфа невысока и составляет менее 0.2 кормовых единиц. Навоз, несмотря на то, что богат различными питательными веществами, в том числе, витаминами и минеральными солями, содержит патогенную микрофлору. Для эффективного использования таких компостов в кормопроизводстве необходимо обогащать их витаминами и микроэлементами и проводить дополнительную обработку (пастеризацию) для устранения влияния патогенной микрофлоры. Обогащение компоста будет осуществляться методом его биоконверсии с микроорганизмами-производителями протеина, аминокислот и других питательных веществ.

Сущность исследованного процесса заключается в создании наиболее благоприятных условий развития отдельных групп микроорганизмов, ферментативные системы которых способны активно деструктировать природные биополимерные комплексы (целлюлозу и, частично, лигнин) до моно-, ди- и олигосахаридов и трансформировать последние в аминокислоты, олиго- и полипептиды.

Полученный в результате биоконверсии продукт обогащен белками, аминокислотами, липидами, сахарами, витаминами, микроэлементами. Комплекс вышеуказанных веществ при использовании полученного продукта в качестве удобрений будет способствовать значительному повышению плодородных свойств почвы, а при скармливании сельскохозяйственным животным и птице в качестве кормовых добавок – повышению привесов биомассы, надоев и других показателей.

Для выявления ценности конечного продукта, а также с целью оптимизации процесса его получения выполнены комплексные физико-химические исследования состава ферментируемой смеси и содержания в ней различных биологически активных веществ. В ходе проведения указанных исследований использованы современные методы анализа в сочетании с имеющимся в распоряжении коллектива исполнителей комплектом дорогостоящего аналитического оборудования, в состав которого входят система капиллярного электрофореза, хроматографический комплекс для ВЭЖХ-анализа, газовый и жидкостный хроматомасс-спектрометры, анализатор дзета-потенциала, автоматический анализатор поверхности образцов и другие эффективные исследовательские приборы.

По результатам проведенных комплексных исследований процесса биоконверсии группой ученых Тверского государственного технического университета и Всероссийского НИИ мелиорированных земель (г. Тверь) разработана технология переработки отходов животноводства и птицеводства с влагопоглощающим материалом посредством аэробной твердофазной ферментации в высокоэффективную, экологически чистую продукцию – компост многоцелевого назначения (КМН). Его производство осуществляется в ферментере камерного типа, представляющего собой сооружение размером 5×10 м и высотой до 4.5 м, в полу которого вмонтированы перфорированные трубы, тупиковые с одного конца и объединенные с другого общим воздуховодом. Стандартной установкой по производству КМН является двухкамерный ферментер, но в зависимости от объемов производства биоудобрения на практике могут использоваться батареи из любого числа ферментеров. При соблюдении основных технологических параметров (влажности органической смеси 50–70 %, pH 6–8, соотношения углерода к азоту 20–30:1, содержания кислорода в массе – 5–12 %) спустя 7–10 суток получается биоудобрение КМН, характеризующееся экологической чистотой, высоким уровнем биогенности и питательности, обусловленным высвобождением элементов питания из природных биополимеров органического сырья и микробиологическим синтезом вторичных метаболитов в процессе ферментации.

Кроме того, предложена технология переработки отходов животноводства влажностью не более 75 % в высокоэффективные, экологически чистые жидкофазные биосредства для роста и развития растений. В основе технологии лежат ферментационно-экстракционные процессы преобразования органического сырья (навоза крупного рогатого скота, низинного или переходного торфа) с включением стимуляторов различной природы. Главное отличие технологической линии заключается в установлении заданных физико-химических параметров, позволяющих эффективно задействовать исходный потенциал микрофлоры, за счет жизнедеятельности которой формируется качественная продукция.

На основе совместных исследований, выполненных сотрудниками Всероссийского НИИ мелиорированных земель и Тверского государственного технического университета, оптимизирован процесс аэробно-анаэробной твердофазной ферментации смеси органических отходов животноводства и трудногидролизуемого сырья растительного происхождения и предложены научные основы новой ресурсосберегающей, безотходной и экологически чистой технологии утилизации отходов методом биоконверсии при использовании торфонавозных смесей в качестве основного субстрата. На протяжении нескольких суток происходит биотрансформация ферментируемой смеси, а пастеризационных эффект достигается в результате кратковременной обработки продукта ферментации ультразвуком интенсивностью 50–60 Вт/кв. см.

Осуществлена комплексная апробация технологии биоконверсии растительного сырья и органических отходов с получением продукции сельскохозяйственного назначения на опытно-промышленных установках для биоконверсии на базе Тверского государственного технического

университета, Всероссийского НИИ мелиорированных земель и ООО "Наукоемкое производство". Решены практические вопросы рационального подбора состава субстратных смесей, установления оптимальных технологических режимов, организации контроля за проведением процесса биоконверсии природного органического сырья.

Определены основные технико-экономические и технологические показатели эффективности возможного производства по утилизации отходов путем их биоконверсии с торфонавозными смесями на модульной установке. Показано, что реализация указанного процесса в промышленном масштабе позволит получать высокоэффективную продукцию сельскохозяйственного назначения при одновременном сокращении себестоимости производства. Сочетание таких преимуществ как использование дешевого, доступного и конкурентоспособного органического сырья, а также интенсивных биотехнологических методов его переработки обусловливает высокую экономическую эффективность внедрения создаваемых процессов за счет существенного сокращения затрат на производство продукции сельскохозяйственного назначения.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18–08–00460).

ЛИТЕРАТУРА

Akhtar, N.; Goyal, D.; Goyal, A. 2015. Biodegradation of leaf litter biomass by combination of Bacillus sp and Trichoderma reesei MTCC164 // Minerva Biotecnologica. Vol.: 27. Pp.: 191–199.

Champagne, Pascale. 2007. Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada // Resources Conservation and Recycling. Vol.: 50. Pp.: 211–230.

Champagne, Pascale. 2008. Bioethanol from agricultural waste residues // Environmental Progress. Vol.: 27. Pp.: 51–57.

Rehman, Kashif Ur; Rehman, Abdul; Cai, Minmin. 2017. Conversion of mixtures of dairy manure and soybean curd residue by black soldier fly larvae (Hermetia illucens L.) // Journal of Cleaner Production. Vol.: 154. Pp.: 366–373.

Басамыгин С.В., Васильев С.К., Мохонь В.В., Новоселов С.А. 2000. Способ получения почвовосстановителя. Патент РФ № 2136638.

Волохов В.А., Светушков В.П., Шильников И.А., Аканова Н.И. 2004. Органозольное удобрение и способ его получения. Патент РФ № 2238925. Бюл. № 30.

Ерина Т.Э., Винаров А.Ю. 2006. Биотехнология ускоренной аэробной переработки навоза и ее аппаратурное оформление / отв. ред. А.И. Еськов // Агроэкологические проблемы использования органических удобрений на основе отходов промышленного животноводства: сб. докл. Междунар. науч.-практич. конф. М.: Россельхозакадемия – ГНУ ВНИПТИОУ. С. 298–301.

Еськов А.И., Рябков В.В. 2002. Перспективные технологии использования органических удобрений / отв. ред. А.И. Еськов // Использование органических удобрений и биоресурсов в современном земледелии: материалы Междунар. научно-практ. конф., посвященной 20-летию ВНИПТИОУ. М.: РАСХН – ВНИПТИОУ. С. 62–74.

Злочевский Ф.И., Аксенов А.В., Тысленко А.М., Тарасов С.И. 2006. Новая биотехнология переработки навоза, помета / отв. ред. А.И. Еськов // Агроэкологические проблемы использования органических удобрений на основе отходов промышленного животноводства: сб. докл. Междунар. науч.-практич. конф. М.: Россельхозакадемия – ГНУ ВНИПТИОУ. С. 74–76.

Иванов А.А., Матросова Л.Е., Тремасов М.Я. 2013. Получение и применение биоудобрения на основе птичьего помета // Доклады РАСХН. № 4. С. 28–30.

Ишкаев Т.Х., Тремасов М.Я. 2006. Эффективная технология переработки птичьего помета / отв. ред. А.И. Еськов // Агроэкологические проблемы использования органических удобрений на основе отходов промышленного животноводства: сб. докл. Междунар. науч.-практич. конф. М.: Россельхозакадемия – ГНУ ВНИПТИОУ. С. 79–81.

Ковалев А.А., Ковалев А.А. 2006. Получение биогаза и перспективы снижения расхода воды в системах утилизации навозных стоков на полях орошения / отв. ред. А.И. Еськов // Агроэкологические проблемы использования органических удобрений на основе отходов промышленного животноводства: сб. докл. Междунар. науч.-практич. конф. М.: Россельхозакадемия – ГНУ ВНИПТИОУ. С. 91–96.

Ковалев А.А, Романюк В. 2002. Анаэробная обработка жидкого навоза в технологиях приготовления органических удобрений / отв. ред. А.И. Еськов // Использование органических удобрений и биоресурсов в современном земледелии: материалы Междунар. научно-практ. конф., посвященной 20-летию ВНИПТИОУ. М.: РАСХН – ВНИПТИОУ. С. 168–173.

Ковалев Н.Г., Барановский И.Н. 2006. Органические удобрения в XXI веке (Биоконверсия органического сырья): Монография. Тверь: ЧуДо. 304 с.

Ковалев Н.Г., Малинин Б.М., Туманов И.П. 1997. Способ приготовления компоста многоцелевого назначения. Патент РФ № 2112764.

Кузнецов Е.В., Полторак Я.А., Хаджиди А.Е. 2010. Способ получения вермикомпоста. Патент РФ № 2402510. Бюл. № 30.

Кулагина Е.М., Егоров С.Ю., Азизов С.А., Барабанов В.П. 2008. Способ биологической переработки птичьего помета. Патент РФ № 2322427. Бюл. № 11.
Лужков Ю.М., Джафаров А.Ф., Лужков С.М. 2003. Способ переработки органических отходов. Патент РФ № 2214990. Бюл. № 30.
Лукьяненков И.И. 1985. Перспективные системы утилизации навоза (в хозяйствах Нечерноземья). М.: Россельхозиздат. 176 с.
Марченко А.Ю., Серга Г.В. 2015. Устройство для сушки куриного помета. Патент РФ № 2569570. Бюл. № 33.
Могилевцев В.И., Брюханов А.Ю., Максимов Д.А., Васильев Э.В., Субботин И.А., Чернин С.Я., Парубец Ю.С., Гарзанов А.Л. 2012. Утилизация навоза / помета на животноводческих фермах для обеспечения экологической безопасности территории, наземных и подземных водных объектов в Ленинградской области. / под ред. В.И. Могилевцева. СПб.: СЗНИИМЭСХ Россельхозакадемии. 237 с.
Молчанов В.П., Сульман М.Г., Сульман Э.М. 2015. Ресурсосберегающая биокаталитическая конверсия смесей органических отходов животного и растительного происхождения // Актуальная биотехнология. № 3(14). С. 68–69.
Петраков А.Д., Радченко С.М. 2014. Кавитационный способ обеззараживания жидкого навоза и помета и технологическая линия для безотходного приготовления органоминеральных удобрений. Патент РФ № 2527851. Бюл. № 25.
Потапенко И.А., Лепетухин М.В., Перекопский К.В., Гаркавый К.А., Харченко П.М. 2008. Устройство для обеззараживания навозных стоков. Патент РФ № 2332827. Бюл. № 25.
Правдин В.Г., Бобрицкий Г.А., Толстой Н.И., Гермашев В.Г. 2009. Способ получения биокомпоста на основе сельскохозяйственных отходов, преимущественно подстилочного птичьего помета и навоза домашних животных, при аэробно-анаэробной ферментации (варианты). Патент РФ № 2374211. Бюл. № 33.
Пузанков А.Г., Мхитарян Г.А. 2002. Опыт переработки твердой фракции бесподстилочного навоза, помета методом ускоренного компостирования / отв. ред. А.И. Еськов // Использование органических удобрений и биоресурсов в современном земледелии: материалы Междунар. научно-практ. конф., посвященной 20-летию ВНИПТИОУ. М.: РАСХН – ВНИПТИОУ. С. 91–95.
Рабинович Г.Ю., Ковалев Н.Г., Фомичева Н.В. 2007. Новый вид биологически активных средств: получение, состав, перспективы использования // Вестник российской сельскохозяйственной науки. № 3. С. 71–73.
Серга Г.В., Филин К.В. 1995. Сушилка для куриного помета. Патент РФ № 2027130.
Смирнов А.А., Шиганов О.Л. 2003. Способ получения биогумуса. Патент РФ № 2205163. Бюл. № 2.
Солдатова В.В., Большаков В.Н., Прокопьева В.И., Грудинина Т.Н., Никонов И.Н., Новикова Н.И., Лаптев Г.Ю. 2013. Способ биологической переработки отходов животных / способ утилизации свежего куриного помета. Патент РФ № 2491264. Бюл. № 24.
Степанова Л.П., Половицков В.А., Таракин А.В., Коренькова Е.А. 2009. Способ получения вермикомпоста. Патент РФ № 2363689. Бюл. № 22.
Суховеркова В.Е. 2016. Способы утилизации птичьего помета, представленные в современных патентах // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. № 9(1473). С. 45–55.
Терещенко Н.Н., Кравец А.В. 2016. Способ получения вермикомпоста, способ получения стимулятора роста зерновых из вермикомпоста. Патент РФ № 2574740. Бюл. № 4.
Тремасов М.Я., Матросова Л.Е., Иванов А.А., Титова В.Ю., Иванов А.В., Тремасова А.М., Семенов Э.И. 2014. Способ микробиологической переработки птичьего помета. Патент РФ № 2522523. Бюл. № 20.
Триандафилов А.Ф., Федюк В.В. 2011. Устройство для приготовления беззараженного дегельминтизировного удобрения. Патент РФ № 2422415. Бюл. № 18.
Тюрин В.Г. 2004. Экологически безопасные способы обеззараживания и утилизации отходов в животноводстве и птицеводстве // Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве: материалы межд. науч.-практ. конф. Чебоксары: Чувашская государственная с/х академия. С. 122–125.
Федоров А.Б., Кулагина Е.М., Титова В.Ю. 2012. Способ биологической переработки птичьего помета. Патент РФ № 2445295. Бюл. № 8.
Ферментация: сборник научных статей. 1974. / отв. ред. Д.А. Креслиня. Рига: Зинатне. 238 с.
Фисинин В.И., Архипченко И.А., Попова Э.В., Солнцева И.Э. 1999. Использование птичьего помета для получения микробных удобрений с полифункциональными свойствами // Доклады Россельхозакадемии. № 2. С. 32–34.

УДК 66.047

ПРИМЕНЕНИЕ КАРБОКСИЛАТРЕДУКТАЗ И АМИНОТРАНСФЕРАЗ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА 6-АМИНОКАПРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ГЕКСАМЕТИЛЕНДИАМИНА ИЗ АДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Т.П. Федорчук

Институт фундаментальных проблем биологии, Пущино, Россия
University of Toronto, Toronto, ON, Canada

Полимерные материалы стали частью повседневной жизни, без которых сложно представить технологический прогресс. Промышленное производство полимерных прекурсоров напрямую зависит от производных нефтяной промышленности, что обуславливает увеличение негативного антропогенного воздействия на окружающую среду. Поэтому появился социальный и экологический спрос на разработку новых методов и подходов для производства пластика с использованием «более зеленых» технологий. Возникший недавно прогресс в области генной инженерии позволяет создавать разнообразные искусственные метаболические пути, манипулировать получившимися потоками метаболитов в сторону желаемого продукта, с использованием возобновляемого сырья, а также корректировать уже известные ферменты до желательных активностей и создавать новые на базе уже имеющихся.

Одним из наиболее широко используемых полимеров является нейлон, мономерный состав которого представлен адипиновой (АК), 6-аминокапроновой (6-АКК) кислотами и 1,6 – гексаметилендиамином (ГМД). Из-за уже собранного для производства адипиновой кислоты *in vivo* метаболического шикиматного пути в Saccharomyces cerevisiae (Raj et al. 2018) необходимы дальнейшие разработки для активации карбоновой группы *in vitro*.

В данной работе рассматривается двухкаскадная биоконверсия адипиновой кислоты с образованием 6-АК из АК на первом этапе (каскад 1) и ГМД из 6-АК – на втором (каскад 2). Для повышения эффективности трансформации адипиновой кислоты были использованы регенерирующие кофакторы системы для АТФ, НАДН, НАДФН, Glu, Ala и систему, которая инактивирует пирофосфат, образующийся в ходе реакции.

Редукция карбоксильной группы: карбоксилатредуктаза. В последнее время все больше внимания привлекают карбоксилатредуктазы как биокатализаторы для трансформации органических кислот в различные химические вещества (Finnigan et al., 2017; Napora-Wijata et al., 2014). При наличии АТФ и НАДФ, карбоксилатредуктазы катализируют восстановление карбоновых кислот до альдегидов.

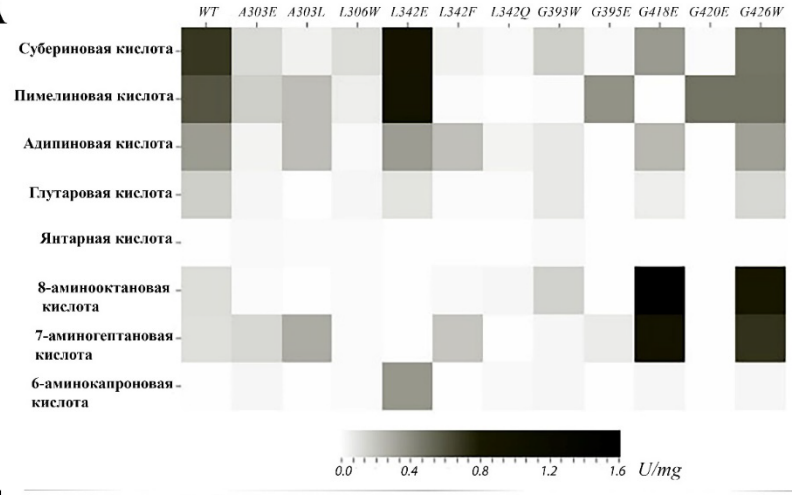
Недавно уже была проведена огромная работа по изучению активности карбоксилатредуктаз с различными субстратами. В частности, на основании работ, проведенных группой Khusnutdinova et al. (2017) была установлена наиболее активная для первой каскадной реакции карбоксилатредуктаза – MAB4714 из Mycobacteria abscessus. К сожалению, активность данной карбоксилатредуктазы для второй каскадной реакции превращения 6-АКК в ГМД была очень маленькая (0.006 U/mg). Поэтому, на основании данных о кристаллической структуре аденилатного домена гомолога данной карбоксилатредуктазы (Gahloth et al., 2017) для вероятного увеличения активности MAB4714 с 6-АКК в качестве субстрата, было произведено более чем 20 аминокислотных замен в полости активного центра аденилатного домена MAB4714. Эти мутантные формы были экспрессированы в Escherichia coli и одиннадцать из них были успешно выделены и охарактеризованы с алифатическими субстратами (Рис. 1А).

Было показано, что только одна замена лизина (L) в позиции 342 на глутаминовую кислоту (E) приводила к увеличению активности фермента MAB4714 с 6-АК, который использовали в качестве субстрата (Рис. 1Б), то есть только появление отрицательного заряда в этой области являлось основополагающим для производства ГМД из 6-АК.

Перенос аминогруппы: аминотрансфераза. Аминотрансферазы (трансаминазы) – ферменты из группы трансфераз, катализирующие перенос аминогрупп от аминокислот на кетокислоты без образования свободного аммиака. Разрабатываемая биоконверсия адипиновой кислоты к 1,6-гексаметилендиамину через 6-аминокапроновую кислоту включает получение нескольких альдегидных интермедиатов (адипиновый полуальдегид, адипальдегид и 6-аминогексаналь), которые служат в качестве субстратов для трансаминаз.

В силу того, что полуальдегид адипиновой кислоты коммерчески недоступен, в дальнейшей работе мы использовали адипальдегид в качестве субстрата для скрининга аминотрансфераз. Для этого скрининга мы отобрали 31 бактериальную ω-аминотрансферазу из семейства Pfam PF00202 (класс III) и PF00155 (классы I и II), которые, после клонирования их в *E.coli* были получены в растворимой фракции (Рис. 2А). Пять наиболее активных ферментов были охарактеризованы и, в дальнейшем, использовались для биотрансформации (Рис. 2Б).

А



Б

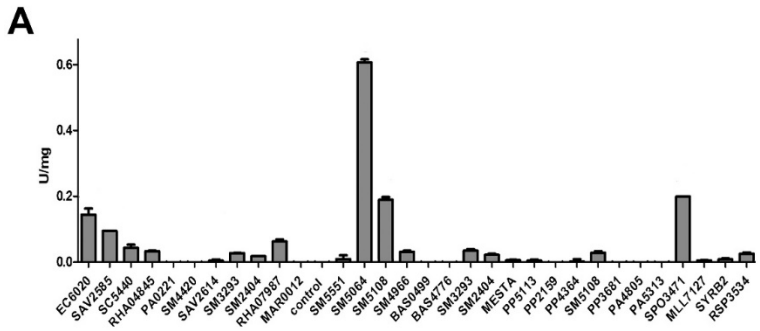
Субстрат	Карбоксилат редуктаза	K_m, mM	k_{cat}, s^{-1}	k_{cat}/K_m, M^{-1} s^{-1}
Адипиновая кислота	WT	23.5±2.8	2.2±0.1	91.9±25.1
	L342E	56.6±5.0	2.7±0.1	48.1±18.0
6-аминокапроновая кислота	WT	183.3±28.3	0.8±0.1	4.2±2.4
	L342E	70.1±14.5	2.6±0.2	37.1±10.1

Рисунок 1. Характеристики MAB4714 дикого типа (WT) и мутантов (их название сформировано из названия аминокислоты, ее порядкового номера в первичной структуре аминокислот и ее замене). А – скрининг WT и полученных мутантов с различными алифатическими субстратами (heatmap). Концентрация каждого из субстратов – 10 мМ: Б – кинетические характеристики WT и L342E с адипиновой и 6-аминокапроновой кислотами

Все пять отобранных аминотрансфераз были протестированы в системе по биоконверсии АК в 6-АКК и ГМД (данные не показаны), оказалось, что наиболее активным в данной системе ферментом является SAV2585, который и использовался в дальнейшей работе.

Системы регенерации кофакторов и утилизации пирофосфата. Основная стратегия для снижения высоких затрат на работу, зависящих от кофакторов ферментов *in vitro*, является использование систем регенерации кофакторов (Hummel, Groger, 2014; Vrtis et al., 2002; Wang et al., 2017; Khusnutdinova et al., 2017) (Рис. 3).

Регенерация АТФ (Рис. 3А) основана на деятельности полифосфаткиназы семейства 2 (PPK2) CHU0107 из *Cytophaga hutchinsoni* (Uniprot ID Q11V81), которая катализирует (поли-Ф) – зависимое фосфорилирование АМФ до АТФ через ADP и проявляет высокую активность и связь с АМФ, АДФ и поли-Ф (Nocek et al., 2018). Для регенерации НАДН (Рис. 3Б) в этой работе была использована формиатдегидрогеназа дикого типа (FDH) из *Pseudomonas sp*. strain 101 (Uniprot ID P33160), которая восстанавливает НАД+ до НАДН, используя формиат в качестве восстановителя и образует CO_2 (Tishkov et al., 1993) Для регенерации НАДФН в данную FDH были добавлены две мутации (D222Q и H224N) с образованием мутантной формы (FDH(mut)) (Рис. 3Д), которая отдавала предпочтение в восстановлении НАДФ+ до НАДФН (Khusnutdinova et al., 2017). Аминотрансферазы, которые исследовались в данной работе использовали либо аланин, либо глутамат в качестве источников аммонийной группы, продуцируя пируват, в случае аланин-зависимой АТ или α-кетоглутарат, если в качестве донора выступал глутамат (Рис. 2Б). Для регенерации аланина была использована аланин дегидрогеназа (DH A) BSU31930 из Bacillus subtilis (Uniprot ID Q08352), которая осуществляла реакцию в присутствии аммония и НАДФН (Рис. 3Е). В свою очередь, для регенерации глутамата из α-кетоглутората использовали глутамат дегидрогеназу (DH G) GDH1 из Saccharomyces cerevisiae (Uniprot ID P07262) также в присутствии аммония, но уже НАДН в качестве кофактора (Рис. 3В). Наконец, недавно было показано, что в ходе работы карбоксилатредуктаз, образуется пирофосфат, который может крайне негативно влиять на ферментативную активность белков, участвующих в реакции. Для устранения этого влияния в среду реакции была добавлена очищенная неорганическая пирофосфатаза PPase из *E. coli* (Рис. 3Г) (Kunjapur et al., 2016).



Б

	K_m, mM	k_{cat}, s^{-1}	k_{cat}/K_m, M^{-1} s^{-1}
SPO3471	1.27±0.1	0.71±0.13	557.76±56.48
SM5064	0.09±0.03	0.44±0.04	5379.31±133.36
SM5108	0.8±0.1	3.89±0.21	4900.00±350.00
SAV2585	0.29±0.03	0.45±0.10	1519.00±193.95
EC6020	0.57±0.07	1.20±0.06	2116.96±152.38

Рисунок 2. Характеристика аминотрансфераз. А – скрининг аминотрансфераз с адипальдегидом в концентрации 10 мМ; Б – кинетические характеристики пяти наиболее активных ферментов с выбранным субстратом

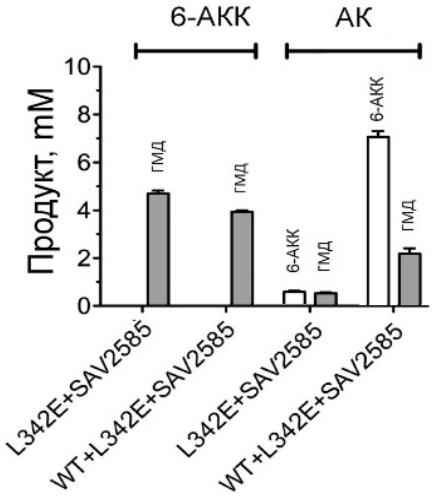


Рисунок 3. Системы регенерации кофакторов, используемые в данной работе: А – PPK2, полифосфаткиназа 2; Б – FDH, формиат дегидрогеназа; В – DH G, глутамат дегидрогеназа; Г – PPase, пирофосфатаза Д – FDH mut, мутант D222Q / H224N формиатдегидрогеназы; Е – DH A, аланин дегидрогеназа. Для экспериментальных деталей смотри материалы

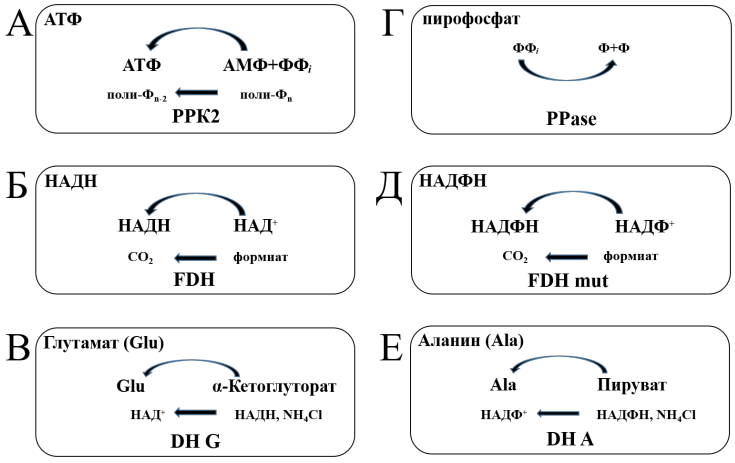


Рисунок 4. Биотрансформация in vitro адипиновой кислоты (АК) и 6-аминокапроновой кислоты (6-АКК) очищенными MAB4714 (WT) и L342E и аминотрансферазой SAV2585 в присутствии систем регенерации кофакторов и утилизации пирофосфата (Fedorchuk et al., 2020)

Биотрансформация АК в 6-АКК и ГМД с помощью MAB4714 WT и L342E in vitro. На основе кинетических параметров карбоксилатредуктаз группы MAB4714 дикого типа и мутантов (Рис. 1А, Б), мутантный белок L342E был выбран для дальнейшей биотрансформации 6-АКК в ГМД, который вместе с аминотрансферазой SAV2585 показали до 50 % преобразования 6-АКК в ГМД по сравнению с 1,5 %, наблюдаемым для дикого типа (Рис. 4).

Как и ожидалось, добавление дикого типа MAB4714 к L342E не привело к улучшению в трансформации 6-АКК в ГМД, что, по всей вероятности связано с низким сродством WT с 6-АКК. Из-за перераспределения заряда в полости активного центра L342E производил небольшое количество как 6-АКК, так и ГМД, когда в качестве субстрата выступает АК. На основании этих результатов была выдвинута гипотеза о том, что преобразование АК в ГМД может быть улучшено с помощью комбинации белков MAB4714 дикого типа и L342E, потому что фермент дикого типа более активен в биотрансформации АК в 6-АКК (Каскад 1), тогда как белок L342E более эффективен в образовании ГМД из 6-АКК (Каскад-2). Использование АК в качестве субстрата одновременно с белками MAB4714 дикого типа и L342E привело к 30 % преобразованию в ГМД и 60–70 % в 6-АКК, что указывало на более чем двукратное увеличение эффективности, по сравнению с MAB4714 дикого типа.

Таким образом, очевидно, что наше исследование дало понимание молекулярных механизмов субстратной селективности дикарбоновых кислот и проиллюстрировало пригодность карбоксилатредуктаз и аминотрансфераз для двухкаскадного восстановления / аминирования субстрата.

ЛИТЕРАТУРА

Fedorchuk, T., Khusnutdinova, A., Evdokimova, E., Flick, R., Di Leo, R., Stogios, P., Savchenko, A., Yakunin, A., One-Pot Biocatalytic Transformation of Adipic Acid to 6-Aminocaproic Acid and 1,6 – Hexamethylenediamine Using Carboxylic Acid Reductases and Transaminases. J. Am. Chem. Soc. 2020, 142, 1038–1048.

Finnigan, W.; Thomas, A.; Cromar, H.; Gough, B.; Snajdrova, R.; Adams, J.P.; Littlechild, J.A.; Harmer, N.J. Characterization of Carboxylic Acid Reductases as Enzymes in the Toolbox for Synthetic Chemistry. ChemCatChem 2017, 9, 1005–1017.

Gahloth, D.; Dunstan, M.S.; Quaglia, D.; Klumbys, E.; Lockhart-Cairns, M.P.; Hill, A.M.; Derrington, S.R.; Scrutton, N.S.; Turner, N.J.; Leys, D. Structures of carboxylic acid reductase reveal domain dynamics underlying catalysis. Nat. Chem. Biol. 2017, 13, 975–981.

Hummel, W.; Groger, H. Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. J. Biotechnol. 2014, 191,22–31.

Khusnutdinova, A.N.; Flick, R.; Popovic, A.; Brown, G.; Tchigvintsev, A.; Nocek, B.; Correia, K.; Joo, J.C.; Mahadevan, R.; Yakunin, A.F. Exploring Bacterial Carboxylate Reductases for the Reduction of Bifunctional Carboxylic Acids. Biotechnol. J. 2017, 12(11), 1600751

Kunjapur, A.M.; Cervantes, B.; Prather, K.L.J. Coupling carboxylic acid reductase to inorganic pyrophosphatase enhances cell-free in vitro aldehyde biosynthesis. Biochem. Eng. J. 2016, 109,19–27.

Napora-Wijata, K.; Strohmeier, G.A.; Winkler, M. Biocatalytic reduction of carboxylic acids. Biotechnol. J. 2014, 9, 822–843.

Nocek, B.P.; Khusnutdinova, A.N.; Ruszkowski, M.; Flick, R.; Burda, M.; Batyrova, K.; Brown, G.; Mucha, A.; Joachimiak, A.; Berlicki, L.; Yakunin, A.F. Structural insights into substrate selectivity and activity of bacterial polyphosphate kinases. ACS Catal. 2018, 8, 10746–10760.

Raj, K.; Partow, S.; Correia, K.; Khusnutdinova, A.N.; Yakunin, A.F.; Mahadevan, R. Biocatalytic production of adipic acid from glucose using engineered Saccharomyces cerevisiae. Metab Eng. Commun. 2018, 6, 28–32.

Tishkov, V.I.; Galkin, A.G.; Marchenko, G.N.; Egorova, O.A.; Sheluho, D.V.; Kulakova, L.B.; Dementieva, L.A.; Egorov, A.M. Catalytic properties and stability of a Pseudomonas sp.101 formate dehydrogenase mutants containing Cys-255-Ser and Cys-255-Met replacements. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993, 192, 976–81.

Vrtis, J.M.; White, A.K.; Metcalf, W.W.; van der Donk, W.A. Phosphite dehydrogenase: a versatile cofactor-regeneration enzyme. Angew. Chem., Int. Ed. 2002, 41, 3257–9.

Wang, X.; Saba, T.; Yiu, H.H.P.; Howe, R.F.; Anderson, J.A.; Shi, J. Cofactor NAD(P)H regeneration inspired by heterologous pathways. Chem. 2017, 2, 621–654.

УДК 541.15

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДРОЖЖЕЙ КЛЕТОК SACCHAROMYCES CEREVISIAE. T-985

Пхйьо Мьинт У, В.И. Панфилов, И.Г. Антропова, А.Е. Кузнецов

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

В природе активные формы кислорода, АФК, к которым относят H_2 O_2, O_3, O, •OH, O_2, $O_2^{\bullet-}$, $HO_2^{\bullet}$, HO_2^-, NO, некоторые органические свободные радикалы: алкильные $R^{\bullet}$, алкилпероксидные $RO_2^{\bullet}$, алкоксильные $RO^{\bullet}$, анион-радикалы восстановительной природы $D^{\bullet}$- и некоторые другие образуются в результате реакций каталитического инициирования, растворения активных газов из атмосферы, радиационно-химического инициирования, кавитационных эффектов, фотохимического инициирования, биологической эмиссии. Радиационное инициирование в отсутствие радиационного загрязнения водной среды осуществляется под действием естественного радиоактивного фона и происходит прежде всего в результате радиолиза воды. В обычных условиях вклад этой составляющей в суммарную скорость образования радикалов незначителен, однако он резко возрастает при радиационном загрязнении. Солнечное УФ-излучение инициирует образование свободных радикалов и протекание реакций фотохимического окисления.

Микроорганизмы, обитающие на поверхности открытых водоемов, почвы, листьев растений, подвержены наиболее активному воздействию АФК. К таким микроорганизмам можно отнести галобактерии, обитающие в мелководных соленых озерах в аридной климатической зоне, дрожжи S. cerevisiae, p. Candida, обитающие на поверхности листьев и плодов растений, и многие другие.

Воздействие АФК вызывают в природных биоценозах и их компонентах изменения, которые принято характеризовать как стрессовые, а факторы, противостоящие воздействию стресса – как антистрессовые. Так, в нивелировании стресса, индуцированного воздействием пероксида водорода, могут участвовать абиогенные процессы его распада, катализируемого микроколичествами ионов металлов переменной валентности (ионами и комплексами меди и железа и др.).

В организме человека существуют различные системы защиты от АФК, включая радиопротекторы, антиоксидантные системы и репарационные процессы. К радиопротекторам [1] относят большинство известных радиозащитных соединений, например, аминотиолы (меркамин, пропамин, аминоэтилизотиоуроний и др.), аминокислоту цистеин, цистамин, аскорбиновую кислоту, каротин, некоторые биогенные амины, не содержащие сульфгидрильных групп, цианофоры, аминофеноны, некоторые спирты, отдельные представители углеводов и др. Поступление в организм компонентов пищи и напитков, часто содержащих радиопротекторы, вещества с антиоксидантной и прооксидантной активностями, влияет на защиту от АФК и радиационного воздействия, что необходимо учитывать в профилактике неблагоприятных последствий. Однако целенаправленное профилактическое введение различных радиопротекторов для защиты организма от вредного действия ионизирующей радиации и лучевой болезни часто оказывается неэффективным.

Цель работы – получение кривых доза-эффект при воздействии на клетки дрожжей Saccharomyces cerevisiae ионизирующего излучения и исследование влияния видимого света на рост и жизнеспособность клеток после облучения на рентгеновской установке

Культивирование дрожжей S. cerevisiae T-985[2] проводили в аэробных условиях при перемешивании среды в колбах на термостатируемой качалке при 28ºС, 150 об/мин. Объем колб составлял 200 мл, объем простерилизованной среды в колбах – 50 мл, начальное значение pH среды 2,5. Посевной материал составлял, в зависимости от условий постановки эксперимента – от 2 до 10 % об. Для сравнительной оценки использовали варианты культивирования с дрожжами, последовательно адаптируемыми к внесению H_2O_2 с уровнем световой освещенности 750 Лк. Состав среды для культивирования дрожжей S. cerevisiae, г/л: $(NH_4)_2SO_4$ – 5,0; KH_2 PO_4 – 1,0; KCl – 0,15; $MgSO_4$*7H_2 O – 0,2; дрожжевой экстракт – 0,5; сахароза –30; вода – водопроводная, pH 5,8.

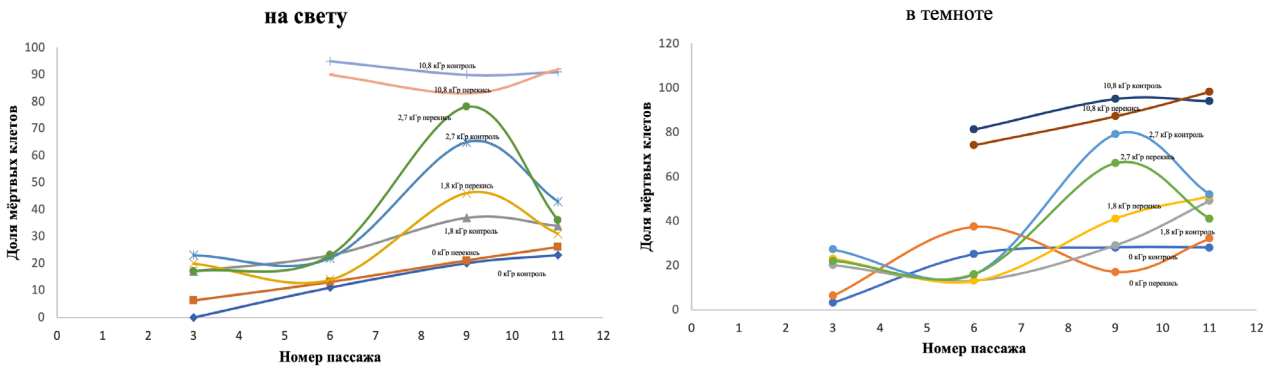


Рис. 1. Зависимость доли мёртвых клеток от дозы рентгеновского облучения при последующем выдерживании суспензии дрожжей на дневном свету и темноте

По ходу пассирования и адаптации к пероксиду водорода велись 2 линии дрожжей, по 2 колбы в каждой линии. Линия 1 – контроль, без внесения H_2O_2 и линия 2 – с внесением H_2O_2 на 18–36 час культивирования в количестве 0,6 г/л на всех пассажах. Всего провели 11 пассажей. По окончании культивирования на стадии 3-го, 6-го, 9-го и 11-го пассажей из колб отбирались аликвоты суспензии дрожжей, переносились в стикленовые пробирки объемом по 2 мл и через 1 часа облучались на рентгеновской установке Model – КАЛАН 4 в ИМСЭН-ИФХ РХТУ им. Д.И. Менделеева, мощность поглощенной дозы по дозиметру Фрикке равна 3 Гр/с при различных дозах облучения [3]. После облучения часть пробирок выдерживалась на свету, а другая часть – в темноте, а именно в течение 3 ч – пробирки 3-го пассажа, 3 сут –6-го пассажа, 1 сут – 9-го и 11-го пассажей.

Зарегистрировано, что критическими для всех вариантов пассирования и облучения являются дозы около 10 кГр, при которых доля мертвых клеток составляет свыше 80 %. Без облучения существенной разницы в доле мертвых клеток, пассированных на свету с внесением пероксида водорода и в контрольной линии, пассированной на свету без внесения пероксида водорода, не наблюдалось. Также не наблюдалось существенной разницы в доле мертвых клеток при облучении с последующим выдерживанием на свету и в темноте. В то же время отсутствие явных различий между вариантами рентгеновского облучения дрожжей, адаптированных и не адаптированных к пероксиду водорода, а также между вариантами рентгеновского облучения на свету и в темноте свидетельствует об отсутствии перекрестных реакций между ответом клеток на оксидативный стресс, а также фоторепарацией и ответом клеток на жесткое рентгеновское облучение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Радиопротекторы [электронный ресурс], режим доступа: http://www.medical-enc.ru/16/radioprotectors.shtml (дата обращения 2 парля 2019)
2. Калёнов С.В. Культивирование дрожжей и галобактерий в условиях контролируемого окислительного стресса. Дисс. на соис. учен. степени к.т.н. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. –197 стр.
3. Пхйьо Мьинт У. Реакционная способность донника, багульника, муррайи и и некоторых кумаринов в их составе. Дисс. на соис. учен. степени к.хим. н. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2018. – 145 стр.
4. Т.В. Меледина, С.Г. Давыденко. Дрожжи saccharomyces cerevisiae морфология, химический состав, метаболизм. – Санкт-Петербург, 2015.

УДК 577.15.08

ДВУХСТАДИЙНАЯ ОЧИСТКА БЕЛКОВОГО ПРЕПАРАТА LBCAS12A

В.И. Шалгуев[1], Т. Нгуен[2], И.А. Сизова[1], Н.Г. Соболева[1], П. Хегеманн[2], В.Н. Вербенко[1]

[1] Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия
[2] Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Одноклеточная зеленая водоросль Chlamydomonas reinhardtii (хламидомонада) – популярный модельный организм, который широко используется в фундаментальных и прикладных исследованиях, а в последнее время и в биотехнологии.

Система CRISPR/Cas9 открывает перспективы для редактирования генома водоросли и создания штаммов с необходимыми свойствами путем внесения желаемых мутаций в предопределенные положения генома. Ожидается, что в системе CRISPR/CAS in vivo использование белка LbCas12a из Lacnospiraceae bacterium будет более эффективно, чем белка Cas9 из Streptococcus pyogenes. Для тестирования такой системы in vitro необходимо получить значительное количество высокоочищенного белка Cas12a. Для этого в бактериальном штамме Rosetta2 с введенной плазмидой pET-28b-T7-bLbCas12a-NLS-6xHis был экспрессирован белок LbCas12a. При этом были подобраны оптимальные условия индукции: конечная концентрация индуктора IPTG в ростовой среде LB составляла 100 μM, температура инкубации 30ºC, время инкубации 4.5 часа. После экспрессии белка LbCas12a в подобранных условиях была оптимизирована процедура выделения белка LbCas12a. Для вскрытия клеток с экспрессированным белком на них воздействовали ультразвуком и далее удаляли клеточные обломки центрифугированием, затем клеточный лизат наносили на колонку с Ni-NTA агарозой, после ряда промывок белок LbCas12a элюировали в буфере, содержавшем 100 mM имидазола. Для дополнительного удаления нежелательных ДНКазных, РНКазных и других примесей после Ni-NTA-хроматографии белок дочищали гель-фильтрацией на носителе Sepharose 4B. Аналитический электрофорез в ПААГ показал более высокую чистоту белкового препарата LbCas12a, полученного двухэтапной очисткой, по сравнению с очисткой только на Ni-NTA-агарозе. Данные исследования позволят добиться дальнейшего усовершенствования технологии CRISPR.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы развития "Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» (соглашение № 075–15–2019–1663).

УДК 557.3

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ BACILLUS SUBTILIS

Е.С. Яценко, Б.П. Шипунов

Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия

Bacillus subtilis – аэробные, спорообразующие микроорганизмы, которые выделяют большое количество биологически активных веществ. В природе они участвуют в процессе аммонификации, минерализуют органические соединения азота, обеспечивают пополнение запасов минерального азота в почве, обладают выраженной протеолитической и амилолитической, и липолитической активностью. На сегодняшний день активно используются в сельском хозяйстве большое количество пробиотических препаратов и средств защиты растений на основе микроорганизмов рода Bacillus. Влияние таких физических факторов как ультразвук, широкополосный видимый свет, лазерное излучение, ультрафиолет, электромагнитные поля на жизнедеятельность микроорганизмов встречаются в литературе [1–3]. Как правило, воздействие этих факторов, направлены на подавление активности микроорганизмов. Поскольку, Bacillus subtilis, является культурой, составляющей основу многих микробиологических препаратов, представляет интерес изучение стимуляции роста численности микроорганизмов в процессе культивирования.

Цель работы – оценить влияния лазерного излучения в процессе культивирования Bacillus subtilis. Для исследования были использованы бактерии Bacillus subtilis B-12079. 5 гр. спор равномерно распределяли по чашке Петри и воздействовали лазером (длина волны 638 нм, плотность потока мощности 10 мВ/см^2, диаметр сечения пучка равен диаметру чашки), время экспозиции 1, 3, 7, 15, 25 мин. После воздействия, из спор готовили суспензию: в колбу с питательной средой, состоящую из компонентов: пептон ферментативный, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, вода дистиллированная, вносили споры, титр 10^{-7}. Культивировали в шейкер-инкубаторе «Innova 44» при 250 об/мин и температуре 37º. Для выявления численности микроорганизмов использовали стандартный метод десятикратных разведений, с высевом в чашки Петри на агаризованную среду, выше указного состава. После чего чашки с посевами инкубировали при температуре 37ºС в течение 24 часов. В качестве контрольной пробы рассматривались споры, без воздействия лазерного излучения. Все опыты были проведены в семикратной повторности. В ходе эксперимента было установлено: при воздействии лазера 1 минуту – отличий от контроля не выявлено; при 3 минутах – наблюдается не значительное увеличение численности, достоверное увеличение численности наблюдалось при воздействии лазера в течении 7 минут, при 15 и 25 минутах – подавляющий эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Особенности воздействия низкоинтенсивных электромагнитных излучений различных диапазонов на микроорганизмы / В.А. Монич, С.Л. Малиновская, Т.В. Махрова, Д.С. Малиновский // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – № 2, С. 435–438.

2. Индуцированное ИК лазерным излучением фототоксическое воздействие конъюгатов плазмонно-резонансных наночастиц с красителем индоцианиновым зеленым на бактерии Staphylococcus aureus» / Е.С. Тучина, В.В. Тучин, Б.Н. Хлебцов, Н.Г. Хлебцов // Квантовая электроника. – 2011. – № 4, С. 354–359.

3. Влияние лазерного облучения на поведения бактерий/ Т.А. Матюшова // Сборник материалов 69-я научно-практическая конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы современной медицины и фармации-2015», С. 823–826.

Секция 7. Промышленная биотехнология и производство БАВ

УДК 579.66

НОВАЯ РЕКОМБИНАНТНАЯ ФИТАЗА ИЗ CITROBACTER GILLENII – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КОРМОВОЙ ФЕРМЕНТ

А.А. Ткаченко, С.П. Синеокий, Т.Л. Гордеева

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

Фосфор – макроэлемент, входящий в состав всех живых организмов. Он присутствует в клетках животных, растений в виде различных неорганических и органических соединений. Неотъемлемой частью всех кормов, применяющихся в животноводстве, являются бобовые и зерновые культуры. До 2/3 неорганического фосфора в данных культурах представлено нерастворимыми солями фитиновой кислоты – фитатами (мио-инозитол 1,2,3,4,5,6 – гексакисфосфатами).

Моногастричные животные (свиньи, куры, индюшки, утки и рыбы) не способны усваивать фитатный фосфор из-за отсутствия в гастроэнтеральном тракте необходимых ферментов. Кроме того, фитаты активно связывают различные микроэлементы, ионы двухвалентных металлов, белки, аминокислоты в труднодоступные для переваривания комплексы. Для решения данных проблем необходимо использовать высокоэффективные ферментные препараты, содержащие фитазы.

Фитазы (мио-инозитол гексакисфосфат фосфогидролазы (ЕС 3.1.3.8 и 3.1.3.26)) катализируют гидролиз фитатов с поэтапным отщеплением неорганического фосфата. Фитазы получают микробиологически с использованием штаммов-продуцентов, в частности, сконструированных на основе P. pastoris. Данные дрожжи прекрасно изучены, считаются безопасными (имеют GRAS статус), характеризуются высокой скоростью роста и возможностью секреции целевого белка в больших количествах в культуральную жидкость.

Фитазы класса кислых гистидиновых фосфатаз получили наибольшее применение в агробиотехнологии, так как они по свойствам более подходят для работы в ЖКТ животных. Данные фитазы были выделены как из грибов, так и из бактерий.

В настоящее время не найдено фитаз с оптимальным набором свойств, необходимых для эффективного применения в качестве кормовых добавок. Таким образом, актуальным является поиск новых фитаз с промышленно-ценными характеристиками.

Была исследована новая рекомбинантная фитаза PhyCg из C. gillenii. Ген phyCg, кодирующий PhyCg фитазу, был экспрессирован в P. pastoris. Для этого он был оптимизирован по кодоновому составу, синтезирован, клонирован в вектор pPIC9 под контролем индуцибельного промотора гена AOX1. Для отбора трансформантов в векторе предусмотрен селективный маркер HIS4-, а для секреции фермента в культуральную жидкость – сигнальный пептид, пре-про-последовательность α-фактора дрожжей S. cervisiae. Продуктивность наиболее активного трансформанта составила 187 ед./мл на 48 ч индукции метанолом при культивировании в колбе. Рекомбинантный фермент был выделен, очищен и охарактеризован. Анализ аминокислотной последовательности фермента показал, что зрелый белок состоит из 410 аминокислот и относится к семейству кислых гистидиновых фосфатаз. Аминокислотная последовательность фитазы PhyCg имеет наибольшую гомологию (73,49 %) с последовательностью фитазы из Citrobacter braakii. Рекомбинантная фитаза PhyCg обладает высокой удельной активностью, широким диапазоном рабочего интервала pH (сохраняет высокую активность при pH 6,0, что делает ее перспективной кормовой добавкой для аквакультур), высокой устойчивостью к действию pH и кинетическими параметрами, характерными для высокоактивных ферментов.

Таким образом, в ходе работы была показана возможность эффективной экспрессии гена phyCg, кодирующего новую фитазу из C. gillenii, в P. pastoris. Благодаря своим свойствам, новая рекомбинантная фитаза PhyCg может быть рассмотрена в качестве перспективного фермента для агробиотехнологии, а также создания промышленного штамма-продуцента на основе P. pastoris.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Грант № 075–15–2019–1658 от 31.10.2019 г.) с использованием ресурсов уникальной научной установки – Биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов.

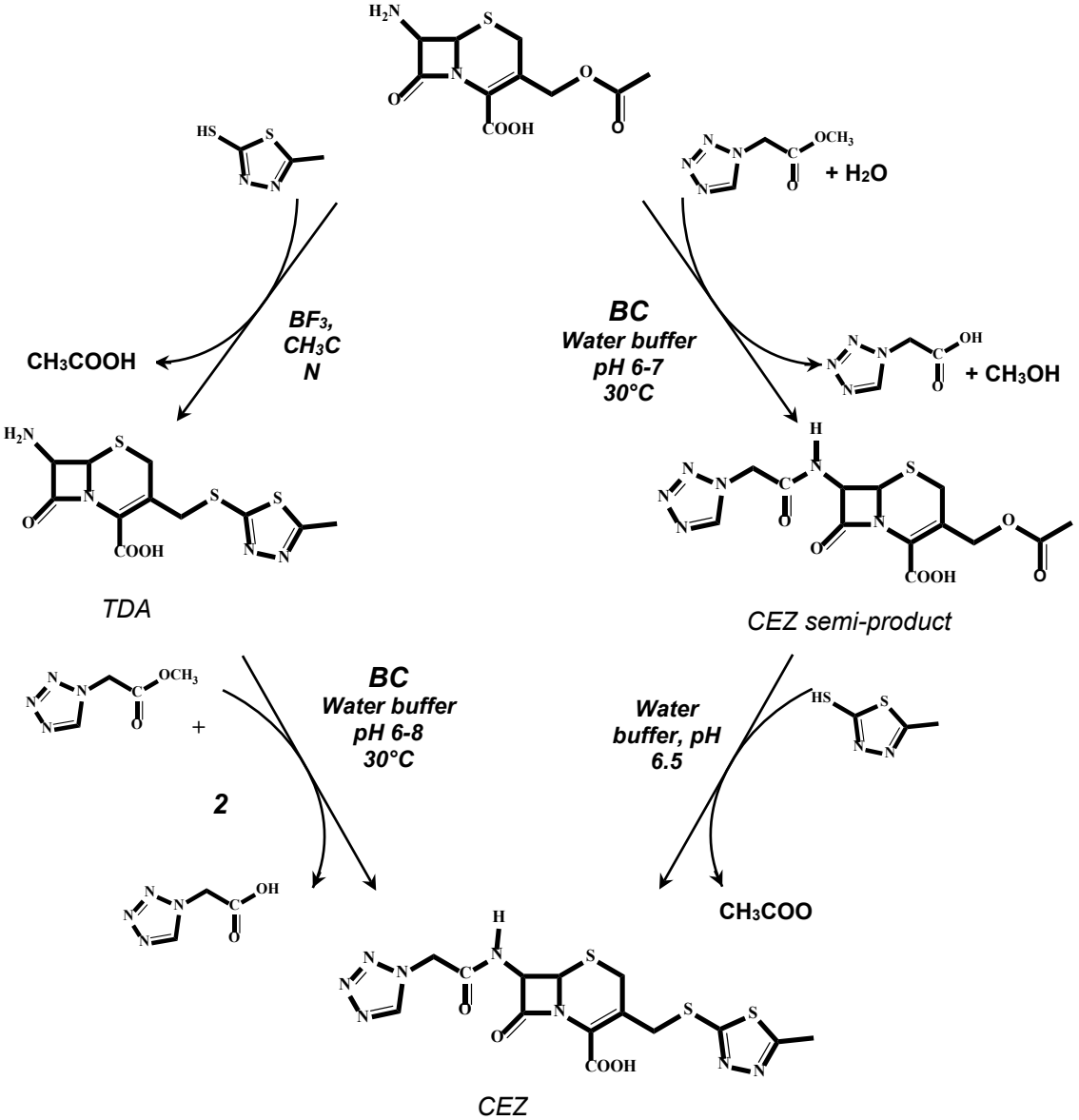
УДК 577.151; 579.66

ВЫБОР ХИМИКО-БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО ПУТИ СИНТЕЗА ЦЕФАЛОСПОРИНОВОГО АНТИБИОТИКА

А.В. Скляренко, И.А. Грошкова, С.В. Яроцкий

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Современной альтернативой традиционному химическому синтезу β-лактамных антибиотиков, в том числе относящихся к классу цефалоспоринов, являются технологии, включающие трансформации, катализируемые ферментами в форме гетерогенных биокатализаторов (БК). Это позволяет существенно уменьшить экологическую нагрузку на окружающую среду, сократить энергетические затраты, а также повысить чистоту получаемых продуктов [1, 2].



Цефалоспориновые антибиотики – производные 7-аминоцефалоспорановой кислоты (7-АСА), могут быть синтезированы двумя путями, показанными на рис. 1 на примере синтеза цефазолина (CEZ). В первом случае сначала химическими методами вводят необходимый заместитель в С7-положение 7-АСА (рис. 1, трансформация 1), а затем осуществляют биокаталитическое ацилирование аминогруппы полученного производного (TDA) с образованием целевого антибиотика (рис. 1, трансформация 2).

Альтернативным путем является использование биокатализа для ацилирования аминогруппы в С3-положении 7-АСА (рис. 1, трансформация 3) с последующим химическим превращением получаемого полупродукта (S-p CEZ) в целевой антибиотик (рис. 1, трансформация 4) [3, 4]. Оценка эффективности каждого из этих путей была задачей данного исследования.

Для сравнительного изучения процессов биокаталитического ацилирования TDA [5] и 7-АСА [4] с образованием CEZ и S-p CEZ, соответственно, в качестве биокатализатора использовали синтетазу цефалоспоринов-кислот (CASA) из рекомбинантного штамма E. coli ВКПМ B-12316, иммобилизованную путем ковалентного связывания с эпокси-активированным макропористым носителем (IECASA) [5] с синтетазной активностью 400–420 МЕ/г. Биокаталитические трансформации осуществляли методом кинетически-контролируемого синтеза (синтеза с ацильным переносом) [6], где TDA или 7-АСА выступали в качестве исходного β-лактама – ключевой аминокислоты (КА). При этом ацилирующим агентом (АА) служил метиловый эфир тетразолилуксусной кислоты (METzAA). Синтез осуществляли в 0.3 М фосфатно-натриевом буфере при 30 °С и содержании активного фермента в реакционной смеси 10–12 МЕ/мл. Для контроля процессов использовали метод Высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

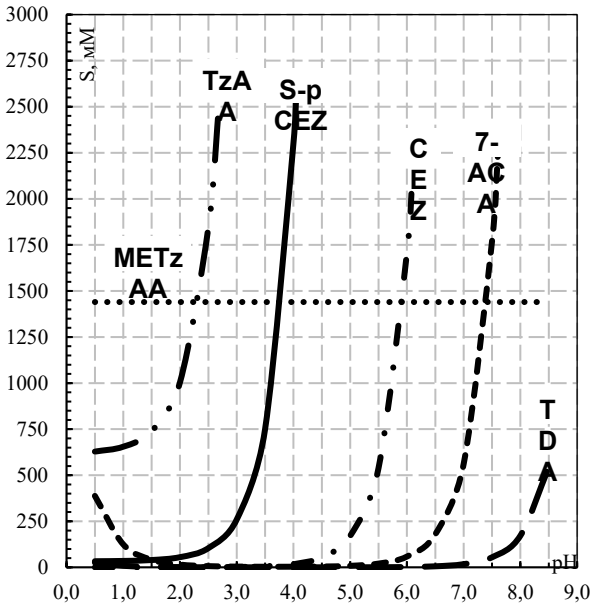


Рис. 2. Зависимость от pH растворимости соединений, вовлеченных в процессы биокаталитического синтеза CEZ

В реакционной смеси, получаемой при биокаталитическом синтезе β-лактамного антибиотика методом ацильного переноса, присутствуют четыре компонента: целевой продукт (CEZ или S-p CEZ), ключевая аминокислота (TDA или 7-АСА), ацилирующий агент (METzAA) и побочный продукт тетразолилуксусная кислота (TzAA) (рис. 1). Учет их растворимости является важным инструментом оптимизации процессов биокаталитической трансформации и последующего выделения целевого продукта [7]. На рис. 2 представлены теоретические кривые, описывающие зависимость от pH растворимости соединений, вовлеченных в изучаемые биокаталитические процессы. Кривые были рассчитаны с использованием значений характеристической растворимости и констант ионизации электролитов, экспериментально определенных нами методом насыщения в условиях протекания биокататалитических процессов (30 °С, 0.3 М фосфатно-натриевый буфер) [4, 5]. Низкая растворимость TDA (рис. 2) в рабочем диапазоне pH 6–8, оптимальном для функционирования CASA, являлась осложняющим фактором для осуществления эффективного процесса синтеза CEZ. Для решения проблемы был применен ступенчатый градиент pH, предотвращающий выпадение осадка КА в ходе трансформации с использованием исходной концентрации TDA (C^o_{KA}=150–200 мМ), многократно превосходящей ее растворимость при нейтральных pH. В диапазоне pH 6–8 растворимость 7-АСА примерно в 32 раза превосходит растворимость TDA (рис. 1), что позволило осуществлять синтез S-p CEZ в простом спонтанно устанавливающемся градиенте pH даже при высокой исходной концентрации 7-АСА вплоть до C^o_{KA}=320 мМ.

Было проведено исследование влияния исходной концентрации КА (C^o_{KA}, мМ) и избытка АА над КА (X^o, М/М) на эффективность процессов кинетически-контролируемого синтеза CEZ и S-p CEZ, оцениваемую по достигаемому максимальному выходу β-лактамного продукта (η^{max}, %). Результаты представлены на рис. 3 и 4, соответственно.

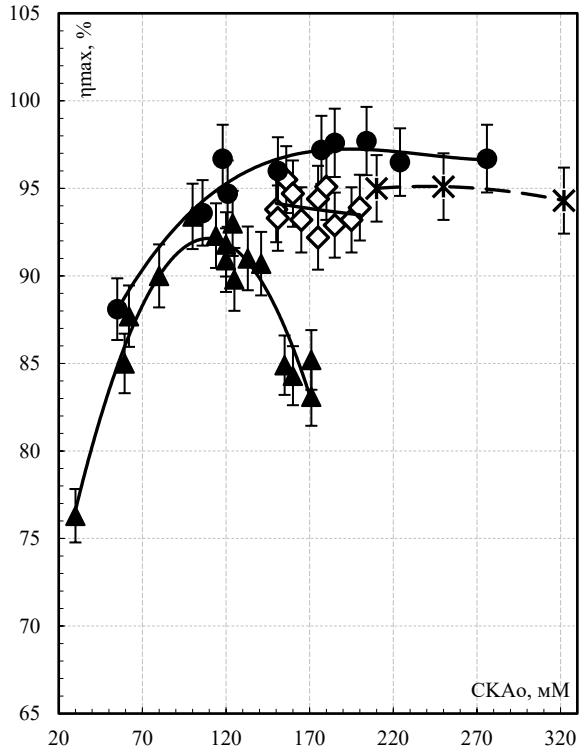


Рис. 3. Зависимость максимального выхода β-лактамного продукта от исходной концентрации КА при синтезе с ацильным переносом, катализируемом IECASA: ✱ – синтез S-p CEZ из 7-ACA и METzAA; спонтанный градиент pH в диапазоне от 7.0±0.2 до 6.0, далее поддержание pH 6.0±0.1; X^o = 2.9–3.1 M/M; ● – то же при X^o = 2.5 M/M. ▲ – синтез CEZ из TDA и METzAA при X^o = 3.1–3.5 M/M, ступенчатый градиент pH от 8.2–8.3 с поддержанием pH 6.8±0.1 и pH 6.0±0.1; ◇ – синтез CEZ из TDA и METzAA при X^o = 3.1–3.5 M/M, спонтанный градиент pH от 8.2–8.3 до 6.0, далее поддержание pH 6.0±0.1

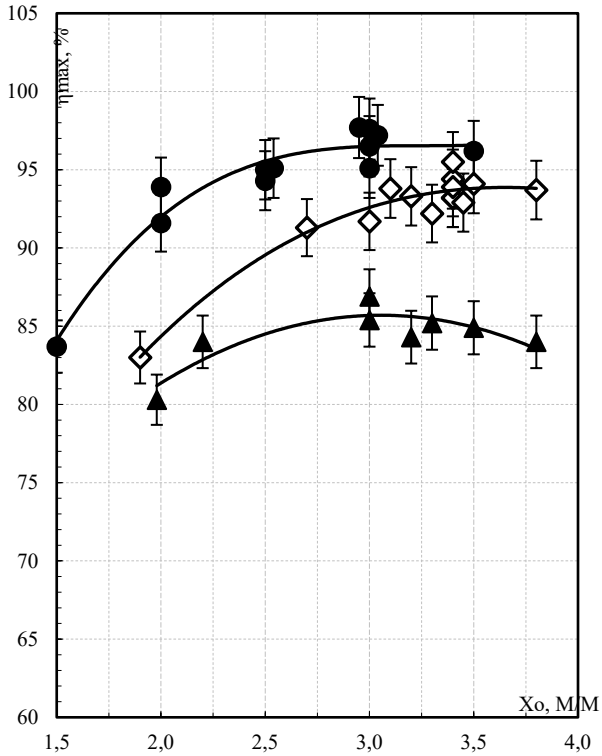


Рис. 4. Зависимость максимального выхода β-лактамного продукта от исходного мольного избытка АА над КА при синтезе с ацильным переносом, катализируемом IECASA: ● – синтез S-p CEZ из 7-ACA и METzAA при C^o_{KA} = 180–330 мМ; спонтанный градиент pH в диапазоне от 7.0±0.2 до 6.0, далее поддержание pH 6.0±0.1; ◇ – синтез CEZ из TDA и METzAA; C^o_{KA} = 150–200 мМ; ступенчатый градиент pH от 8.2–8.3 до 6.0 с поддержанием уровней pH 6.8±0.1 и pH 6.0±0.1; ▲ – то же при C^o_{KA} = 145–170 мМ; спонтанный градиент pH от 8.2–8.3 до 6.0, далее поддержание pH 6.0±0.1

На основе полученных данных выбраны оптимальные условия проведения синтеза CEZ (ступенчатый градиент pH, C^o_{KA} = 150–200 мМ, X^o =3.1–3.5 M/M) и синтеза S-p CEZ (спонтанный градиент pH, C^o_{KA} = 200–330 мМ, X^o =2.5–3.0 M/M). При этом для синтеза CEZ η^{max} = (93.5±1.5)%, а для синтеза S-p CEZ η^{max} = (96.5±1.5)%.

Сопоставление биокаталитического синтеза CEZ, исходя из TDA, и S-p CEZ, исходя из 7-ACA, (рис. 1, трансформации 2 и 3) свидетельствует о ряде важных преимуществ второго процесса: более высокий выход целевого β-лактама в случае синтеза S-p CEZ, достигаемый при более высокой C^o_{KA} и меньшем X^o; осуществление процесса синтеза S-p CEZ в простом спонтанном градиенте pH 7.0–6.0, благоприятном для активности и стабильности фермента, вместо ступенчатого градиента pH от 8.3 до 6.0, используемого при синтезе CEZ; повышение концентрации целевого β-лактама в конечной реакционной смеси в 1.3–1.5 раза; возможность использования продукта биокаталитического

ацилирования 7-ACA метиловым эфиром TzAA в качестве полупродукта для получения не только CEZ, но и цефалоспоринового антибиотика цефтезола.

Получение CEZ через трансформации 3 и 4 (рис. 1) может быть осуществлено как единый процесс без выделения S-p CEZ из реакционной смеси. Следует отметить также, что процесс химической трансформации S-p CEZ в CEZ (рис. 1, трансформация 4), протекающий при 30 °C в водной среде, с экологической точки зрения предпочтителен процессу получения TDA из 7-ACA (рис. 1, трансформация 1), осуществляемому при низкой температуре (-40 °C) в среде токсичных реагентов (BF_3, CH_3 CN).

Можно заключить, что химико-биокаталитический синтез CEZ по пути прямого биокаталитического ацилирования 7-ACA представляется перспективной заменой традиционного пути, использующего биокаталитическое ацилирование TDA.

ЛИТЕРАТУРА

Rodriguez-Herrera R., Puc L.E.C., Sobrevilla J.M.V., Luque D., Cardona-Felix C.S., Aguilar-González C.N., Flores-Gallegos A.C. Enzymes in the Pharmaceutical Industry for β-Lactam Antibiotic Production / Ed. M. Kuddus: Acad. Press, 2019. Ch. 36. P. 627–643.

Sklyarenko A.V., Eldarov M.A., Kurochkina V.B., Yarotsky S.V. Enzymatic synthesis of β-lactam acids (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. № 6. P. 627–640.

Barber MS., Giesecke UE, Reichert A, Minas W. Industrial enzymatic production of cephalosporin-based β-lactams // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. V. 88. P. 179–215.

Скляренко А.В., Грошкова И.А, Сидоренко А.И., Яроцкий С.В. Альтернативный синтез цефазолина с использованием синтетазы цефалоспоринов-кислот // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 5. С. 1–13.

Wang Lu, Sklyarenko A.V., Li Duanhua, Sidorenko A.I., Zhao Chen, Li Jinjun, Yarotsky S.V. Enzymatic synthesis of cefazolin using immobilized recombinant cephalosporin-acid synthetase as the biocatalyst // Bioprocess Biosyst. Eng. 2018. V. 41. № 12. P. 1851–1867.

Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. // Enzymatic Synthesis of beta-Lactam Antibiotics / Ed. G.E. Zaikov. New-York: Nova Science Publishers, 2008. Ch. 20. P. 175–204.

Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V., Satarova D.E., Yarotsky S.V. Ionization constants and solubility of compounds involved in enzymatic synthesis of aminopenicillins and aminocephalosporins //Bioprocess Biosyst. Eng. 2011. V. 34. № 9. P. 1103–1117.

УДК 577.218

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ GLNR ИЗ LACTOBACILLUS HILGARDII

Д.Э. Журавлева, З.И. Исхакова, А.Р. Каюмов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Бактерии рода Lactobacillus – грамположительные, палочковидные, факультативно аэробные или микроаэрофильные неспорообразующие бактерии. Лактобациллы широко распространены в природе, занимают различные ниши в организме человека и животных, используются в промышленности, но, несмотря на это, их азотный метаболизм остается слабо изученным. Одними из ключевых белков в азотном метаболизме бактерий являются PII-белки. PII – семейство сигнальных белков, контролирующих широкий спектр мишеней в клетке. Из 280 видов рода Lactobacillus, известных на сегодняшний день, только 5 видов имеют гены, кодирующие PII-подобные белки в геноме.

Ранее в нашей лаборатории при исследовании PII-подобного белка PotN из L. hilgardii было обнаружено, что с ним коэлюируется белок GlnR семейства факторов транскрипции MerR. Белки GlnR в клетках разных бактерий принимают участие в регуляции метаболизма азота. Функция GlnR в клетках L. hilgardii пока не исследована. Поэтому целью работы было установить функциональную роль MerR-подобного фактора транскрипции GlnR в клетках L. hilgardii.

Было произведено полногеномное секвенирование L. hilgardii на платформах Illumina MiSeq и Oxford Nanopore MinION. Анализ генома показал, что ген glnR находится в опероне glnRA с глутаминсинтетазой, в клетках ближайших родственных бактерий B. subtilis, вместе они осуществляют регуляцию метаболизма азота в условиях его избытка.

Ген glnR был клонирован в экспрессионный вектор pET15b, и рекомбинантный белок GlnR был очищен до электрофоретически гомогенного состояния с помощью аффинной хроматографии. Методом гель-фильтрации было показано, что белок GlnR не способен к димеризации в условиях in vitro в отличие от L. plantarum и B. subtilis. Также методом ВЭЖХ проводили верификацию взаимодействия белка GlnR с белком PotN. В результате было показано, что тример белка PotN может связывать либо три, либо два, либо 1 димер GlnR. В условиях без эффекторных молекул образуются все виды комплексов, а в присутствии АТФ и АДФ комплексы образуются в небольших количествах, исследуемые белки находятся в основном в виде мономеров. Мы предполагаем, что в присутствии эффекторных молекул изменяется конформация белка PotN, что препятствует его связыванию с GlnR (рисунок 1).

Затем проводили верификацию взаимодействия белка GlnR с белком PotN методом микроколичественного термофореза. Было обнаружено, что аффинность белков в отсутствии эффекторных молекул составляет 1.3 μM, присутствие АТФ понижает аффинность в 10 раз, присутствие АДФ в 3 раза. Значит, что присутствие эффекторных молекул препятствует образованию комплексов PotN-GlnR, что подтверждает результаты предыдущих экспериментов.

Так как анализ аминокислотной последовательности GlnR выявил наличие характерного ДНК-связывающего мотива спираль-поворот-спираль, мы предположили наличие у белка GlnR ДНК-связывающих свойств. Мы исследовали ДНК-связывающую активность GlnR методом задержки в геле. Мы установили, что GlnR взаимодействует с ДНК только при больших концентрациях белка, при добавлении белка PotN ДНК-связывающая активность GlnR повышается, и комплекс GlnR-ДНК образуется при в 10 раз меньших концентрациях белка GlnR. Здесь можно говорить о том, что PotN повышает ДНК-связывающую активность GlnR.

В зависимости от доступности питательных веществ для клетки белок PotN может связывать от одного до трех димеров GlnR, тем самым повышая его ДНК-связывающую активность. Этот механизм можно назвать способом регуляции активности GlnR.

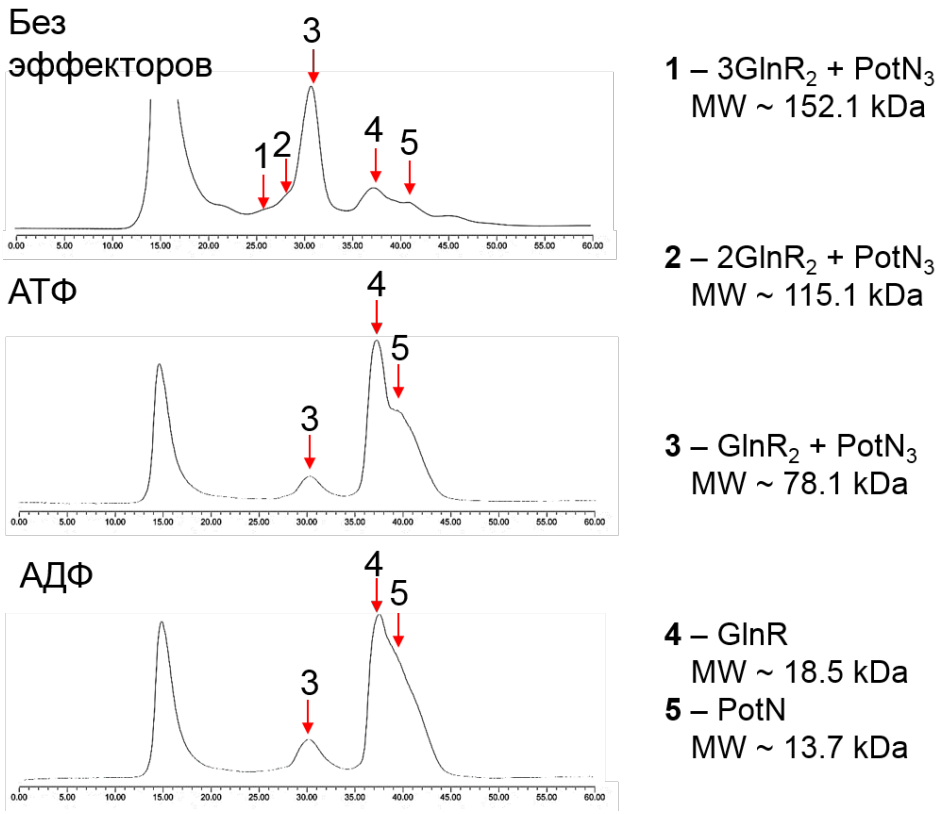


Рисунок 1 – Хроматограммы смесей белков PotN и GlnR в присутствии и отсутствии эффекторных молекул

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (№ МД-572.2020.4).

ЛИТЕРАТУРА

Дорошчук, Н.А. Регуляция азотного метаболизма в грамположительных бактериях [Текст] / Н.А. Дорошчук, М.С. Гельфанд, Д.А. Родионов // Мол. Биол. –2006. – Т.40. – № 5. – С. 919–926.

Brown, N.L. The MerR family of transcriptional regulators [Text] / N.L. Brown, J.V. Stoyanov, S.P. Kidd, J.L. Hobman // FEMS Microbiol. –2003. – V.27. – P.145–163.

Fisher, S.H. Regulation of nitrogen metabolism in Bacillus subtilis: vive la difference! [Text] / S. H .Fisher // Mol. Microbiol. – 1999. – V.32. – P.223–232.

Forchhammer, K. P (II) signal transducers: novel functional and structural insights [Text] / K. Forchhammer // Trends Microbiol. –2008. – V.16. – P.65–72.

Kormelink, T.G. Comparative genome analysis of central nitrogen metabolism and its control by GlnR in the class Bacilli [Text] / T.G. Kormelink, E. Coenders, Y. Hagemeijer, L. Overmars, R.J. Siezen, W.M. de Vos, C. Francke // BMC Genomics. –2012. – V.13. – P.191.

УДК 57.081.23

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ СВЕРХСЛАБОГО СВЕЧЕНИЯ БАД «ЭРАКОНД» МЕТОДОМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

А.Н. Крячко[1], Е.Е. Пономарев[2], В.Н. Козлов[2], Л.Ф. Пономарева[2], Г.М. Муллагулова[2]

[1] ООО «Эраконд», г. Стерлитамак, Россия
[2] БИТУ (филиал) МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ), г. Мелеуз, Россия

Водный экстракт люцерны в виде 40 %-го раствора известен как антиоксидант растительного генеза, применяемый для консервирования продуктов питания длительного хранения [1]. Эффективный способ оценки антиокислительной активности биоматериалов – метод регистрации хемилюминесценции, регистрирующий интенсивность процессов сверхслабого свечения исследуемых объектов. Для оценки антиоксидантной активности БАД «Эраконд», производимой ООО «Эраконд» (г. Стерлитамак), использовали модельную систему, генерирующую активные формы кислорода – $O_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$, O_2 $H^{\bullet}$ и H_2 O_2 [2]. Для регистрации интенсивности фотонного излучения в модельной тест-системе использовали прибор хемилюминомер – 003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве контроля служила модельная система, содержащая фосфатный буфер, где инициировались процессы радикалообразования, приводящие к серии последовательных процессов: увеличение скорости экзотермических химических реакций, повышение интенсивности квантовых переходов электронов ($\vec{e}$) в возбужденное состояние (e*), возврат $\vec{e}*$ на стационарную орбиталь с трансформацией его энергии в кванты света, или электромагнитные волны с λ = 400–700 нм. На рисунке представлены кривые записи хемилюминесценции (рис.).

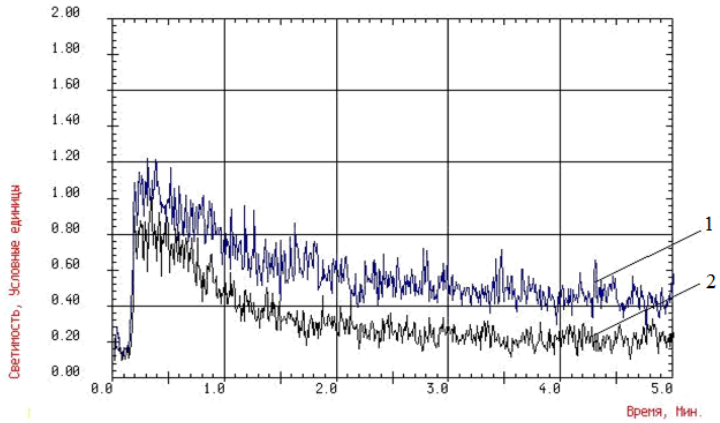


Рисунок – Запись хемилюминесценции в 1-й модельной тест-системе, генерирующий процессы образования АФК: 1 – контроль (фосфатный буфер); 2–40 %-й раствор экстракта люцерны

Эраконд, введенный в модельную систему, где генерировались АФК, подавлял интенсивность свечения с 104,8 ± 4,20 у. е. в контроле до 89,41 ± 2,25 у. е. ($p \leq 0,01$) в опыте – снижение интенсивности свечения на 14,7 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 2634552 Способ консервирования яиц / В.Р. Ибрагимов, В.Н. Козлов, Р.Р. Максютов, Е.Е. Пономарев – Опубл. 31.10.2017 // Бюл. № 31.
2. Фархутдинов Р.Р., Тевдорадзе С.И. Методики исследования хемилюминесценции биологического материала на хемилюминомере ХЛ-003 // Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения: Сб. докл. М., 2005. – С. 147–154.

УДК 57.081.23

МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ

Е.Е. Пономарев[1], А.Н. Крячко[2], Е.В. Кузнецова[1], Н.В. Байматов[3], Р.Р. Максютов[1]

[1] БИТУ (филиал) МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ), г. Мелеуз, Россия
[2] ООО «Эраконд, г. Стерлитамак, Россия
[3] Федеральное медико-биологическое агентство РФ, г. Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Медико-статистические данные свидетельствуют о росте так называемых радиоидуцированных повреждений, в том числе и онкопатологии. Сложившаяся радиоэкологическая обстановка на современном этапе развития цивилизации сопровождается ростом острой и хронической лучевой патологии.

К числу эффективных средств для профилактики острой и хронической лучевой патологии относятся полифенольные соединения растительного генеза. Из существующего спектра антиоксидантов полифенольные соединения отличаются повышенной фармакологической способностью. Известно, что антиоксидантная активность полифенолов обуславливается рядом факторов: наличием в структуре гидроксильных (-OH) групп, алкильных (-CH_3) и терпеновых ($CH = C(CH)_3 - CH = CH_2$) групп в орто-положении [6].

Полифенолы реализуют, как известно, антиоксидантный эффект с помощью широкого спектра механизмов: скавенированием активных форм кислорода (АФК), хелатированием переходных металлов, ингибированием оксидаз. По мнению ряда авторов, механизмы отдачи атомов водорода гидроксильными группами играют существенно большую роль в реализации антирадикальных свойств полифенолов, чем механизмы образования фенокси-радикалов (ароксидов) за счет делаколизации неспаренных электронов в ароматические кольца [6]. Полифенолы, в отличие от других антиоксидантов, являются экзогенными субстратами для синтеза in vivo эндогенных антиоксидантов, в частности убихинона [5]. Убихинон, или Кофермент Q, синтезируется в организме из мевалоновой кислоты, фенилаланина и тирозина. Убихинон, представляющий 2,3 – метокси-5-метил – 1,4 – бензохинон с изопреновой цепью в 6-м положении, относится к эффективным эндогенным антиоксидантам благодаря наличию в его структуре ряда функциональных групп с антиоксидантной активностью. Высокая антирадикальная активность Коэнзима Q обусловлены химическим строением соединения, которая в орто-положении имеет метильную (-CH_3) группу, а в мето-положении остатки изопрена, число которых может варьировать от 6 до 10. Две метоксигруппы (-OCH_3) у 2-го и 3-го атомов углерода фенольного кольца также способны инактивировать свободные радикалы: смещение электронов в атоме кислорода в сторону фенольного кольца приводит к увеличению полярности – O-CH_3связи, поэтому убихинон легко вступает в окислительно-восстановительные реакции со свободными радикалами ($R^{\bullet}$). Убихинон Q содержит в орто-положении метильную группу (CH_3), которая обуславливает антирадикальную активность рассматриваемого кофермента дыхательной цепи митохондрий. Результаты исследований последних лет позволили прийти к выводу, что относительно высокой активностью характеризуются пространственно-затрудненные (ПЗФ), или так называемые экранированные фенолы (ЭФ), которые помимо гидроксильных групп содержат заменители в орто-положении фенольного кольца и метильный радикал в пара-положении [1, 2].

С учётом вышеизложенного следует считать перспективными исследования, направленные на идентификацию в продуктах питания и лекарственных растениях фармакологически активных полифенольных соединений, содержащих в своём составе широкий спектр функциональных групп (гидроксильные, алкильные, терпеновые), обеспечивающих высокую степень антирадикальных свойств.

Цель исследования – идентификация высокоэффективных флавоноидов в составе 40 %-го водного экстракта люцерны посевной.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализов «Эраконд» растворяли в элюенте (ацетонитрил: вода=80:20), концентрация составила 10 мг/мл. Данный образец анализировался методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматографический анализ проводили на системе Waters Breeze со спектрофотометрическим детектором при длинах волн 275 и 360 нм. Определение проводили при градиентном элюировании на колонке Luna C18 250x4.6 мм, 5 мкм. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин.

Для количественного определения флавоноидов в представленном образце были построены градуировочные графики для смесей стандартов флавоноидов с концентрациями стандартных веществ 0.005 мг/мл, 0.01 мг/мл, 0.025 мг/мл и 0.05 мг/мл (хроматограмма рис. 1).

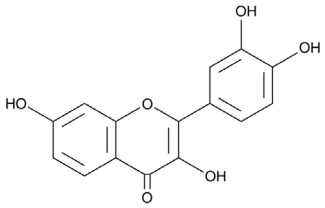


Рисунок 2 – Структурная формула физетина

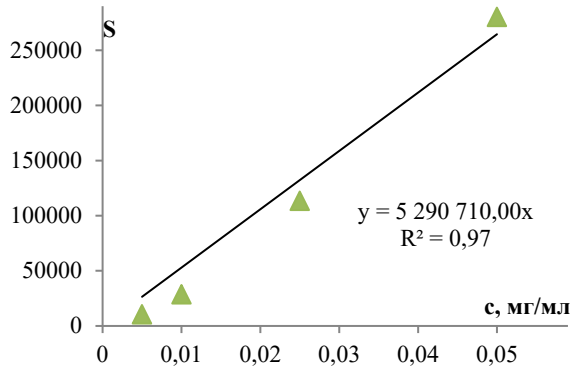


Рисунок 3 – Градуировочный график для физетина (длина волны определения 275 нм)

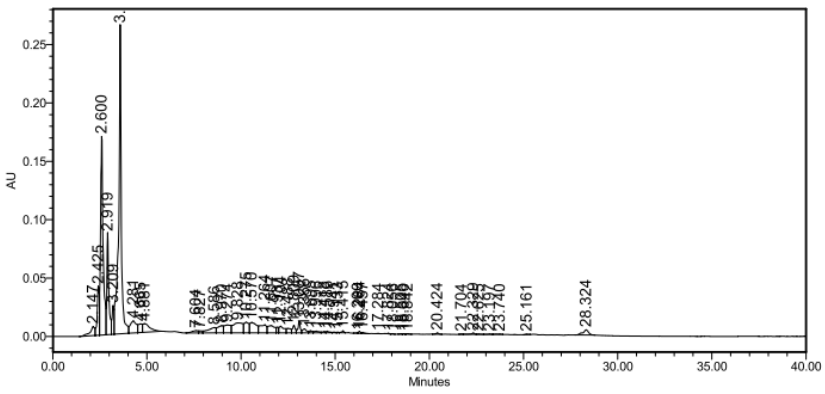


Рисунок 1 – Хроматограмма образца «Эраконд» (длина волны определения 275 нм)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Одна из задач радиобиологии – идентификация эффективных радиопротекторов, в том числе относящихся к полифенольным соединениям. В качестве радиопротектора широко используется люцерна посевная, на основе которой выпускается БАД «Эраконд». В ходе экспериментальных исследований, реализованных в ИОХ Уфимского Научного Центра РАН (г. Уфа), в составе 40 %-го водного раствора «Эраконда» идентифицирован биофлавоноид физетин (рис. 2).

Для идентификации и количественного анализа физетина в составе 40 %-го водного экстракта «Эраконда» использован стандарт данного флавоноида (рис. 3).

В результате хроматографического анализа в БАД «Эраконд» идентифицирован физетин в следующих концентрациях: 0,72 ± 0,08 мг (0,07 %) – спектрофотомерия при длине волны 360 нм, 15,0 ± 3 мг (1,5 %) – спектрометрия при длине волны 275 нм. Одна из задач данной работы состояла в раскрытии механизмов антирадикальной активности физетина.

Физетин, как известно, относится к классу питательных веществ – антиоксидантов, потенцирующих биологические эффекты аскорбиновой кислоты. Исследования показали, что физетин – один из самых мощных сенолитиков, способных активизировать процессы апаптоза. Физетин, в отличие от экранированных фенолов, содержит четыре гидроксильные группы и одну кето-группу (рис. 2).

Многообразие биологических эффектов физетина обуславливается его антиоксидантными свойствами. Способность скавенировать свободные радикалы, как указывают ряд авторов, определяется количеством гидроксильных групп [2].

К числу полифенольных соединений, реализующих антирадикальные свойства за счёт гидроксильных групп относятся следующие представители: ликвиритигенин (2), нарингенин (3), физетин (4), кверцитин (5), дегидрокверцетин (5) – в скобках указано число ОН-групп в структуре полифенолов. По количеству гидроксильных групп физетин уступает дегидрокверцетину и кверцетину. Выраженные антиоксидантные свойства физетина обуславливается наличием в структуре В-ароматического кольца гидроксильной группы в пара-положении (рис. 2).

В ранее проведенных исследованиях установлена антиоксидантная активность экстракта люцерны. В модельной тест-системе, где генерировались процессы пероксидации желточных липопротеидов, водный экстракт люцерны снижал светосумму хемилюминесценции до 90,21 ± 0,67 у. е. ($p \leq 0{,}001$) против 106,73 ± 1,77 у. е. в контроле [3]. Эраконд, содержащий широкий спектр полифенольных соединений, рекомендуется в качестве эффективного средства для коррекции патофизиологических сдвигов в системе окислительного гомеостаза при острой лучевой патологии [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельков М.В. Инфракрасные спектры и фармакологическая активность экранированных фенолов / М.В. Бельков, Г.И. Полозов, И.В. Скорняков и др. // Журнал прикладной спектроскопии. – 2011. – Т. 78, № 3. – С. 427–432.
2. Зверев Я.Ф. Флавоноиды как перспективные природные антиоксиданты / Я.Ф. Зверев, В.М. Брюханов // Бюллетень медицинской науки. – 2017. – № 1 (5). – С. 20–27.
3. Кари М. Исследование влияния фитопрепаратов на процессы свободнорадикального окисления в желточных липопротеидах in vitro / М. Кари, В.Н. Байматов, В.Н. Козлов, А.М. Багаутдинов, Е.Е. Пономарев // Известия Международной академии аграрного образования. – 2018. – № 42–1. – С. 123–127.
4. Козлов В.Н. Активность антиоксидантных ферментов у крыс при экспериментальной острой лучевой болезни / В.Н. Козлов, В.Н. Байматов, Кари Мохамадулла Ходжа, Е.В. Кузнецова и др. // Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология. – 2019. – № 8. – С. 50–56.
5. Чиркин А.А. Биохимия / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: «Медицинская Литература», 2010. – 624 с.
6. Щетинин П.П. Механизмы реализации антирадикальной активности пространственно затрудненных фенолов / П.П. Щетинин, А.П. Щетинина // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. – № 12–3. – С. 112–114.

УДК 579.873.6:60:606

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ КАТАБОЛИЗМА СТЕРОИДОВ У NOCARDIOIDES SIMPLEX ВКМ АС-2033Д ПРИ ИНДУКЦИИ АЦЕТАТОМ КОРТИЗОНА

В.В. Фокина[1], Е.Ю. Брагин[1], В.Ю. Штратникова[2], М.В. Донова[1]

[1] ООО Фарминс, г. Пущино, Россия
[2] МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

АктинобактерииNocardioidessimplex ВКМ Ac-2033Д способны осуществлять 1-дегидрирование 3-кетостероидов с высокой эффективностью, что определяет практическое применение штамма в качестве промышленного биокатализатора для получения фармацевтическиценных 1(2) – дегидрокортикостероидов. Штамм конвертируетразличные стерины и холаты, а также проводит другие реакции трансформации стероидов (гидролиз стероидных эфиров, окисление / восстановление гидроксильных групп, и др.). Для генной инженерии штамма и улучшения его биокаталитических свойств необходима идентификация ключевых генов, вовлеченных в катаболизм стероидов.

Ранее нами секвенирован и собран полный геном штамма, определены гены, предположительно вовлеченные в метаболизм стероидов, их организация и возможная регуляция [1]. В данной работе проводили исследование дифференциальной экспрессии генов в условиях индукции ацетатом кортизона. Ацетат кортизона является известным индуктором бактериальных 3-кетостероид-Δ^1-дегидрогеназ.

Штамм N. simplexвыращивали в присутствии ацетата кортизона и без него (контроль). Очищенные препараты мРНК получали известными методами, высокопроизводительноесеквенирование осуществляли на HiSeq 2000 (Illumina). В присутствии ацетата кортизона увеличивалась экспрессия 82 генов, в том числе – 3 ортологов известных генов стероидного катаболизма из кластера, не имеющего сайтов связывания с транскрипционными регуляторами KstR и KstR2; значимого повышения уровня экспрессии генов, участвующих в катаболизме стероидов, в ответ на ацетат кортизона не наблюдалось. Выраженной кластеризации генов также не выявлено: усиливающие экспрессиюопероны равномерно распределены по геному. Ряд генов, увеличивших экспрессию в ответ на ацетат кортизона, можно объединить в 4 кластера: F KR76_RS09390 – KR76_RS09460; G KR76_RS16215 – KR76_RS16555; H KR76_RS24345 – KR76_RS24405; I KR76_RS24685 – KR76_RS24800. Повысившие экспрессию в ответ на ацетат кортизона гены кодируют различные транспортные белки, ферменты метаболизма аминокислот и органических кислот, цитохромы, транскрипционные регуляторы, альдегид-дегидрогеназы, металл-содержащие ферменты, ферменты синтеза молибдоптеринов. Из пяти генов 3-кетостероид-Δ^1-дегидрогеназ значимо увеличивал экспрессию на ацетате кортизонаодин ген (KR76_RS27125), кодирующий 3-кетостероид-Δ^1-дегидрогеназу KstD2, усиление экспрессиисоставило 1207 раз.

Полученные результаты согласуются с высоким уровнем 3-кетостероид-Δ^1-дегидрогеназной активности штамма.

Результаты расширяют представления об особенностях генетического контроля катаболизма стеринов у актинобактерий и могут быть использованы при создании штаммов – продуцентов важных стероидов с улучшенными биокаталитическими возможностями.

Данная работа выполнена в рамках международного проекта ЭРА КоБиоТех: Синтетическая биология для промышленного производства стероидов (акроним Syntheroids) при исключительной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI58818X0008).

ЛИТЕРАТУРА

[1]. Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Fokina V.V., Pekov Y.A., Ivashina T., Donova M.V., Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in Nocardioides simplex VKM Ac-2033D. // 2016, Curr. Genet., V.62(3), P.643–656. DOI 10.1007/s00294–016–0568–4

УДК 604.4+606

БИОТЕХНОЛОГИИ ГРИБНЫХ АРОМАПРОДУКТОВ

Е.Ф. Семенова

Севастопольский государственный университет, Севастополь, Россия
Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Россия
Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

Душистые вещества широко применяют в качестве ароматизаторов для пищевых, парфюмерных, косметических, фармацевтических продуктов и товаров бытовой химии. Их получают из сравнительно небольшого числа ботанических видов, отличительной особенностью которых является способность к биосинтезу и накоплению эфирных масел. Одним из растений, дорогостоящее масло которого высоко ценят во всем мире на протяжении тысячелетий, является роза (Rosa L.). Однако существующие производства розового масла не способны удовлетворить в полном объеме увеличивающийся спрос отечественной промышленности на натуральные душистые вещества. При использовании культуры клеток розы накопление масел ниже на порядок, чем в лепестках интактного растения, и их состав отличается от традиционного розового масла [1].

В 80–90-е годы XX века была показана возможность получения ароматических соединений с помощью микроорганизмов, в частности, грибов [2–4]. Проведенные ранее исследования показали, что Eremothecium ashbyi Guillermond 1935 и Eremothecium gossypii (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Kurtzman 1995 (синоним Ashbya gossypii (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Guilliermond 1928) способны выделять в окружающую среду близкое к розовому эфирное масло [5–7].

Цель работы – поиск новых продуцентов и разработка биотехнологии аромапродуктов с запахом розы эфирномасличной на основе селекционных штаммов микроскопических грибов.

Основными объектами исследования служили штаммы Eremothecium ashbyi Guilliermond 1935 VKM F124, VKM F1397, VKM F3009, VKM F4565Д, VKM F4566Д, VKPM F6, VKPM F36, VKPM F340, VKPM F1320Д и Eremothecium gossypii (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Kurtzman 1995 (синоним Ashbya gossypii (S.F. Ashby et W. Nowell 1926) Guilliermond 1928) VKM F1398, VKM F2627, VKM F3276, VKM F3296, VKPM F35, VKPM F1321Д. Кроме того, детально изучали полученные в ходе экспериментальной работы их морфо- и хемовары. Видовая принадлежность культур была подтверждена на кафедре микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова и во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов молекулярно-генетическим анализом.

Также исследовали штаммы и выделенные из естественных местообитаний изоляты, полученные из Института ботаники имени Н.Г. Холодного, Института микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного, ВНИИ пищевой биотехнологии, ВНИИ пищевых ароматизаторов, кислот и красителей, в частности, Pichia sp., Saccharomyces cerevisiae, S. vini, S. rosei, Kluyveromyces spp., Sporobolomyces odorus, Endomycopsis fibuligera, E. bispora, Aspergillus terreus, A. oryzae, A. awamori 120–177, A. foetidus M-45, Penicillum rubrum, P. canescens 20–171, P. solitum, Ceratocystis courulescens, C. variospora, C. moniliformis, C. paradoxa, C. pilifera, Trichoderma viride, Agaricus bisporus IBK 459, Lentinus edodes; Pleorotus ostreatus Kum. IMV F1300, VKM F2008 (IBK 109) и др.

Исследования с продуцентами ароматообразующих соединений проводили по следующей схеме (рис. 1).

Выделение ароматообразующих соединений осуществляли методами экстракции и дистилляции. Для количественного определения эфирного масла использовали методику, предложенную в Государственной Фармакопее Российской Федерации (ГФ XIV издания, 2018). Определение компонентного состава извлеченного масла проводили на хроматографах «Хром-5», «Кристалл 2000М», PerkinElmerClarus 680 с пламенно-ионизационным детектором на полярной колонке [8]. Математическую обработку данных проводили с помощью статистической программы STATISTICA 10.0 при уровне значимости P = 0,95 [9].

Наиболее перспективными с целью получения эфирных масел и летучих душистых соединений с разнообразными направлениями запаха являются культуры базидиомицетов и аскомицетов, в том числе дрожжей, поскольку они способны накапливать промышленно важные и биологически активные метаболиты (табл. 1). Осуществленный направленный поиск перспективных объектов для биотехнологии ароматических продуктов в пределах родов Trichoderma, Ceratocystis, Aspergillus, Eremothecium и др. дал возможность охарактеризовать различия между видами, штаммами по уровню биосинтетической активности и составу эфирного масла [10].



Рисунок 1. Алгоритм исследования продуцентов ароматообразующих соединений

Наибольший интерес с целью получения эфирного масла представляют виды родов Ceratocystis, Trichoderma, Eremothecium, Pichia, Saccharomyces. Среди основных направлений запаха синтезируемых микромицетами летучих душистых соединений можно выделить цветочный, причем преобладает аромат розы, который обеспечивается у большинства продуцентов только за счет фенилэтилового спирта. Однако Ceratocystis sp., Eremothecium sp. и Kluyveromyces sp. способны также синтезировать монотерпеновые спирты: гераниол, цитронеллол, нерол, линалоол, фарнезол, являющиеся главными компонентами розового эфирного масла. Кроме того, многие микроскопические грибы способны синтезировать такие душистые вещества с фруктовым запахом, которые относятся не только к классу сложных эфиров, как в случае с бактериями, но и к более сложным в отношении химического строения соединениям – лактонам. Хотя лактоны также производятся химической промышленностью, однако использование микроорганизмов имеет ряд преимуществ, особенно, если необходимо получить оптически активные соединения. Trichoderma viride способна генерировать сильный кокосовый аромат при росте на простой питательной среде, который обусловлен в большей степени синтезом 6-пентил-2-пирона в количестве 170 мг на л культуральной жидкости. Химический синтез этого соединения является 7-стадийным, что усложняет и удорожает промышленное производство. Персиковый аромат может быть получен при использовании культуры S. odorus, продуцента 4-декалактона.

Однако грибы, в большей степени базидиомицеты, представляет также интерес как продуценты летучих душистых веществ с «грибным» ароматом, который обусловлен алифатическими 8-углеродными соединениями (1-октен-1-ол, 1-октен-3-он, 1-октен-3-ол, 3-октанол и др.), некоторыми пиразинами и пирролами. Таким образом, при глубинном культивировании они могут быть использованы в производствах пищевой промышленности для получения натуральных ароматизаторов с грибным запахом. Уровень накопления ароматообразующих соединений, синтезируемых грибами, значительно варьирует от сотен мкг (C. populina) до сотен миллиграмм (C. variospora, C. moniliformis, E. asbyi, E. gossypii, T. viride) на л культуральной жидкости [11, 12]. Одни из самых высоких показателей были отмечены у E. ashbyi. Синтез эфирного масла коллекционными штаммами E. ashbyi достигает 180 мг на л культуральной жидкости в течение первых двух суток роста на ферментационной среде, что может быть сопоставлено с содержанием эфирного масла в 500–600 г. цветков розы. Причем лучшие показатели по отношению максимального уровня накопления ароматобразующих соединений ко времени ферментации были достигнуты именно у аскомицетов родов Ceratocystis и Eremothecium (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты оценки некоторых исследованных видов грибов, синтезирующих душистые вещества

Таксономическое положение	Синтезируемые летучие вещества	Запах	Уровень накопления ароматического продукта, мг/л
Agaricus bisporus *(Agaricaceae)*	3-метилбутаналь, 3-октанон, 1-октен-3-он, 3-октанол, 1-октен-3-ол, фурфураль, бензальдегид, фенилацетальдегид, бензиловый спирт	сильный грибной	70,3–230,0
Lentinus edodes (Polyporaceae)	лентионин, 1-октен-3-ол, 1-октен-3-он	грибной	46,7–101,9
Pleorotus ostreatus (Pleurotaceae)	1-октен-3-ол, 1-октен-3-он	грибной	95,3 -210,4
Sporobolomyces roseus (Sporidiobolaceae)	4-декалактон	персиковый	27,5–156,4
Aspergillus oryzae (Trichocomaceae)	1-октен-1-ол	ананасовый	24,3–61,8
Ceratocystis variospora (Ophiostomataceae)	цитронеллол, цитронеллилацетат, гераниаль, нераль, гераниол, линалоол, геранилацетат, нерол, α-терпинеол	ароматный, подобный герани	100,0–240,0
Trichoderma viride (Hypocreaceae)	6-пентил-2-пирон, 6-(пент-1-енил) – 2-пирон	кокоса	170,2–370,7
Eremothecium ashbyi (Eremotheciaceae)	гераниол, цитронеллол, нерол, β-фенилэтиловый спирт, линалоол, цитраль, фарнезол	подобный розе	99,8–480,0
Eremothecium gossypii (Eremotheciaceae)	гераниол, цитронеллол, нерол, β-фенилэтиловый спирт, линалоол, цитраль, фарнезол	подобный розе	156,9–565,5
Kluyveromyces lactis *(Saccharomycetaceae)*	цитронеллол, гераниол, линалоол, β-фенилэтанол, эфиры, изоамиловый спирт, ацетоин, 2-фенилацетат, изобутанол, изовалериановая кислота	фруктовый, подобный розе, цветочный	42,5–95,9
Saccharomyces rosei (*Saccharomycetaceae*)	β-мирцен, лимонен, линалоол, α-терпинеол, фарнезол	цветочный, цветочно-фруктовый	36,4–72,6

Проведенные нами исследования по биоконверсии отходов эфирномасличного производства, включающие изучение состава отходов, разработку способов их подготовки, выбор микроорганизмов-биотрансформаторов, показали, что утилизация твердых отходов переработки лаванды, розы, шалфея, мяты, сельдерея, укропа, кориандра практически не зависит от видовой принадлежности базидиомицетов. Однако имеется тенденция к штаммовой специфичности биотрансформаторов (табл. 2). Высокой скоростью роста грибницы вешенки и шампиньона обладали на кориандровом шроте и отходах шалфея мускатного после экстракции: в течение 1 недели гифы пронизывали весь субстрат. Следует отметить высокий уровень накопления октен-3-ола (основного компонента, обусловливающего запах съедобных грибов) при культивировании штамма Pleorotus ostreatus ВКМ F-2008 на кориандровом шроте, подтвержденный органолептической оценкой культур. Изученные штаммы базидиомицетов в глубинной культуре также накапливали большие количества биомассы, например, биомасса штамма P. ostreatus ИМВ F1300 в течение 6 суток достигала 16 г./л. Однако, уровень накопления ароматообразующих соединений прямо зависел от этого показателя: штаммом Agaricus bisporus ИБК 459 в течение 3 суток при биомассе 2,34 г./л синтезировалось 30,0 мг/л эфирного масла, а через 6 суток при биомассе 11,86 г./л образовалось 41,4 мг/л эфирного масла и 262,0 мг/л экстракта.

В процессе глубинного культивирования E. ashbyi, E. gossypii, A. bisporus, P. ostreatus, Entomophtora virullenta на вытяжке кориандрового шрота наблюдали рост их мицелиальной массы и синтез вторичных соединений (пигментов, рибофлавина, душистых соединений), интенсивность которых носила видо- и штаммоспецифичный характер (табл. 3).

Таблица 2 – Биосинтетическая активность базидиомицетов при твердофазном культивировании

Субстрат	Штамм	Выход ЭЭ, мг/кг субстрата	Выход октен-3-ола, мг/кг субстрата	Содержание октен-3-ола, % в ЭЭ
Pleorotus ostreatus				
КШ	ИМВ F1300	90	70	77,7
ОШЭ	ИМВ F1300	580	570	98,2
КШ	ВКМ F2008	2230	2080	93,5
ОШЭ	ВКМ F2008	1450	1380	95,1
Agaricus bisporus				
КШ	ИБК 459	202	170	84,1
ОШЭ	ИБК 459	490	420	85,7
Примечание. ЭЭ – эфирный экстракт, КШ – кориандровый шрот, ОШЭ – отходы шалфея после экстракции.				

Таблица 3 – Накопление летучих душистых веществ штаммами E. ashbyi и E. gossypii в процессе глубинного культивирования на средах, в которых источники азота заменены кориандровым шротом

Штамм	Среда хранения	Ферментационная среда	Источник азота, замененный КШ	Содержание эфирного масла, мг/л			
				в фильтрате		в КЖ	
				среда с КШ	контроль	среда с КШ	контроль
E. gossypii							
ВКМ F2627	КДА	ГПД	пептон, ДЭ	4,18	5,58	4,38	13,09
ВКМ F2627	СА	ГПД	пептон, ДЭ	2,60	2,93	5,85	4,67
ВКМ F3276	КДА	ГПД	пептон, ДЭ	2,53	6,25	6,51	13,59
ВКМ F3276	СА	ГПД	пептон, ДЭ	5,85	34,76	6,61	25,39
ВКМ F3276	КДА	СС	соевая мука	4,09	6,37	5,95	26,74
ВКМ F3276	СА	СС	соевая мука	23,33	39,85	39,52	48,57
E. ashbyi							
ВКМ F3009	СА	СС	соевая мука	61,10	63,43	65,34	84,69
ВКПМ F340	СА	СС	соевая мука	20,68	37,96	46,38	68,14
Примечание. КШ – кориандровый шрот, КЖ – культуральная жидкость, КДА – картофельно-декстрозный агар, СА – сусло-агар, ГПД – глюкозо-пептонная среда с дрожжевым экстрактом, СС – соево-сахарозная среда, ДЭ – дрожжевой экстракт							

Результаты исследования свидетельствуют о том, что кориандровый шрот может использоваться грибными культурами в качестве единственного источника углерода и азота или только единственного источника азота. Это указывает на возможность полной или частичной замены кориандровым шротом соевой муки в производственной ферментационной среде для получения ароматообразующих соединений на основе микробного синтеза.

С целью изучения возможности получения дополнительных ароматических продуктов были проведены поисковые работы на существующих микробиологических производствах. Анализ липофильных соединений в образцах культуральной жидкости, сточных вод, летучих душистых веществ в газовых выбросах производственных штаммов, относящихся к видам Endomycopsis fibuligera, E. bispora, P. canescens, P. solitum, A. awamori, A. foetidus, A. orizae и др., свидетельствуют о довольно высокой биосинтетической активности (до 450 мг/л у A. awamori). Парфюмерная оценка новых ароматических продуктов позволила выделить перспективные: фруктово-цветочного направления – Aspergillus spp., с запахом кокосового молока – T. viride. Таким образом, показанное разнообразие ароматообразующих грибов подчеркивает их важную роль как альтернативных источников эфирных масел, индивидуальных летучих душистых соединений при возможном внедрении биотехнологий на их основе в промышленное производство натуральных ароматизаторов.

Полученные результаты позволяют выделить виды Ceratocystis, Eremothecium, Trichoderma, Kluyveromyces как наиболее перспективные продуценты ароматообразующих веществ с фруктовым и цветочным ароматами, отличающиеся высокими скоростью роста и уровнем накопления душистых соединений. Причем эфирные масла, синтезируемые представителями рода Eremothecium, представляют большую ценность, так как по компонентному составу наиболее приближены к розовому, одному из самых востребованных на мировом рынке, эфирному маслу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова, Н.А. Некоторые итоги и перспективы биотехнологических исследований эфиромасличных растений / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева // Эфиромасличные растения и лекарственные растения. Научные труды Института эфиромасличных и лекарственных растений Украинской академии аграрных наук. – 2006. – Выпуск 26. – С. 19–26.
2. Production of flavours by microorganisms / L. Janssens, H.L. De Pooter, N.M. Schamp, E.J. Vandamme // Process Biochemistry. – 1992. – V. 27. – P. 195–215.
3. Krings, U. Biotechnological production of flavours and fragrances / U. Krings, R.G. Berger // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 49. – P. 1–8.
4. Demain, A.L. Metabolites, Primary and Secondary / A.L. Demain // Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalystand Boiseparation. Eds. M.C. Flickinger, S.W. Draw. – Wiley Interscience, John Wiley and Sons Inc., New York, USA, 1999. – V. 3. – P. 1713–1732.
5. Бугорский, П.С. Состав эфирного масла мицелиального гриба Eremothecium ashbyi / П.С. Бугорский, В.С. Родов, А.М. Носов // Химия природных соединений. – 1986. – № 6. – С. 790–791.
6. Бугорский, П.С. Влияние ионов водорода, калия и натрия на продуктивность гриба Eremothecium ashbyi / П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова, В.С. Родов // Микробиологический журнал. – 1990. – Т. 52, № 3. – С. 44–47.
7. Бугорский, П.С. Душистые вещества мицелиального гриба Ashbya gossypii / П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова // Химия природных соединений. – 1991. – № 3. – С. 428.
8. Гуринович, Л.К. Эфирные масла: химия, технология, анализ и применение / Л.К. Гуринович, Т.В. Пучкова. – М.: Школа Косметических Химиков, 2005. – 192 с.
9. Платонов, А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А.Е. Платонов. – М.: Из-во РАМН, 2000. – 52 с.
10. Семенова, Е.Ф. Некоторые результаты биотехнологии ароматических продуктов / Е.Ф. Семенова, Н.И. Богданов // Сб. трудов «Инновационные технологии и продукты». Новосибирск, 2000. – Вып. 4. – С. 9–13
11. О биосинтезе компонентов эфирного масла грибом Eremothecium ashbyi (структурно-функциональные особенности) / А.Н. Погорельская, П.С. Бугорский, Е.Ф. Семенова, Н.П. Бузулукова, Е.И. Горнунг // Вестник Российской академии с.-х. наук. – 2003. – № 1. – С. 83–85.
12. Семенова, Е.Ф. Фармбиотехнологическая характеристика Eremothecium – продуцента рибофлавина и эфирного масла / Е.Ф. Семенова, А.И. Шпичка // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / под ред. М.В. Гаврилина. – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2012. – Вып. 67. – С. 368–372.

УДК 577.15

ГИАЛУРОНИДАЗЫ ДЕСЯТИНОГИХ РАКООБРАЗНЫХ: ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ

Т.И. Пономарёва, М.А. Тимченко, К.А. Бочарова, Е.А. Согорин

Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино, Россия

Гиалуроновая кислота – высокомолекулярный отрицательно заряженный полимер, гликозаминогликан, состоящий из повторяющихся дисахаридных звеньев (D-глюкуроновая кислота и N-ацетил-D-глюкозамин) связанных между собой β-1,4 и β-1,3 гликозидными связями (Рис. 1). В зависимости от источника гиалуроновой кислоты дисахаридные звенья могут повторяться 2 000–25 000 раз (до 10^6–10^7 Да). Гиалуроновая кислота является главным компонентом синовиальной жидкости и внеклеточного матрикса, регулирует водный баланс, а также участвует в пролиферации, дифференциации и миграции клеток.

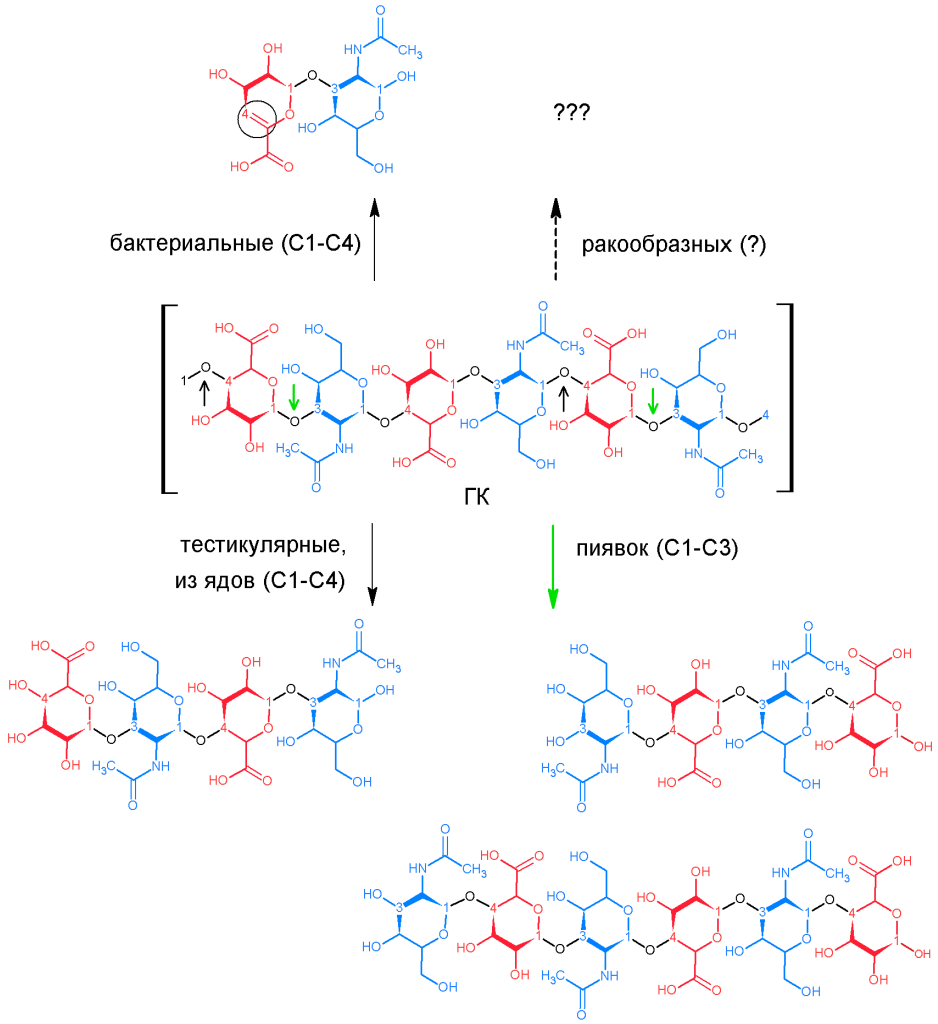


Рисунок 1: Структура гиалуроновой кислоты и основные продукты реакции её гидролиза гиалуронидазами из разных источников

Гиалуронидазы – группа ферментов, способных расщеплять гиалуроновую кислоту [1, 2]. Большинство из них способны также расщеплять хондроитин и (или) хондроитин сульфат. Гиалуронидазы человека и некоторых животных уже хорошо описаны как с точки зрения структурных особенностей, так и с точки зрения биохимических свойств (Рис. 1).

Препараты, где в качестве активного вещества используется фермент или группа ферментов, обладающих гиалуронидазной активностью, успешно применяют в медицине для лечения заболеваний, сопровождающихся воспалением и активным ростом соединительной ткани. Препараты гиалуронидаз улучшают трофику и проницаемость тканей, повышают эластичность рубцовой ткани, облегчают движение жидкости в межтканевом пространстве и др. Не менее популярна гиалуронидаза в косметологии. Часто ее используют для устранения негативных эффектов после инъекций гиалуроновой кислоты. В офтальмологии в течение многих лет гиалуронидаза комбинируется с местными анестетиками, оказывая синергетический эффект [3], и в настоящее время внедряется в хирургию, включая дерматохирургию. Также была показана перспектива использования гиалуронидазы в лечении легочного фиброза у модельных животных (мыши), а в частности, идиопатического фиброза [4]. Большинство препаратов гиалуронидаз имеют в своей основе гиалуронидазы из тканей семенников быка или барана. Относительно высокая концентрация этих ферментов в семенниках связана с участием этих ферментов в процессе оплодотворения. Коммерческие препараты гиалуронидаз включают гиалуронидазу из семенников КРС (например, «Лидаза», «Ронидаза», «Лонгидаза»), овечьих семенников (например, препарат «Vitrase»), рекомбинантную человеческую гиалуронидазу, получаемую на основе генно-модифицированных клеток яичника китайского хомячка [5]. Однако существуют риски использования гиалуронидаз из тканей млекопитающих. Прионные белки животного, больного губчатой энцефалопатией, могут стать причиной развития болезни Крейтцфельда-Якоба у человека. Несмотря на то, что на данный момент не описано ни одного случая такого пути заражения через препараты гиалуронидазы, государственные регуляторы многих стран запрещают ввоз и продажу данных препаратов на своей территории. Альтернативным безопасным источником гиалуронидаз является пищеварительный орган ракообразных – гепатопанкреас, который зачастую является отходом переработки животных организмов морского промысла. На данный момент структура гиалуронидаз ракообразных мало изучена. В открытой базе данных последовательностей белков UniProt можно обнаружить несколько представителей, у которых описана аминокислотная последовательность гиалуронидаз: из отряда Десятиногих (Decapoda) это Белоногая креветка (Litopenaeus vannamei, UniProt A0A423SH46) и Оранжевый ильный краб (Scylla olivacea, два белка UniProt A0A0P4VVV1 и A0A0N7ZAX3), а также два представителя отряда Равноногих (Isopoda): мокриц Armadillidium vulgare (UniProt A0A444ST78) и Armadillidium nasatum (UniProt A0A5N5TJL6). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал наличие непродолжительных участков гомологии, что свидетельствует о высокой неоднородности первичной структуры гиалуронидаз ракообразных (Рис. 2).

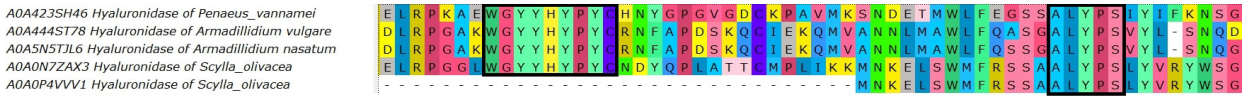


Рисунок 2: Результаты анализа аминокислотной последовательности гиалуронидаз некоторых представителей класса Высшие раки

Сведения о биохимических свойствах гиалуронидаз ракообразных немногочисленны. Гиалуронидаза лангуста Nephrops norvegicus также, как и бактериальные гиалуронидазы, не гидролизует хондроитина сульфат (A, B, C типы), в присутствии ЭДТА её активность растет (на 25 %), наличие 120 мМ NaCl в реакционной смеси и температура 45 °C, pH, как и для многих гиалуронидаз, равный 5,4 – оптимальные условия прохождения реакции [6]. По результатам нативной гель-фильтрации молекулярная масса гиалуронидазы равна 320 кДа. Хондроитина сульфат B и цистеин полностью ингибируют активность фермента. По результатам гель-фильтрации в нативных условиях гиалуронидаза Антарктического криля Euphausia superba имеет молекулярную массу 80 кДА, оптимальный pH – 5,3, оптимальную температуру – 37 °C [7]. Механизм реакции гидролиза гиалуроновой кислоты гиалуронидазами лангуста или криля до сих пор неизвестен.

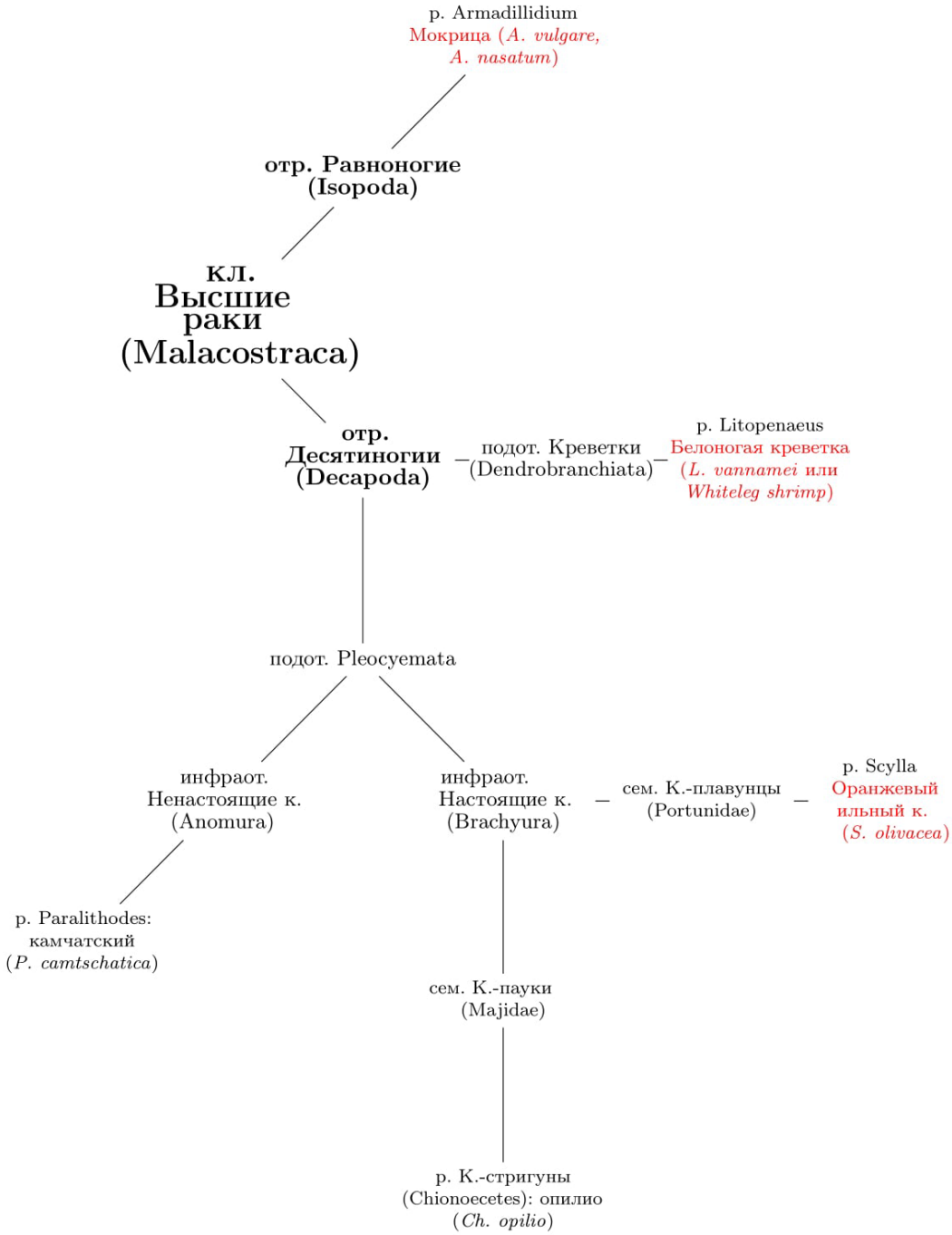


Рисунок 3: Филогения некоторых представителей класса Настоящих раков. Красным выделены виды, для которых известны первичные структуры гиалуронидаз. ("К." – сокращенное "крабы".)

В недавней нашей работе впервые исследована кинетика гидролиза нативной гиалуроновой кислоты и косметических филлеров гомогенатом гепатопанкреаса камчатского краба Paralithodes camtschaticus [8]. С помощью методов турбидиметрического анализа, атомно-силовой микроскопии и спектроскопии ядерно-магнитного резонанса была исследована кинетика гидролиза и структурная трансформация гиалуроновой кислоты под действием ферментов гомогената. Было показано, что полученный гомогенат имеет сравнимую с коммерчески доступными препаратами гиалуронидаз активность, что, в дальнейшем, позволит разработать на его основе ферментный препарат для использования его в медицине.

Промысловые виды крабов включают в себя представителей инфраотряда Ненастоящих (Anomura) и Настоящих крабов (Brachyura) подотряда Pleocyemata, в который входит коммерчески значимый объект – краб-стригун опилио (Chionoecetes opilio) (Рис. 3). В России каждый год вылавливается более 10 000 тонн камчасткого краба [9]. Данные организации The Food and Agriculture Organization (FAO) указывают, что мировой объём вылова краба-стригуна составляет более 100 000 тонн [10]. Крабы этого подотряда имеют схожую по ферментативной активности пищеварительную систему. Гепатопанкреас крабов зачастую является отходом переработки, поэтому является доступным сырьем. Препараты гиалуронидаз ракообразных из гомогената гепатопанкреаса имеют большие шансы на коммерческий успех и смогут выйти на рынок с большими производственными возможностями. К настоящему времени разработаны технологии получения гиалуронидазы из ракообразных и отходов их переработки (ротоногие, креветки, омары и крабы) [11, 12]. Подобраны условия гомогенизации гепатопанкреаса креветок с максимальным выходом гиалуронидазной активности [13].

Масштабируемую технологию получения препарата необходимой чистоты с высокой гиалуронидазной активностью из гепатопанкреаса камчатского краба так же, как и изучение его эффективности на модельных животных, предстоит разработать и провести в ближайшем будущем. Этот препарат займет достойное место в арсенале лекарственных средств для лечения осложнений, возникающих после введения филлеров на основе гиалуроновой кислоты, а также позволит на его основе создать терапевтические агенты для лечения фиброза лёгких, возникающего в результате перенесенного COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Stern, R., Jedrzejas, M.J. «Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action». Chemical reviews 106.3 (2006), 818–839.
[2] Girish, K., Kemparaju, K. «The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview». Life sciences 80.21 (2007), 1921–1943.
[3] Moharib, M.M., Mitra, S. «Alkalinized lidocaine and bupivacaine with hyaluronidase for sub-Tenon's ophthalmic block». Regional anesthesia and pain medicine 25.5 (2000), 514–517.
[4] Silva Bitencourt, C. da, Gelfuso, G.M., Pereira, P.A.T., Assis, P.A. de, Tef´e-Silva, C., Ramos, S.G., Arantes, E.C., Faccioli, L.H. «Hyaluronidase-loaded PLGA microparticles as a new strategy for the treatment of pulmonary fibrosis». Tissue Engineering Part A 21.1–2 (2015), 246–256.
[5] Yocum, R.C., Kennard, D., Heiner, L.S. «Assessment and implication of the allergic sensitivity to a single dose of recombinant human hyaluronidase injection: a double-blind, placebo-controlled clinical trial». Journal of Infusion Nursing 30.5 (2007), 293–299.
[6] Krishnapillai, A.M., Taylor, K.A., Morris, A.E., Quantick, P.C. «Characterisation of Norway lobster (Nephrops norvegicus) hyaluronidase and comparison with sheep and bovine testicular hyaluronidase». Food chemistry 65.4 (1999), 515–521.
[7] Karlstam, B., Ljungl¨of, A. «Purification and partial characterization of a novel hyaluronic acid-degrading enzyme from Antarctic krill (Euphausia superba)». Polar Biology 11.7 (1991), 501–507 [8] Ponomareva, T., Sliadovskii, D., Timchenko, M., Molchanov, M., Timchenko, A., Sogorin, E. «The effect of hepatopancreas homogenate of the Red king crab on HA-based filler». PeerJ 8 (2020), e8579.
[9] Food, T., (FAO), A.O. Fishery and Aquaculture Statistics: B-44. 2017. url: http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2017_USBcard/navigation/index_content_capture_e.htm (visited on 05/05/2020).
[10] Food, T., (FAO), A.O. Fishery and Aquaculture Statistics: B-42. 2017. url: http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2017_USBcard/navigation/index_content_capture_e.htm (visitedon 05/05/2020).
[11] Олсен, Р. «Способ получения биологически активных компонентов». SU 1 838 406 A3. 1989.
[12] Ashok, M.K. «Extraction and purification of hyaluronidase from crustacean waste». EP 0894090 A1. 1996.
[13] Rosario, S., Nooralabettu, K. «Effective disruption method of shrimp hepatopancreatic tissues to release hyaluronidase». International Journal of Scientific & Engineering Research 9.3 (2018), 336–341.

УДК 69.99.39; 615.015.14

ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА THYMUS VULGARIS, ПРОИЗРАСТАЮЩЕГО В ТАДЖИКИСТАНЕ, ЭМУЛЬСИОННЫМ СПОСОБОМ

С.Р. Усманова, З.У. Шерова, А.С. Джонмуродов, З.К. Мухидинов

Институт химии им В.И. Никитина НАН Республики Таджикистан, Душанбе, Таджикистан

Управление лекарственными растениями – одна из важнейших стратегий развития биотехнологии и фармацевтики. Понимание взаимосвязи между различными биологическими активными веществами и их функциональными свойствами как лекарство имеет решающее значение для создания новых, эффективных и экологически безопасных препаратов.

Тот факт, что эфирные масла проявляют сильную антимикробную активность, вызвало значительный интерес к их потенциалу в качестве лекарственных средств и натурального консерванта. Однако прямое включение эфирных масел в продукты питания и напитки по-прежнему ограничено из-за их гидрофобности и сильного запаха. Минимизация его негативного влияния на органолептические свойства пищевых продуктов при сохранении высокой антимикробной активности является серьёзной проблемой для пищевой промышленности [1, 2].

Благодаря уникальным природно-климатическим условиям, Республика Таджикистан является производителем широкой номенклатуры эфироносных растений: герани, лимонника, душицы, тимьяновых и др. содержащие эфирные масла.

Растения рода Thymus (Тимьян) хорошо известны своим приятным ароматом и вкусом, а также источниками биоактивных соединений, поэтому они очень популярны в качестве лекарственных средств и ароматизаторов [3, 4]. В высокогорьях Таджикистана растут различные виды этого растения под местным названием «Кокути», внешнее схоже с известным видом Thymus vulgaris, цветки мелкие, имеют лилово-фиолетовый оттенок обладающие приятным запахом, которые используются в народной медицине в качестве средств выводящие токсические метаболиты и отхаркивающего для лечения заболеваний лёгких, желудка, печени, а также как обезболивающего средства при зубной боли. В настоящее время, чай из «Кокути» часто применяют для понижения артериального давления.



Рис. 1. Thymus vulgaris (слева, https://en.wikipedia.org/wiki/Thymus_vulgaris) и сухие ветки «Кокути» (справа)

В Иране он известен как Thymus daenensis Celak, Тимьян Денайский, является эндемичным и находящимся под угрозой исчезновения лекарственным растением, обладающим ценными терапевтическими свойствами в иранской традиционной медицине [3].

Композиции эфирных масел, полученные из надземных частей Тимьяна Денайского, представлены как монотерпены, такие как тимол, карвакрол, α-терпинен, п-цимен, γ-терпинен, 1, 8-цинеол и сесквитерпены, подобные (Е) – кариофиллену [3,4].

Эфирное масло T. daenensis обладает различными фармакологическими свойствами, в том числе противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми, противораковыми и иммуномодуляторными свойствами [3–5]. Химический состав и выход масла вида Thymus vulgaris зависит от ряда факторов, таких как окружающая среда, регион выращивания и методы выращивания. В её составе обнаружены, в основном, гераниол, линалоол, гамма-терпинеол, карвакрол, тимол и транс-туян-4-ол / терпинен-4-ол [6].

Благодаря своим отхаркивающим, спазмолитическим и антисептическим свойствам он особенно широко используется для лечения различных заболеваний дыхательных путей, таких как грипп, простуда, синусит, хронический и острый бронхит, туберкулез, успокаивающий судорожный кашель, а также раздражительный и спазматический кашель. Экстракт тимьяна может быть эффективным средством лечения хронических заболеваний, основанных на воспалительных процессах, когда гиперсекреция слизи подавляет цилиарный просвет и закупоривает дыхательные пути, вызывая заболеваемость и смертность, что может быть применён при профилактике и лечении заражённых вирусом COVID-19. Благодаря своим стимулирующим свойствам он также действует как тонизирующее средство для нервов и используется при астенических состояниях [7].

Для масляных растворов эфирных масел с учётом возможной области медицинского применения в качестве лекарственной формы используют мягкие желатиновые капсулы, чтобы сохранить и доставить липофильные вещества в легкодоступной форме – растворе [8]. Однако такая форма создаёт неудобства пациентам и не пригодна для включения эфирных масел в пищевые продукты. Это недостаток можно исправить нано-и микрокапсулированием компонентов эфирных масел эмульсией масло в воде стабилизированной биополимерами [9,10].

Интерес фармацевтической и пищевой промышленностей к нанотехнологиям в последние годы значительно повысился, в связи с новыми достижениями науки в этой области. В недалёком будущем, нанотехнологии будут играть одну из ведущих ролей в качестве движущей силы инноваций в медицине. Более 50 % фармацевтических компаний-производителей, которые активно работают в области наномедицины, используют нанобиотехнологии для разработки систем доставки активных лекарственных веществ к органам и тканям-мишеням. Эти препараты дают сегодня 80 % оборота в мировой наномедицине. Мировой рынок наномедицинских услуг в 2016 году оценивался в 134,4 миллиарда долларов. Прогнозируется, что этот рынок будет расти с совокупным годовым темпом роста (CAGR) в 14,0 % с 2017 по 2022 год и должен достичь 293,1 миллиарда долларов к 2022 году [11].

Небольшой размер наночастиц и изменения их физико-химических свойств по сравнению с их макромолекулярными аналогами предлагают много преимуществ для современной медицины, включая улучшенную доставку лекарств, возможности для лучшей и неинвазивной диагностики и целенаправленное лечение с уменьшенным количеством побочных и системных последствий [12]. Микро- и наночастицы действуют в качестве защищенного транспортного средства для гидрофобных лекарств или терапевтических средств, таких как мРНК, миРНК и ДНК, которые обычно не являются биодоступными.

Как обсуждалось в обзорах [12, 13], многие механизмы участвуют в проявлении антимикробной активности в случае использования наноэмульсий, например тип или концентрация эфирного масла, тип или концентрация эмульгатора, способ инкапсуляции и штамм бактерий. Поскольку конкретный механизм в антимикробной активности инкапсулированных эфирных масел до сих пор не совсем понятен, необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Цель работы – разработка новой технологии микрокапсулирования эфирных масел растения Кокути (Thymus vulgaris), заготовленного в Республике Таджикистан.

Для приготовления эмульсионных наночастиц использовался яблочный пектин (ВМЯ), полученный методом флэш-экстракции [14] и охарактеризованный содержанием галактуроновой кислоты (ГК) – 68 %, степенью этерификации (СЭ) карбоксильной группы, равной 52 % и молекулярной массой (Mw) – 130 КД; высокометилированный цитрусовый пектин (ВМЦ) компании Herbstreith & Fox GmbH & Co. KG, содержанием ГК 87 %, СЭ 71 % и молекулярной массы 85 КД; концентрата β лактоглобулин (βLgC), выделенного из молочной сыворотки с содержанием общего белка 90 %.

Эфирное масло тимьяна получали из сухих надземных частей растения Кокути гидродиффузионным методом [15] с водяным паром на автоклаве при 90–100^{o} С в течение 0.5 часа и давлением 1.2 атм. Микрокапсулы, в системе эмульсии масло / вода (масло Кокути) на основе комплексообразования пектина с концентратом βLgC, получен по методике описанной в работе [16].

Кроме эфирного масла в составе масла Тимьяна также присутствуют другие биологически активные соединения. В изученном образце масла методом капиллярного электрофореза [17] были обнаружены и фенольные соединения в количестве 266.05 мг/л, которые представлены в основном из: 2-(4-Гидроксифенила) этанола, ванилина, эпикатехина, а также гомованиловой, синаповой и сиринговой кислотами.

Эмульсии готовили следующим образом: брали определённый объём масла и белка, смесь гомогенизировали в течение 15 минут при 1200 об/мин и температуре 60^{0} С. В полученную первичную эмульсию, не прекращая гомогенизацию и не меняя температуру, по каплям добавляли определённый объем раствора пектина и гомогенизировали 10 минут при 6000 об/мин и ещё 10 минут при 1200 об/мин. После приготовления каждой эмульсии, измеряли pH и общий объём после охлаждения, которые приведены в таблице 1.

Стабильность эмульсии определяли при хранении в течение недели, а также центрифугированием. 2–3 мл свежеприготовленной эмульсии после достижения комнатной

температуры центрифугировали при 2500 об мин$^{-1}$ в течение 10 мин и измеряли объем образовавшегося крема. Таким образом, стабильность эмульсии определяли по формуле:
$S = 100(V_0 - V)/V_0$ где, S – стабильность эмульсии, %; V_0 – объем эмульсии, cm^3; V – объем крема, cm^3.

Для характеристики устойчивости микрокапсул, они были суспендированы в воде на гомогенизаторе при 9000 об/мин. Количество микрочастиц в объёме одного миллилитра (N) и их средние размеры (D_{43}) были определены на микроскопе Motic type 102 M с помощью программы Motic Image Advanced 3.2. [15].

Таблица 1. Состав и характеристика эмульсий через день после их получения

Состав микро-капсул	Молярное соотношение белок/ пектин (моль)	Объемы эмульсии, мл	Объемы эмульсии через день, мл	S, %	D_{43}, um	N, количество частиц в мл эмульсии
LgC/ВМЦ	25.0	27.0	22.0	88.8	4.08	12113818
LgC/ВМЦ	16.0	28.0	24.0	92.5	2.59	18772075
LgC/ВМЦ	6.0	28.0	21.0	87.3	6.02	11069523
LgC/ВМЯ	30.0	29.0	21.0	84.5	7.08	8113818
LgC/ВМЯ	18.0	28.0	20.0	87.7	4.59	11772075
LgC/ВМЯ	5.0	20.5	18.2	75.2	8.02	7069523

Из данных таблицы 1 видно, что полученные микрокапсулы содержащие активный ингредиент (масло Тимьяна) в эмульсии масло в воде стабилизированным белком и пектином показали хорошую стабильность при длительном хранении, более двух недель (18 дней). Показано, что максимальный объем эмульсии получается при мольном соотношении белок / пектин 16.0 и 18.0 для ВМЦ и ВМЯ соответственно, хотя другие изученные соотношения белок / пектин показали также высокую стабильность эмульсии. При этих соотношениях формируются минимальные размеры частиц и наибольшее их количество в объёме одного миллилитра, достигающегося более 1.8 миллионов частиц.

Предыдущие исследования показали, что введение в систему натриевых противоионов может привести к экранированию заряда, предотвращающего образование пектиновых агрегатов в растворе. Однако полное экранирование избытка отрицательных зарядов на поверхности вторичной эмульсии приводит к флокуляции (прилипанию) частиц, что было принято во внимание.

В качестве примера кривые распределения микрочастиц в эмульсионной системе лактоглобулин – цитрусовый пектин и лактоглобулин – яблочный пектин представлены на рисунках 1 и 2. Видно, что полученные эмульсии в системе LgC/ВМЦ проявляют бимодальное распределение частиц плавно переходящие в мономодальное при хранении. Профиль распределения микрочастиц в системе с яблочным пектином несколько были широкими и со временем также концентрировались в области 1.8–2.0 микрометра.

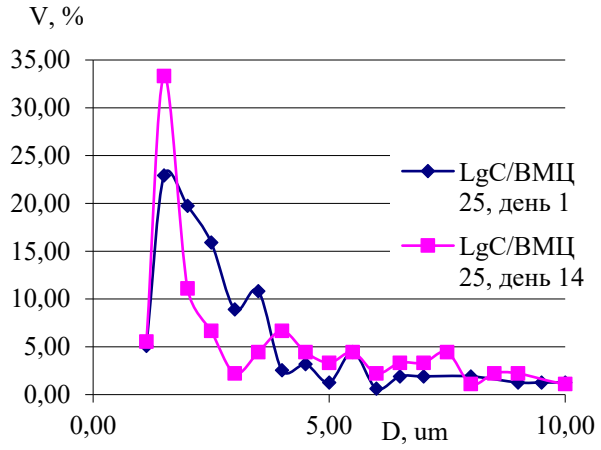


Рис. 1. Кривые распределения микрочастиц в эмульсионной системе лактоглобулин и цитрусовый пектин

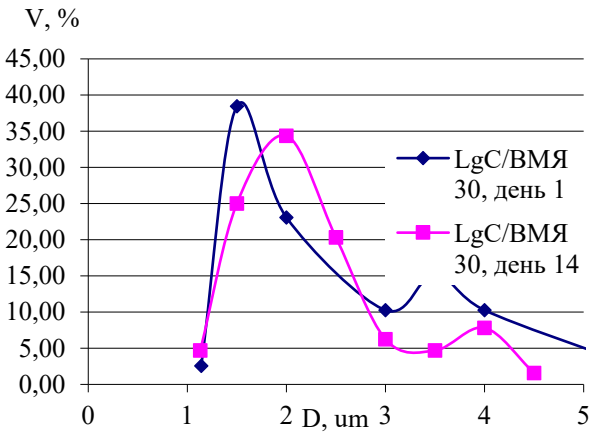


Рис. 2. Кривые распределения микрочастиц в эмульсионной системе лактоглобулин и яблочный пектин

Таким образом, разработан способ микрокапсулирования активного ингредиента масла Тимьяна, произрастающего в Республики Таджикистан в эмульсионных микрокапсулах стабилизированным белком молочной сыворотки и двух видов пектина. Дана характеристика полученных эмульсий при различных соотношениях белка и пектина. Показано, что максимальный объем эмульсии получается при мольных соотношениях белок / пектин 16–30 для цитрусового и 18–25 для яблочного пектина. Хотя другие изученные соотношения белок / пектин также показали высокую стабильность эмульсии. Полученные системы доставки эфирных масел в виде микрокапсул, стабилизированных биополимерами соответственно, требуют дальнейших исследований для выяснения механизма высвобождения активного ингредиента, лежащего в основе их биологической активности, с целью получения доступа к новым природным антисептикам для фармацевтической и пищевой промышленностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Donsi, F., & Ferrari, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. Journal of Biotechnology, 2016 – 233, 106–120.
2. Ryu, V., McClements, D.J., Corradini, M.G., & McLandsborough, L. Effect of ripening inhibitor type on formation, stability, and antimicrobial activity of thyme oil nanoemulsion. Food Chemistry, 2018, 245, 104–111.
3. Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Hamedi, B. Ethnobotany and antimicrobialactivity of medicinal plants of Bakhtiari Zagross mountains Iran. J. Med. Plants Res. 2012–6, 675–679.
4. Dall'Acqua, S., Peron, G., Ferrari, S., Gandin, V., Bramucci, M., Quassinti, L., Mártonfi, P., Maggi, F. Phytochemical investigations and antiproliferative secondary metabolites from Thymus alternans growing in Slovakia. Pharm. Biol. 2017–55, 1162–1170.
5. P. Matusinsky, Zouhar M., Pavela R., Novy P. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenicfungi of cereals/ Industrial Crops and Products 2015 – 67, 208–215.
6. Borugă O, Jianu C, Mişcă C. et al. Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity Journal of Medicine and Life. 2014 – Volume 7, Special Issue 3, pp. 56–60
7. Marinelli O., Iannarelli R., Morelli M.B., et al. Evaluations of thyme extract effects in human normal bronchial and tracheal epithelial cell lines and in human lung cancer cell line Chem. Biol. Interact. 2016–256, pp. 125–133.
8. Демченко, Д.В. Разработка технологии мягких агаровых капсул с масляными экстрактами: дис… канд. фарм. наук: 14.04.01 / Демченко Д.В. – Санкт-Петербург, 2015. – 226 с.
9. Мухидинов З.К., Бобокалонов Д.Т., Усманова С.Р. Пектин-основа для создания функциональной пищи. Душанбе. 2019.
10. Shamsara O., Jafari S.M., Muhidionv Z.K. Development of double layered emulsion droplets with pectin/ β-lactoglobulin complex for bioactive delivery purposes. Journal of Molecular Liquid, 2017, 243, p. 144–150. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.08.036.
11. https://www.medgadget.com/2020/06/nanotechnology-in-medical-applications-market 2020 analysis-to 2025 impact-of-covid 19 on-emerging-trends-and-leading-players.html.
12. Nikolova M., Slavchov R., Nikolova GNanotechnology in Medicine. In: Hock F., Gralinski M. (eds) Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology. Springer, Cham. 2020 https://doi.org/10.1007/978–3–319–68864–0_45.
13. Mukherjee A., Bhattacharyya SNanotechnology in Medicine. In: Saxena A. (eds) Biotechnology Business – Concept to Delivery. EcoProduction (Environmental Issues in Logistics and Manufacturing). Springer, Cham. 2020 – https://doi.org/10.1007/978–3–030–36130–3_3.
14. Патент TJ 563. Флэш-способ получения пектина из растительного сырья. (29.12.2011). З.К. Мухидинов, Х.И. Тешаев, А.С. Джонмуродов, Л.С. Лиу.
15. Golmakani, M.T.; Rezaei, K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from Thymus vulgaris L. Food Chem., 2008, 109, 925–930.
16. Shamsara O., Jafari S.M., Muhidionv Z.K. Fabrication, characterization and stability of oil in water nano-emulsion produced by apricot gum-pectin complex. Int. J. of Biol. Macromolecules 2017 – 103, p. 1285–1293.
Бобокалонов Д.Т., Усманова С.Р., Исмоилов И.Б., Шерова З.У., Мухидинов З.К. Изучение полифенольных соединений корнеклубней Эремуруса Гиссарского (E Hissaricus) методом капиллярного зонного электрофероза. Актуальная биотехнология. 2018 – № 3(26). стр. 275–279.

УДК 577.218

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НОВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ PII БЕЛКОВ POTN ИЗ LACTOBACILLLUS HILGARDII С АТФАЗОЙ ABC-ТРАНСПОРТЕРА POTA

И.З. Исхакова, Д.Э. Журавлева, А.Р. Каюмов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

PII белки относятся к одному из широко распространенных семейств белков сигнальной трансдукции. Они участвуют в регуляции азотного обмена у бактерий, архей и пластид растений. PII белки взаимодействуют с широким спектром ферментов, транскрипционных факторов и мембранных транспортных белков в клетке и изменяют их активность в ответ на внутриклеточный уровень АТФ, АДФ, кетоглутората и глутамина [1, 2]. В зависимости от выполняемых функций PII белки можно разделить на три подсемейства. Белки семейства GlnB контролируют активность глутаминсинтетазы. Белки семейства GlnK контролируют активность транспортера аммония в клетку AmtB. Белки семейства NifI осуществляют контроль над активностью динитрогеназы [3]. Геном L. hilgardii LMG 07934 содержит только один ген, кодирующий белок с гомологией к PII-подобным белкам. В отличие от классических генов, кодирующих PII белки, glnB, большинство из которых являются моноцистронными, или glnK, которые обычно организованы в опероне с геном транспортером аммоний amtB, у Lactobacilli гены гомологов PII, если они присутствуют, связаны с опероном potABCD, кодирующим ABC-транспортер для спермидина / путресцина. Эта ассоциация предполагает возможную роль этого PII белка в регуляции соответствующей активности поглощения полиаминов. Среди более чем 200 известных видов лактобацилл только четыре – L. hilgardii, L. buchneri, L. farraginis и L. bifermentas – содержат ген PII гомолога в pot-опероне. Подобное генетическое соседство за пределами Lactobacilli было обнаружено только у Lactococcus lactis, где один ген PII паралога находится в pot-опероне, тогда как классический ген glnK представлен в опероне с amtB.

Гомологи PII из L. hilgardii и L. buchneri полностью идентичны и идентичны на 94 % и 75 % с гомологами из L. farraginis и L. bifermentas, соответственно (Таблица 1). Идентичность последовательности с ассоциированным с горшком гомологом PII из L. lactis составляет 57 %. Напротив, GlnK из Bacillus subtilis, ближайший хорошо охарактеризованный PII-белок, демонстрирует только 34 % идентичности с гомологом L. hilgardii. Большинство PII-белков из других организмов демонстрируют 33–46 % идентичности с гомологом L. hilgardii PII.

Таблица 1 – Гомология белка PotN L. hilgardii с другими PII-подобными белками

Организм	Идентичность, %	Гомология, %
Lactobacillus buchneri PotN	100	100
Lactobacillus farraginis PotN	94	98
Lactobacillus bifermentans PotN	75	85
Lactococcus lactis PotN	57	73
Lactococcus lactis GlnK	43	57
Bacillus subtilis GlnK	34	49
Enterococcus cecorum GlnK	46	65
Escherichia coli GlnK	37	60
Escherichia coli GlnB	37	61
Azospirillum brasilense GlnZ	37	57
Synechococcus elongatus GlnB	41	61
Arabidopsis thaliana GlnB	38	57

Основываясь на уникальном генетическом контексте в pot-опероне и низкой идентичности последовательности с хорошо охарактеризованными PII-гомологами подсемейства GlnB и GlnK, мы назвали этот ген potN (нуклеотид-связывающий Pot-белок), указывая, что этот PII гомолог не принадлежит ни к GlnB, ни к GlnK, ни к каким-либо другим подсемействам PII белков, охарактеризованным до настоящего времени.

В геноме L. hilgardii белок PotN расположен в опероне potABCD. Белки PotABCD представляют собой ABC-транспортер полиаминов спермидина / путресцина, который состоит из субстрат-связывающего белка PotD, расположенного на наружной стороне мембраны, двух каналобразующих белков PotB и PotC и АТФазы PotA связанной с каналобразующими белками и расположенной на внутренней стороне мембраны [4]. Исходя из расположения белков, наиболее вероятным белком для взаимодействия с PII белком является белок PotA. Ген белка PotA был клонирован в экспрессионный вектор, однако полный белок преципитировал in vitro; для решения этой проблемы N- и C-концевые домены белка были клонированы по отдельности. Однако удалось очистить только C-концевой домен PotAc, который является регуляторным, с которым проводились все дальнейшие эксперименты in vitro.

С помощью ITC было выявлено, что PotAc взаимодействует с АТФ, но не с путресцином и спермидином, однако присутствие магния подавляет взаимодействие с АТФ. Белок не обладает АТФазной активностью, скорее всего это является следствием того, что белок находится не в полноценном состоянии.

Для верификации взаимодействия белка PotN с белком PotA были использованы как методы in vitro (Pull Down), так и in vivo (бактериальная дигибридная система).

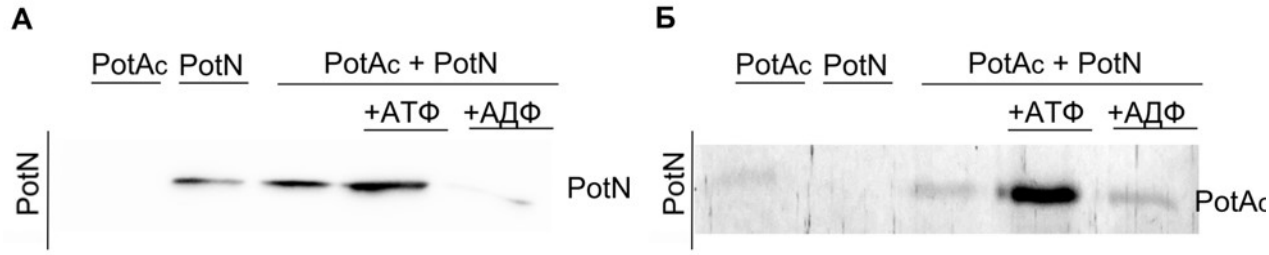


Рисунок 1 – Оценка взаимодействия белка PotN с белком PotAC в присутствии и в отсутствии АТФ и АДФ на Ni-NTA сефарозе (А) и Strep-tactin сефарозе (Б)

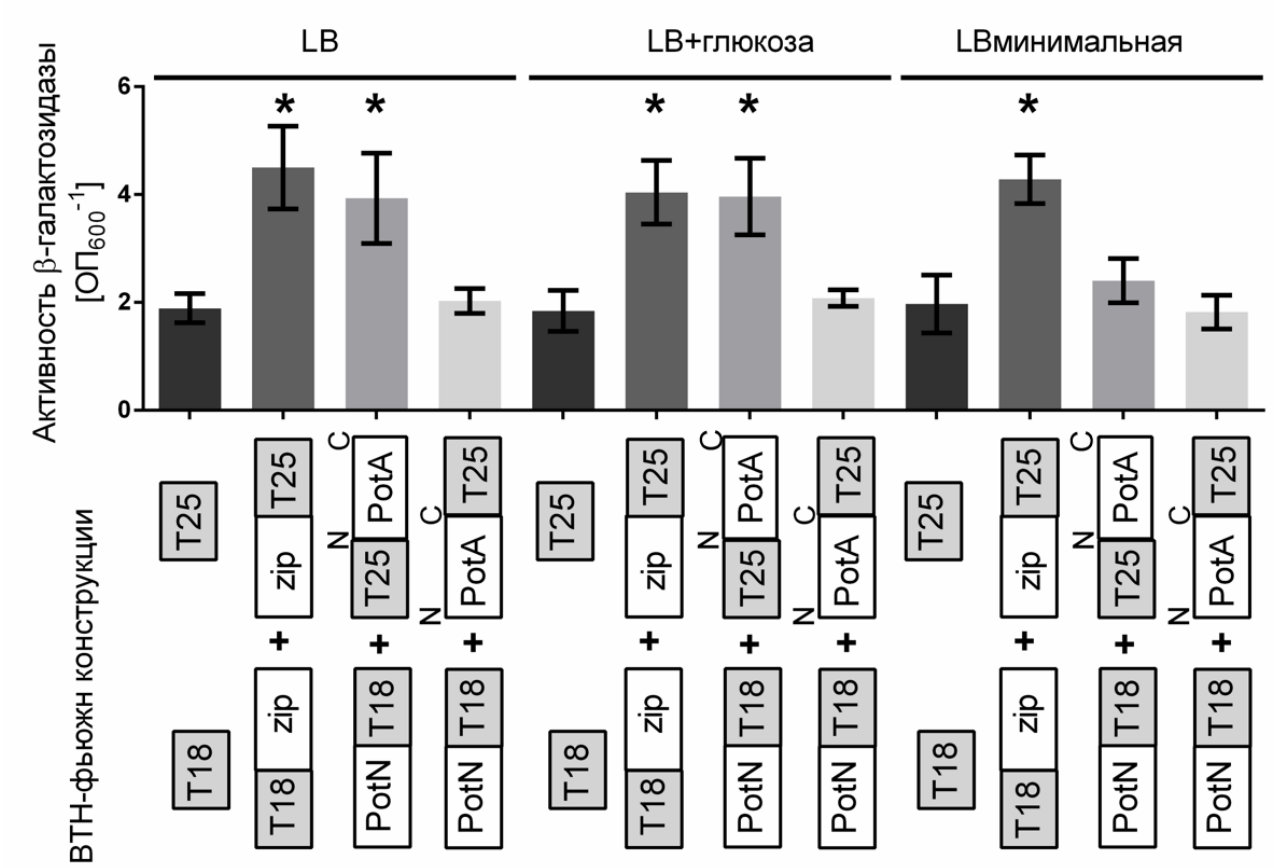


Рисунок 2 – Анализ взаимодействия белков PotN с белком PotA, в различных условиях

Для верификации взаимодействия in vitro был использован метод Pull Down анализа на Strep-tactin сефарозе (Рисунок 1). Ранее в нашей лаборатории были очищены до электрофоретической гомогенности белок PotN со Strep-tag последовательностью, и белок PotAc с His_6-tag последовательностью. Очищенные белки смешивали в пропорциях 1:2, где 1 – это объем белка с аффинной меткой Strep-tag, а 2 – это объем белка без аффинной метки Strep-tag. Аналогично проводили анализ на Ni-NTA сефарозе. Данный эксперимент также проводился при добавлении к пробам дополнительно 2 мМ АТФ и 2 мМ АДФ. Очищенные белки, один из которых несет в себе аффинную Strep-tag метку, смешивали и наносили на колонку. Если белки способны взаимодействовать друг с другом, то комплекс белков связывается с колонкой и не сходить с нее во время промывки сорбента.

В дальнейшем белковый комплекс ко-элюировася с колонки и анализировался в полиакриламидном геле. Результаты показали, что PotN эффективно взаимодействует с белком PotAc, при этом присутствие АТФ усиливает их взаимодействие, а АДФ – подавляет.

Взаимодействие белков in vivo исследовали с помощью бактериальной дигибридной системы [5]. Данная система – простой и, в то же время, быстрый способ выявления белок-белковых взаимодействий in vivo. Система содержит ген аденилатциклазы (cyaA), состоящий из двух фрагемнтов: T25 и T28. При физическом разделении эти фрагменты неактивны, но при их соединении восстанавливается активность аденилатциклазы с помощью взаимодействующих между собой белков, катализируя превращение АТФ в цАМФ. Комплекс БАК (белок, активирующий катаболизм) и цАМФ включает экспрессию гена lac, который кодирует β-галактозидазу. Измерение активности β-галактозидазы позволяет определить наличие или отсутствие взаимодействия между исследуемыми белками. Для проведения анализа ген белка PotA был клонирован в экспрессионный вектор pKT25 с получение N- и C-концевых фьюжн конструкций, а ген белка PotN был клонирован в вектор pUT18 с получением C-концевой фьюжн конструкции, как это было раньше сделано для других подобных белков. Далее этими плазмидами по очереди трансформировали штамм E.coli BTH_{101}. Также были получены контрольные штаммы с плазмидами pKT25-pUT18, в качестве отрицательного контроля, и pKT25zip-pUT18zip – положительного.

Ранее с помощью ITC было показано, что белок PotN имеет способность связывать АТФ и АДФ, при этом связывание АДФ происходит в примерно 7 раз эффективнее связывания АТФ. Поэтому были смоделированы различные условия проведения экперимента:

1) стандартная среда LB

2) условия голодания (содержание АТФ пониженно)

3) избыток питательных веществ посредством внесения 1 % глюкозы (содержание АТФ повышено).

Анализ показал высокую активность β-галактозидазы, когда фрагмент T25 находился на N-конце белка PotA (Рисунок 2). Следовательно, взаимодействие PotN происходит с C-концевой частью белка PotA. При повышенном содержании глюкозы, активность β-галактозидазы незначительно возрастала, что указывает на повышение эффективность взаимодействия PotN-PotA при высоких концентрациях АТФ. В условиях голодания активность β-галактозидазы снижалась, что говорит о негативном влиянии АДФ на взаимодействие белков.

Таким образом, сродство PotN к белку PotAc зависит от внутриклеточного соотношения АТФ/АДФ.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (№ МД-572.2020.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Forchhammer, K. P(II) signal transducers: novel functional and structural insights [Text] / K. Forchhammer // Trends Microbiol – 2008. – V.6. – P.65–72.
2. Merrick, M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins [Text] / M. Merrick // Frontiers in Microbiology – 2015. – V.5. – P.763.
3. Lapina, T. The PII signaling protein from red algae represents an evolutionary link between cyanobacterial and Chloroplastida PII proteins [Text] / T. Lapina K. Selim, K. Forchhammer, E. Ermilova // Scientific Reports – 2018 – V.790. – P.1–14.
4. Igarashi, K. Polyamine transport in bacteria and yeast [Text] / K. Igarashi, K. Kashiwagi // Biochem J. – 1999. – V.344. – P.633–642.
5. Battesti, A. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in Escherichia coli [Text] / A. Battesti, E. Bouveret // Methods – 2012 – V.58. – P.325–334.

УДК 664:532.135

ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УСТРИЧНОГО ЦИТРАТА КАЛЬЦИЯ

Е.А. Дубинец

Керченский государственный морской технологий университет, Керчь, Россия

Кальций является одним из важных элементов биосферы нашей планеты. Количество, которого в организме человека составляет почти 2 % от общего веса тела, значительно превышая содержание всех остальных минералов. При весе человека 60–70кг общее количество кальция в его организме составляет 1,0–1,2кг. При этом 99 % кальция находиться в костных тканях, 1 % кальция распределен в соединительных тканях и в крови. Как тот, так и другой кальций выполняют многие важные физиологические функции.

Одна из важнейших ролей кальция – обеспечение нормального функционирования и целостности костного скелета и зубов. Содержащийся здесь кальций находится в состоянии динамического равновесия с кальцием в кровеносной системе и служит для поддержания стабильного его обмена. Сам по себе скелет не является местом депонирования кальция, напротив, постоянно происходит образование новых кристаллов кальция и разрушение старых. Скорость этого разрушения непостоянна, она зависит от возраста человека, пола и физиологического состояния. У младенцев может обновляться более 100 % кальция костей в течение первого года жизни, у старших детей оборот составляет более 10 % в год, у взрослых –2–3 %. Пик костной ткани, может быть, не достигнут вплоть до 25 лет. К 40–50 годам разрушение костей может превысить их построение. Потеря костной ткани начинается раньше и происходит с резкими последствиями чаще у женщин, чем у мужчин. В результате возникает остеопороз и сопряженный с ним риск переломов лучевых костей, позвонков, шейки бедра и других костей. При этом уменьшение костной массы долгое время протекает без каких-либо внешних проявлений, то есть при остеопорозе наступает постепенное разрушение костной ткани, и поэтому диагноз остеопороза ставится, как правило, уже после перелома костей.

Важную и многогранную роль играет кальций в крови и клетках различных тканей человеческого организма. Он обеспечивает взаимодействие и поддержание работы клеточных мембран, передачу нервных импульсов, регуляцию процессов свертывания крови, нормальный тонус скелетной и глазной мускулатуры, регуляцию сердечного ритма, участие в иммунных процессах, в синтезе и работе ферментов. Оказывает противоаллергическое, противовоспалительное действие. Присутствуя в каждой клетке организма, он регулирует воспроизводство клеток и синтез белка в них. Кроме того, кальций предотвращает выделение клетками гистамина, который вызывает воспаление и боль в мышцах.

Суточная потребность в кальции составляет 800–1500 мг в зависимости от состояния организма. Детям в период роста необходимо получать 1200 мг. Потребность в кальции повышена у женщин в период беременности и кормления грудью, а также у всех людей в период после болезней, при стрессовых ситуациях и приеме некоторых лекарств. Если кальция в организме не хватает, он начинает вымываться из костей. В течение суток организм теряет в среднем около 800 мг кальция. Эти потери необходимо постоянно восполнять. Симптомы недостаточности кальция: возбуждение, раздражительность, хрупкость костей, экзема, бессонница, высокое кровяное давление, локализованное онемение или ощущение покалывания в руках или ногах, судороги или потеря сознания, бред, депрессия, учащенное сердцебиение, прекращение роста, болезненность десен и разрушение зубов [2].

Основным источником кальция для людей, безусловно, является повседневная пища. Однако, изменения экологии и образа жизни людей привело к существенному снижению общей ценности продуктов питания и, в частности, к снижению в них витаминов и минералов. Что касается кальция, то современный человек, по данным многочисленных исследований, получает этого элемента около половины потребного количества. Естественно возникает потребность в альтернативных источниках обеспечения людей кальцием.

Ниже представлены соединения кальция, которые сегодня можно использовать в качестве биологической активной пищевой добавки.

В отношении соединений кальция с фосфором надо заметить, что фосфорная нагрузка на организм современного человека и так повышена. Лактат и глюконат кальция содержат, довольно мало элементарного кальция – 13 % и 9 %, соответственно.

Хлорид кальция применяется в основном в растворах. Поэтому реально противостоят друг другу только два конкурента: цитрат кальция и карбонат кальция.

Таблица 1 – Источники кальция

Соль кальция	Содержание элементарного кальция (мг) в 1000 мг соли
Кальция карбонат	400
Кальция хлорид	270
Кальция фосфат	290
Кальция цитрат	211
Кальция лактат	130
Кальция глюконат	90

Содержание кальция в цитрате кальция – около 20 %, а в карбонате кальция – 40 %. При таком подходе получается, что из 1000 мг карбоната элементарного кальция поступает в организм больше, чем из 1000 мг цитрата. Отсюда естественны рекомендации в пользу карбоната, особенно исходя из его дешевизны. В связи с этим на мировом рынке доля препаратов из карбоната кальция занимает около 85 % [1].

Однако, в тщательно спланированном и проведенном исследовании установлено, что цитрат кальция по сравнению с карбонатом не только обеспечивал более высокий пик подъема уровня кальция в крови, но и существенно уменьшал выброс кальция с мочой. Кроме того, цитрат кальция приводил к более выраженному снижению уровня паратгормона – того самого, который вымывает кальций из костей. В целом, результаты исследования позволяют говорить о том, что биодоступность цитрата кальция в 2,5 раза выше, чем карбоната.

В реальной жизни очень часто кислотность желудка понижена или нулевая. Эта ситуация особенно характерна для лиц старшего возраста, когда особенно высока потребность в кальции. В этих условиях приём карбоната кальция, может привести к снижению уровня соляной кислота в желудке до 2 %, что безусловно не допустимо.

Усвоение же цитрата кальция не приводит по понижению соляной кислоты и в результате в условиях пониженной кислотности из цитрата кальция в организм поступает в 11 раз больше кальция, чем из карбоната.

Природными источниками для получения цитрата кальция могут служить доломит, скорлупа яиц, кораллы, створки морских раковин и др.

Исследования и длительный производственный опыт позволяют ООО «Лаборатория Пантика» считать, что цитрат кальция высокого потребительского качества может быть получен из створок устриц. Крымские устрицы выращиваются в экологически чистом районе, так как они очень требовательны к условиям существования и погибают, если их не выполнять. Соответственно их створки не содержат вредных элементов, которые могли бы оказаться в готовом цитрате кальция. Напротив, являясь морским организмом, их створки обогащены магнием, кремнием, йодом и др.

Подводя итог, можно заключить, что по своим биологическим свойствам цитрат кальция из створок устриц имеет неоспоримые преимущества перед карбонатными формами БАД. Выбирая рекомендуется обращать внимание на фирму производителя, природный сырьевой источник производства и форму кальция. При этом в 1г таблетки или порошка цитрата кальция должно содержаться около 200 мг элемента кальция. Необходимо также обращать внимание на другие компоненты в его составе. Идеально, если в состав входит витамин D, магний, цинк, марганец.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешина С.В. Вещества жизни: кальций, магний и витамин D. – М.: Орто.ру, 2004. -132 с.
2. Пол Бергнер Целительная сила минералов, особых питательных веществ и микроэлементов/ Пол Бергнер; Пер. с англ. У. Сапциной. – Москва: Крон-пресс, 1998. – 286 с.

УДК 66.012

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННОЙ ХИМИКО-БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ НЕФТЕПРОДУКТОВ ОТ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

Е.Н. Ефременко, О.В. Маслова, О.В. Сенько, Н.А. Степанов, С.Н. Гайдамака, М.А. Гладченко, А.В. Акопян, П.Д. Поликарпова, С.В. Лысенко, А.В. Анисимов

МГУ имени М.В. Ломоносова,, Москва, Россия

Вопросы, связанные с разработкой новых и усовершенствованием существующих методов очистки нефтепродуктов от серосодержащих соединений, которые имеют природное происхождение, и как правило, обязательно присутствуют в нефтяном сырье, перерабатываемом в конечные продукты, остаются актуальными в наши дни, поскольку традиционные виды топлива продолжают активно использоваться в мировой экономике. Нами был предложен экологичный ресурсосберегающий химико-биологический подход к глубокой десульфуризации углеводородного сырья, состоящий из трех стадий [1–3]: 1 – химическое каталитическое окисление находящихся в исходном сырье серосодержащих соединений при 20–60 °С, в присутствии $COOH_2$, Na_2MoO_4 и H_2O_2; 2 – экстракция из обработанного сырья образовавшихся полярных окисленных форм серы с использованием биодеградируемых экстрагентов; 3 – биокаталитическая трансформация полученных экстрактов с серосодержащими соединениями в условиях метаногенеза совместно с возобновляемыми отходами с получением биогаза и неорганического сульфида, который практически не переходит в газовую фазу за счет поддержания определенного значения pH среды.

Анализ условий проведения трехстадийного процесса позволил выделить ряд основных факторов, предопределяющих эффективность всего процесса в целом. Эти факторы связаны с каскадом последовательных реакций и используемыми в них химическими и микробными катализаторами, которые взяты в определенных концентрациях, применяются в определенных условиях реализации каталитических трансформаций. Оказалось, что наиболее существенными факторами являются: состав применяемых катализаторов; природа экстрагента, используемого для извлечения полярных окисленных соединений серы; сами соединения серы, присутствующие в сырье [4]; среда для проведения метаногенеза, в который, собственно, вплетается восстановительная трансформация окисленных соединений серы. При этом оказалось, что основной субстрат, применяемый для поддержания эффективного метаногенеза и накопления биогаза с максимальным содержанием метана, может быть взаимозаменяемым, и представлять собой отход пищевого или сельскохозяйственного производства, производства аминокислот или смазочных масел.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18–29–05064).

ЛИТЕРАТУРА

1. Senko O., Maslova O., Gladchenko M., Gaydamaka S., Akopyan A., Lysenko S., Karakhanov E., Efremenko E. Prospective approach to the anaerobic bioconversion of benzo-and dibenzothiophene sulfones to sulfide. // Molecules, 2019, v. 24(9), p. 1736.

2. Senko O., Maslova O., Gladchenko M., Gaydamaka S., Efremenko E. Biogas production from biomass of microalgae Chlorella vulgaris in the presence of benzothiophene sulfone. // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2019, v. 525(1), p. 012089.

3. Maslova O., Senko O., Stepanov N., Efremenko E. Perspective approaches with the use of biocatalysts for improving the processes of polyaspartic acid production from oil benzene fraction after oxidative desulfurization. // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2019, v. 525(1), p. 012037.

4. Акопян А.В., Поликарпова П.Д., Анисимов А.В., Лысенко С.В., Маслова О.В., Сенько О.В., Ефременко Е.Н. Окисление дибензотиофена с последующей биоконверсией образующегося сульфона. // Химическая технология, 2020, т. 21(6), с. 242–250.

УДК 636.087.3(045)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МУЛЬТИЭНЗИМНОЙ КОМПОЗИЦИИ В ТЕХНОЛОГИИ БИОФЛАВОНОИДОВ ОБЛЕПИХОВОГО ШРОТА

Е.В. Аверьянова, Е.Д. Рожнов, М.Н. Школьникова, М.В. Обрезкова

Бийский технологический институт (филиал) Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск, Россия

Разнообразие плодово-ягодного сырья и производимых из него пищевых продуктов обуславливает необходимость совершенствования технологических процессов с целью увеличения ассортимента высококачественных продуктов питания и рационального использования образующихся при этом вторичных продуктов, в том числе методами биотехнологии. Среди продуктов вторичной переработки плодово-ягодного сырья в условиях Алтайского края особое внимание заслуживает обезжиренный шрот, который в значительном количестве образуется при переработке плодов облепихи. В нем содержится большое количество биологически активных веществ: пищевые волокна, витамины, полифенольные соединения и др. [1–3].

Однако несмотря на исследования, проводимые в области совершенствования безотходного использования плодов, шрот до сих пор не находит рационального применения. В большей степени это связано с тем, что наряду с БАВ в водно-этанольном экстракте присутствуют балластные вещества, в том числе углеводной природы, затрудняющие дальнейшую очистку экстракта и понижающие выход целевых продуктов.

В связи с этим целью работы являлось исследование разрушения полифенол-углеводного комплекса облепихового шрота ферментными препаратами и их мультиэнзимными композициями.

Объектами исследования служили: обезжиренный облепиховый шрот (получен с действующего производства облепихового масла экстракционным способом в 2019 г.), физико-химические показатели которого представлены в таблице 1; промышленные ферментные препараты целлюлолитического, пектолитического, пентозоназного, глюкоамилазного и гемицеллюлазного действия, а также их и мультиэнзимные композиции (МЭК), основные характеристики которых и дозировка приведены в таблице 2. Массовую концентрацию сахаров определяли методом Бертрана по ГОСТ 13192–73, а суммарное содержание полифенольных соединений модифицированным методом Фолина-Чокальтеу по ГОСТ Р 55488–2013.

Таблица 1 – Физико-химические показатели обезжиренного облепихового шрота (n=3)

Наименование показателя	Значение, %
Массовая доля влаги	5,0±0,4
Массовая доля золы	2,5±0,2
Металлические примеси и посторонние вещества	не обнаружено
Массовая доля органических кислот, в пересчете на яблочную	3,3±0,4
Массовая доля общего сахара	3,7±0,1
Массовая доля сахарозы	0,9±0,1
Массовая доля экстрактивных веществ	19,0±0,5
Массовая доля клетчатки	15,0±0,4
Массовая доля пектиновых веществ (протопектин)	1,36±0,04
Массовая доля суммы полифенолов	0,52±0,1

Микробиологическая безопасность используемых образцов облепихового шрота находится в пределах нормы по ТР ТС 021/2011.

Согласно данным ряда исследователей углеводный состав обезжиренного облепихового шрота разнообразен и постоянен независимо от места произрастания облепихи (лат. Hippohae rharmnoides L.). В шроте преимущественно содержатся гемицеллюлоза (до 40,3 %) и целлюлоза (до 24,8 %), а также пектиновые вещества (до 9,2 %) и другие полисахариды (до 5,9 %), олигосахариды (до 8,1 %) и редуцирующие сахара (до 4,7 %) от общего количества углеводов в шроте [4]. Моносахаридный состав углеводов облепихового шрота приведен в таблице 3.

Из таблицы 3 видно, что в олигосахаридах присутствуют галактоза, глюкоза, арабиноза и следовые количества маннозы, ксилозы и рамнозы. Полисахариды преимущественно построены из остатков арабинозы, глюкозы и рамнозы, обнаружены галактоза, ксилоза и манноза. В пектиновых веществах и гемицеллюлозе набор моноз различается лишь их соотношением.

Таблица 2 – Характеристика и дозировка ферментных препаратов и их МЭК

Ферментный препарат или МЭК	Механизм действия	Оптимальные условия		Дозировка, мл/г×10^{-3}
		pH	t, °C	
ЦеллоЛюкс А (ООО ПО «Сиббиофарм», Россия)	гидролиз целлюлозы, глюкоамилозы, β-глюкана и ксилана	3,5–6,0	45–60	0,100
Ultraflo XL (Novozymes A/S, Дания)	гидролиз целлюлозы и гемицеллюлозы	4,0–6,0	30–60	0,300
Ultraflo MAX (Novozymes A/S, Дания)	гидролиз гемицеллюлозы, ксилана, целлюлозы, арабиноксиланов	4,0–6,0	50–60	0,100
BrewZyme BGX (Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A., Польша)	гидролиз β-глюканов, ксиланов и целлюлозы	5,0–5,5	50–55	0,050
Pectinex BE 3-L (Novozymes A/S, Дания)	гидролиз пектина	4,5–6,0	50–60	0,100
Ultraflo MAX и ЦеллоЛюкс А (1:1)	гидролиз целлюлозы, гемицеллюлозы, ксилана, β-глюкана, глюкоамилозы	4,0–6,0	45–60	0,200
Ultraflo XL и BrewZyme BGX (1:1)	гидролиз целлюлозы и гемицеллюлозы, ксиланов и β-глюканов	5,0–5,5	50–55	0,075
Ultraflo XL и Pectinex BE 3-L (1:1)	гидролиз целлюлозы, гемицеллюлозы и пектина	4,5–6,0	50–60	0,500
BrewZyme BGX и ЦеллоЛюкс А (1:1)	гидролиз β-глюканов, ксиланов, целлюлозы, глюкоамилозы	5,0–5,5	50–55	0,172
ЦеллоЛюкс А и Pectinex BE 3-L (1:1)	гидролиз целлюлозы, глюкоамилозы, β-глюкана, ксилана и пектина	4,5–6,0	50–60	0,450

Таблица 3 – Моносахаридный состав углеводов облепихового шрота по [4]

Наименование углеводов	Галактоза	Глюкоза	Манноза	Ксилоза	Арабиноза	Рамноза
Редуцирующие сахара	1,7	2,9	–	–	–	–
Олигосахариды	2,2	2,3	следы	следы	2,0	следы
Полисахариды	следы	1,0	следы	следы	4,2	1,0
Пектиновые вещества	3,1	1,2	1,0	1,0	1,2	3,9
Гемицеллюлоза	1,2	1,3	1,0	1,0	1,3	1,7

Для проведения ферментативного гидролиза облепихового шрота предварительно измельченную навеску смешивали с дистиллированной водой (гидромодуль 1:50) при температуре 30–35 °С и при перемешивании дозировали ферментный препарат или МЭК до достижения концентрации, указанной в таблице 2. Ферментолиз проводили в термостате в течение 1,5 ч при оптимальных для каждого фермента условиях. Образующийся ферментолизат отфильтровывали от твердых частиц шрота под вакуумом водоструйного насоса и далее использовали для определения суммарного содержания полифенольных соединений и редуцирующих сахаров.

Используемые ферментные препараты состоят из комплекса ферментов целлюлазного, гемицеллюлазного, глюканазного, пентозоназного и пектиназного действия. Так, эндоглюканаза (целлюлаза, β-глюканаза) – фермент, входящий в состав целлюлолитического комплекса, катализирует гидролиз β-1,4 – гликозидных связей в молекуле целлюлозы с образованием β-D-глюкозы.

Эндоксиланаза (ксиланаза), подобным образом, катализирует расщепление β-1,4 – гликозидных связей в молекулах ксилана с образованием олигосахаридов различной молекулярной массы. Полигалактуроназа (пектиназа) гидролизует 1–4-α-D-галактуронозидные связи пектина до эфиров галактуроновой кислоты и арабинозы [5–6]. Результаты экспериментов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Массовая концентрация редуцирующих сахаров и полифенолов в ферментолизатах облепихового шрота в зависимости от используемого ферментного препарата или МЭК (n=3)

Ферментные препараты/МЭК	Массовая концентрация сахаров, г/л	Массовая концентрация полифенолов, г/л
ЦеллоЛюкс А	3,84±0,02	0,221±0,001
Ultraflo XL	5,60±0,02	0,275±0,001
Ultraflo MAX	8,00±0,02	0,256±0,001
BrewZyme BGX	3,20±0,02	0,255±0,001
Pectinex BE 3-L	2,40±0,02	0,279±0,001
ЦеллоЛюкс А и Pectinex BE 3-L	3,80±0,02	0,228±0,001
BrewZyme BGX и Ultraflo XL	7,80±0,02	0,266±0,001
Ultraflo XL и Pectinex BE 3-L	6,30±0,02	0,290±0,001
BrewZyme BGX и ЦеллоЛюкс А	6,80±0,02	0,248±0,001
Ultraflo MAX и ЦеллоЛюкс А	11,04±0,02	0,246±0,001

Из данных таблицы 4 видно, что наибольшая концентрация редуцирующих сахаров (11,04 г./л) наблюдается при использовании МЭК Ultraflo MAX и ЦеллоЛюкс А, а наименьшая (2,40 г./л) – при ферментолизе ферментным препаратом Pectinex BE 3-L. Наибольшая концентрация полифенолов наблюдается при использовании МЭК Ultraflo XL и Pectinex BE 3-L (0,290 г./л), а наименьшая у ЦеллоЛюкс А (0,221 г./л). Следует отметить, что в результате ферментолиза облепихового шрота, как и следовало ожидать, массовая концентрация полифенольных веществ изменяется незначительно и не зависит от используемого фермента, в то время как углеводный компонент сырья расщепляется наиболее интенсивно при воздействии МЭК, содержащей ферменты целлюлолитического, пентозоназного, глюкоамилазного и гемицеллюлазного действия.

После проведения ферментативного гидролиза обезжиренного облепихового шрота, образующиеся простые сахара легко удаляются при промывке концентрированного ферментолизата водой с последующим отделением полифенольных веществ фильтрованием. При этом сохраняется нативная структура полифенолов за счет снижения вероятности гидролиза флавоноидных гликозидов.

ЛИТЕРАТУРА

1 . Никулина, Е.О. Облепиховый шрот как функциональный ингредиент для создания продуктов функционального назначения / Е.О. Никулина, Г.В. Иванова, О.Я. Кольман // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2015. – № 10. – С. 98–105.

2. Чиркина, Т.Ф. Химический состав облепихового шрота / Т.Ф. Чиркина, А.М. Золотарева, Н.Д. Гончикова [и др.] // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 1994. – № 1 – С. 23–24.

3. Аверьянова, Е.В. Биологическая ценность облепихи как основа ее комплексной безотходной переработки / Е.В. Аверьянова // Современная наука и инновации. – 2018. – № 3 (23). – С. 129–139.

4. Турдумамбетов, К. Углеводный состав шрота из облепихи крушиновидной и получение облепихового масла из шрота и семян / К. Турдумамбетов, К.Т. Шалпыков, Э.Э. Эрназарова [и др.] // Известия НАН КР. – 2017. – № 1. – С. 26–28.

5. Белова, О.В. Ксиланаза и целлюлаза гриба Cerrena Unicolor BKM F-3196: Получение, свойства, применение для осахаривания растительного сырья. /О.В. Белова, А.В. Лисов, Н.Г. Винокурова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – № 2. – С. 171–176.

6. Никитина, Е.В. Бактериальные источники амилолитических ферментов: характеристика и нетрадиционное применение / Е.В. Никитина // Вестник Казанского технологического университета. – 2015. – № 10. – С. 245–247.

УДК 577.114.7

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БЕТА-ГЛЮКАНОВ

О.Н. Айрапетян[1,2,3], В.А. Иванова[2], Т.В. Меледина[2], А.А. Кульминская[1,3]

[1] НИЦ Курчатовский институт – ПИЯФ
[2] Санкт-Петербургский университет технологий, механики и оптики, Россия
[3] Курчатовски геномный центр-ПИЯФ, Гатчина, Россия

Бета-глюканы – это группа полисахаридов, вырабатываемых прокариотическими и эукариотическими организмами. На сегодняшний день известно, что данные соединения могут обладать широким спектром биологических активностей: антимикробная, противовоспалительная, противораковая и иммуномодулирующая. Однако, молекулярная масса, структура и физико-химические свойства бета-глюкана зависят от организма-источника [1, 2].

В данной работе были использованы полисахарид, полученный из лишайника Cetraria islandica, препарат клеточных стенок и бета-глюкансодержащий концентрат из остаточных пивных дрожжей. Бета-глюкан из лишайника получали спиртовым осаждением из водного экстракта [3]. Дрожжевые формы бета-глюкана получали отделением остаточных пивных дрожжей от сусла центрифугированием, с последующим автолизом и дальнейшей обработкой препарата клеточных стенок ферментами [4].

Антибактериальную активность данных образцов тестировали на следующих бактериальных штаммах из коллекции лаборатории энзимологии ОМРБ, НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ: Escherichia coli ATCC 25922, Bacillus licheniformis B-7038, Staphylococcus aureus ATCC 29213. Для проведения экспериментов культуры растили на среде NB при 37 °C в течении 24 часов. Далее приводили к единому значению по оптической плотности при 600 нм, что соответствует значению 1×10^5 КОЕ/мл. При приготовлении суспензий бактериальных культур использовали изотонический раствор (0,9 % NaCl). Для оценки наличия антибактериальной активности у образцов использовали диско-диффузионный метод [5]. Схема эксперимента и результаты представлены на рисунках 1,2. Для подбора минимальной ингибирующей концентрации полисахарида относительно бактерий использовали метод микротитрования на планшете [6].

Проведенные эксперименты показали наличие у дрожжевых бета-глюканов антибактериальной активности против E. coli и B. licheniformis, но отсутствие эффекта для S. aureus. В отношении лихенана антимикробная активность не была обнаружена (Таблица 1). МПК для дрожжевого полисахарида было определено в значении 125 мг/мл. Сложность работы с образцами и, как следствие, подбора МИК связаны со слабой растворимостью образцов и необходимостью корректировки методики сушки полисахаридов.

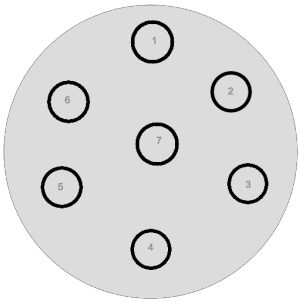


Рисунок 1. Схема расположения дисков в эксперименте диско-диффузионным методом

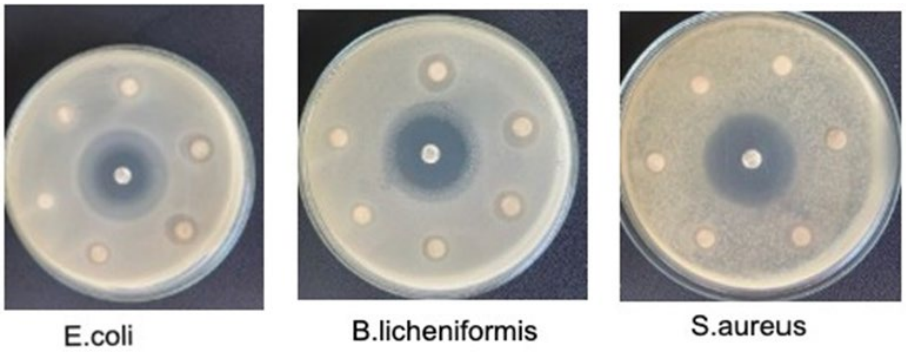


Рисунок 2. Результаты диско-диффузионного метода определения антибактериальной активности

Таблица 1. Процент ингибирования роста бактерий, обработанных, различными фракциями β-глюкана

Полисахарид	Ингибирование роста бактерий, %		
	E. coli	B. licheniformis	S. aureus
Дрожжевой бета-глюкан (1 образец)	66,04±3,3	64,44±3,22	12,60±0,63
Дрожжевой бета-глюкан (2 образец)	51,56±2,57	63,35±3,16	10,69±0,53
Дрожжевой бета-глюкан (3 образец)	31,60±1,58	31,24±1,56	9,00±0,45
Дрожжевой бета-глюкан (4 образец)	15,77±0,78	28,43±1,42	7,79±0,38
Лихенан (1 образец)	1,27±0,06	3,83±0,19	0,71±0,03
Лихенан (2 образец)	0,79 ± 0,03	1,82±0,09	-

Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения бета-глюканов в качестве антибактериальных компонентов. Два образца протестированных бета-глюкана показали ингибирующее действие, как против граммположительных, так и граммотрицательных бактерий. Это показывает, что полисахарид оказывает влияние вне зависимости от строения бактериальной стенки.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075–15–2019–1663.

ЛИТЕРАТУРА

1. Claire Barton, Kim Vigor, Robert Scott, Paul Jones, Heike Lentfer, Heather J Bax, Debra H Josephs, Sophia N Karagiannis, James F Spicer Beta-glucan contamination of pharmaceutical products: How much should we accept? Cancer Immunol Immunother. 2016 Nov; 65(11):1289–1301.
2. Vetvicka V, Vannucci L, Sima P, Richter J. Beta Glucan: Supplement or Drug? From Laboratory to Clinical Trials. Molecules. 2019; 24(7):1251. Published 2019 Mar 30. doi:10.3390/molecules24071251
3. Olafsdottir ES, Omarsdottir S, Paulsen BS, Wagner H. Immunologically active O6 branched (1→3) – beta-glucan from the lichen Thamnolia vermicularis var. subuliformis. Phytomedicine. 2003; 10(4):318–324. doi:10.1078/094471103322004811
4. Ivanova V., Antontceva E., Harbah R., Meledina T.V., Shamtsyan M. Residual brewing yeasts as a source of beta-glucans. E3S Web of Conferences. 2020. Vol. 164. pp. 06027.
5. Biemer JJ. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. Ann Clin Lab Sci. 1973; 3(2):135–140.
6. Amin RM, Abdel-Kader NS, El-Ansary AL. Microplate assay for screening the antibacterial activity of Schiff bases derived from substituted benzopyran 4 one. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2012; 95:517–525. doi:10.1016/j.saa.2012.04.042

УДК 577.15

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРАХ

Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, В.Г. Матвеева, М.Г. Сульман

Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

Глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4; β-D-глюкоза: кислород оксидоредуктаза) – димерный флавопротеин, состоящий из 2 идентичных полипетидных цепей, ковалентно связанных между собой с помощью дисульфидных связей [1]. Фермент содержит 2 молекулы флавинадениндинуклеотида (ФАД) в качестве кофермента (по одной на каждую субъединицу белковой молекулы) [2]. Глюкозооксидазу выделяют из различных грибов, преимущественно принадлежащих к родам Aspergillus и Penicillium; молекулярный вес фермента из разных источников варьируется от 130 до 175 кДа; оптимум pH для глюкозооксидазы из грибов варьируется в пределах от 4.0 до 7.0; фермент нестабилен при температурах выше 40 °C [2]. Глюкозооксидаза катализирует окисление β-D-глюкозы до D-глюконо-δ-лактона (δ-глюконо – 1,5 – лактона) и H_2 O_2 с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [1].

Глюкозооксидаза в последние десятилетия широко применяется в свободном или иммобилизованном виде в различных отраслях промышленности – химической, фармацевтической, пищевой, а также клинической и аналитической химии [3]. Благодаря достаточно низкой стоимости и высокой стабильности, глюкозооксидаза эффективно применяется в составе аналитических реагентов и биосенсоров для определения содержания глюкозы; в органическом синтезе глюкозооксидаза используется для коммерческого получения глюконовой кислоты – пищевой добавки и компонента лекарственных средств [2].

Во многих процессах целесообразнее использовать иммобилизованные формы глюкозооксидазы, что позволяет существенно повысить ее устойчивость к ингибирующим воздействиям, а также обеспечить возможность многократного использования биокатализатора [4]. Опубликован целый ряд работ, описывающих успешный опыт иммобилизации глбкозооксидазы на различных твердых носителях [3]. Среди наиболее перспективных носителей для иммобилизации глюкозооксидазы особое место занимают модифицированные различными способами биодеградируемые и экологически безопасные биополимеры. В частности, Dong и др. иммобилизовали глюкозооксидазу на модифицированном L-лизином хитозане, имеющем увеличенную специфическую площадь поверхности, что существенно повысило операционную стабильность и термоустойчивость фермента [5]. В работе Wang и др. глюкозооксидаза была инкапсулирована в микросферах из альгината кальция и хитозана с использованием последовательного эмульгирования эмульсификации и внутреннего гелеобразования и покрытия микросфер хитозаном для последующего использования иммобилизованного фермента в качестве улучшителя муки [6]. Tang и др. иммобилизовали глюкозооксидазу на частицах «хитозан-триполифосфат натрия» и также использовали ее для улучшения хлебопекарных свойств пшеничной муки [7].

В связи с этим, целью данной работы было определение основных закономерностей иммобилизации глюкозооксидазы на природных биополимерах

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для иммобилизации глюкозооксидазы были синтезированы 2 типа носителей на основе альгината натрия:

1) Макросферы: 10 мл раствора 1,5 %-ного раствора альгината натрия по капле через шприц вносили в 100 мл 1,5 %-ного раствора хлорида кальция, в результате чего образовывались шарики диаметром 2–2,5 мм. Они выдерживались в растворе 2 минуты, после чего промывались дистиллированной водой. Полученные макросферы выдерживались в течение 12 часов в 50 мл раствора, содержащего 0,394 г. карбодиимида и 0,144 г. N-гидроксисукцинимида. Далее они были промыты дистиллированной водой, выдержаны в течение 6 часов в растворе глюкозооксидазы (25 мг в 50 мл фосфатного буферного раствора с pH = 6,0), снова промыты дистиллированной водой и хранились до проведения экспериментов в холодильнике при температуре 3±1 °C.

Приём материалов статей по адресу: actbio@mail.ru

2) Микросферы: для их получения использовался модифицированный метод внутреннего гелеобразования раствора альгината натрия, превращенного в эмульсию в растительном масле [6]. 0,08 г. микрокристаллического порошка $CaCO_3$ добавляли в 20 мл 1,5 % раствора альгината натрия (0,3 г в 20 мл воды) при постоянном перемешивании. Полученная суспензия диспергировалась в 40 мл подсолнечного масла, содержащего Span 80 (2 % об.) и интенсивно перемешивалась в течение 2 минут. После эмульгирования в смесь добавлялось 30 мл подсолнечного масла, содержащего 2 % (об.) Span 80 и 0,2 мл ледяной уксусной кислоты. Интенсивное перемешивание продолжалось в течение 10 минут. Далее в смесь добавляли 150 мл дистиллированной воды, и перемешивание продолжалось при меньшей интенсивности в течение 30 минут. Для отделения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных шариков от масляной фазы добавляли 250 мл 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Полученные микросферы осаждали из масляной фазы, масло удаляли из системы путем декантации. Далее осадок альгинатных микросфер промывали 0,05 М раствора хлорида кальция, содержащего 1 % (об.) Tween 80. Микрочастицы отмывали несколько раз с водой до полного удаления следов масла.

Для определения активности микросферы с нанесенной глюкозооксидазой были смешаны с 40 мл раствора глюкозы (2,2 ммоль/л) и проводилась реакция окисления при постоянном перемешивании при температуре 25 ºС в течение 60 минут с периодическим отбором пробы из реакционной смеси микропипеткой. Показателем активности глюкозооксидазы была концентрация пероксида водорода в реакционной смеси, которая определялась описанным ранее методом [8], основанном на взаимодействии образующегося в реакции пероксида водорода с йодидом калия в кислой среде и фотометрировании образующегося синего комплекса «йод-крахмал». В кювету спектрофотометра СФ-2000 вносили микропипеткой 10 мкл реакционной смеси, после чего строго последовательно добавляли 2,0 мл раствора HCl (0,05 н.), 0,2 мл раствора KI (16,6 % масс.), 0,2 мл раствора молибдата аммония (0,12 % масс.), 0,2 мл раствора крахмала Линтнера (5 %) и через 3 минуты измеряли оптическую плотность смеси относительно дистиллированной воды при длине волны 570 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был построен калибровочный график по стандартным растворам H_2 O_2, приготовленным методом последовательного разбавления (рисунок 1).

Полученные значения оптической плотности для каждой отобранной пробы пересчитывались в концентрации пероксида водорода с помощью калибровочного графика. Ход реакции в виде изменения концентрации образующегося пероксида водорода во времени для свободной глюкозооксидазы представлен на рисунке 2, для иммобилизованной на альгинатных макросферах – на рисунке 3, для иммобилизованной на альгинатных микросферах – на рисунке 4.

Из рисунков 2–4 видно, что иммобилизованные препараты глюкозооксидазы обладают гораздо меньшей активностью по сравнению с ее свободной формой, что связано прежде всего с гетерогенизацией процесса, а также с потерями фермента во время иммобилизации. Однако иммобилизация позволяет легко отделить фермент от реакционной среды и использовать его повторно, что компенсирует потерю активности при однократном использовании. Кроме того, как показали эксперименты, иммобилизация на альгинатных микро- и макросферах немного расширила оптимальные диапазоны температуры и значений pH по сравнению с растворимой формой фермента, что свидетельствует о более высокой устойчивости синтезированных биокатализаторов к ингибирующим воздействиям.

На основании проведенных экспериментов были выявлены следующие основные аспекты, влияющие на эффективность исследуемого процесса:

1) Одним из важнейших параметров, влияющих на успешность иммобилизации ферментов на альгинатных сферах, является размер частиц. Оптимальный для использования диаметр макросфер – не более 2 мм. При увеличении диаметра существенно увеличивается «мертвый объем» макросфер, в котором не осуществляется реакция из-за отсутствия в нем молекул фермента. Уменьшение размера макросфер менее 2 мм практически неосуществимо из-за особенностей капельного метода. Для микросфер при увеличении размера более 100 мкм происходит их агрегирование и образование крупных кластеров, которые также увеличивают неиспользуемый объем системы, что существенно снижает эффективность процесса.

2) Для ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы на сферах из альгината натрия целесообразно использовать карбоксильные группы молекулы альгината натрия, для активации которых используются карбодиимид и N-гидроксисукцинимид. Схема активации карбоксильных групп альгината натрия представлена на рисунке 5.

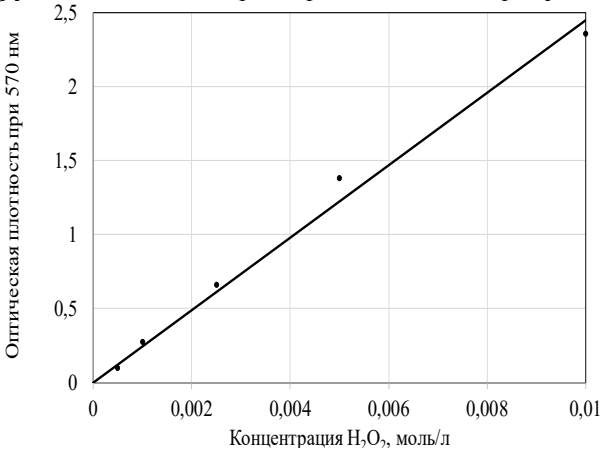


Рисунок 1 – Калибровочный график для определения концентрации пероксида водорода

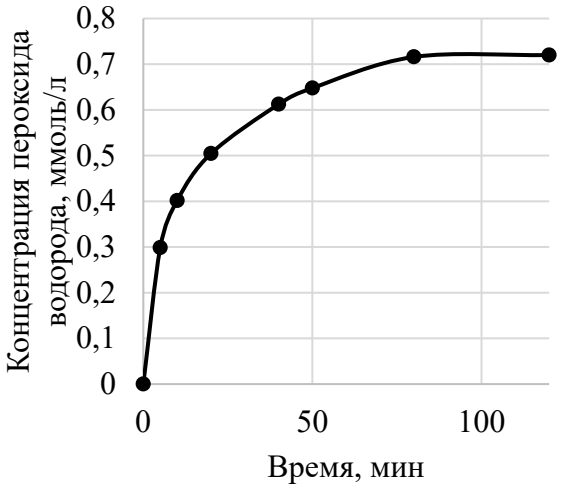


Рисунок 2 – Ход реакции окисления глюкозы свободной глюкозооксидазой

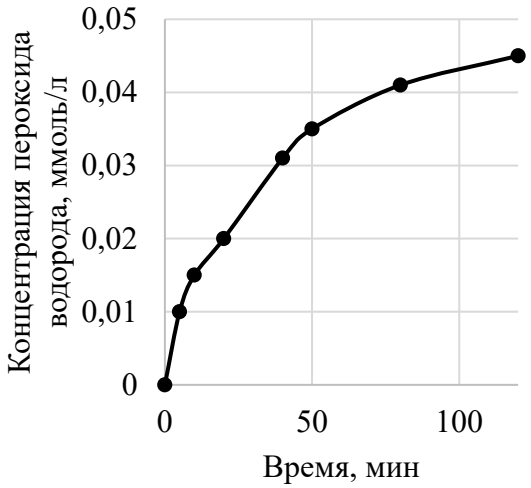


Рисунок 3 – Ход реакции окисления глюкозы иммобилизованной на альгинатных макросферах глюкозооксидазой

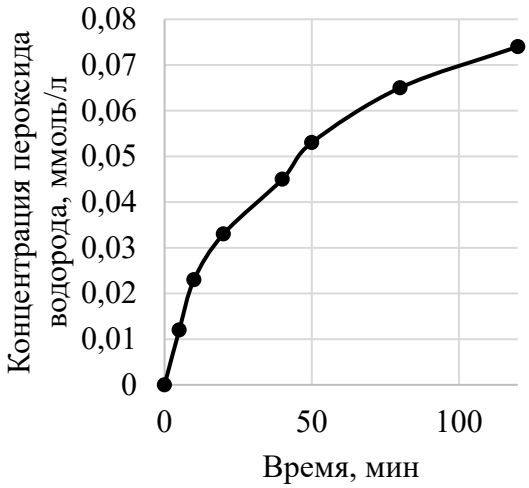


Рисунок 4 – Ход реакции окисления глюкозы иммобилизованной на альгинатных микросферах глюкозооксидазой

В результате образуется прочная ковалентная связь молекул альгината натрия с молекулами фермента. Использование дополнительной модификации альгинатных сфер для получения других функциональных групп на поверхности (например, аминогрупп – с помощью глутарового диальдегида) нецелесообразно из-за усложнения системы и внесения в ее состав опасных реагентов, что может исключить ее использование в пищевой и фармацевтической промышленности.

3) В качестве источника глюкозоксидазы могут быть использованы только плесневые грибы Aspergillus niger, так как использование глюкозооксидазы из других микробиологических источников в пищевых технологиях запрещено.

4) Для повышения устойчивости биокатализаторов к ингибирующим воздействиям микро- и макросферы из альгината натрия (полианиона) могут быть покрыты оболочкой природных поликатионов (например – хитозана). Такие системы могут быть использованы, в частности, в качестве систем доставки лекарств в определенные отделы желудочно-кишечного тракта.

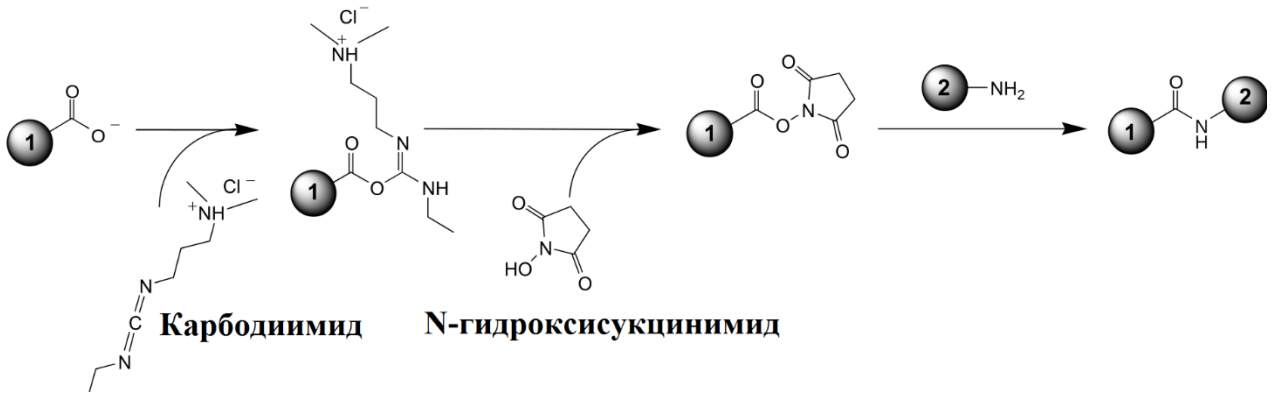


Рисунок 5 – Схема активации карбоксильных групп альгината натрия карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом.

5) Также разработанные биокатализаторы могут быть эффективно использованы в качестве биосенсоров для определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях (после построения калибровочного графика по стандартным растворам глюкозы).

6) Все стадии синтеза биокатализаторов целесообразно проводить при комнатной температуре, так как повышение температуры может привести к необратимым изменениям в структуре биополимеров и ферментов, являющихся компонентами биокатализаторов, что отрицательно скажется на активности и стабильности синтезируемых биокатализаторов. Также, во избежание необратимого ингибирования биокатализаторов ионами металлов и органическими соединениями, при синтезе биокатализаторов важно использовать чистую посуду и инструменты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования доказали эффективность иммобилизации глюкозооксидазы на микро- и макросферах из альгината натрия, карбоксильные группы которого активированы карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом. Разработанные биокатализаторы могут быть использованы в пищевой промышленности качестве хлебопекарных улучшителей, в химической промышленности для получения глюконовой кислоты и в аналитической химии для определения концентрации глюкозы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18–08–00424)

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson R., Turner A.P.F. Glucose oxidase: an ideal enzyme // Biosens. Bioel. 1992. Vol. 7. pp. 165–185.
2. Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L. Glucose oxidase – An overview // Biotech. Adv. 2009. Vol. 27. pp. 489–501.
3. Tikhonov B., Sulman E., Stadol'nikova P., Sulman A., Golikova E., Sidorov A., Matveeva V., Immobilized enzymes from the class of oxidoreductases in technological processes: a review // Catalysis in Industry. 2019. Vol. 11. P. 251–263.
4. Schmidt A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow // Nature. 2001. Vol. 409. pp. 258–268.
5. Dong L.C., Wang G., Xiao Y., Xu Y., Zhou X., Jiang H., Luo Q. Immobilization of Glucose Oxidase on a Novel Crosslinked Chitosan Support Grafted with L-Lysine Spacers // Chem. Biochem. Eng. Q. 2011. Vol. 25 (3). P. 395–402.
6. Wang X., Zhu K. – X., Zhou H. – M. Immobilization of Glucose Oxidase in Alginate-Chitosan Microcapsules // Int. J. Mol. Sci. 2011, 12, 3042–3054.
7. Tang L., Yang R., Hua X., Yu C., Zhang W., Zhao W. Preparation of immobilized glucose oxidase and its application in improving breadmaking quality of commercial wheat flour // Food Chemistry. 2014. Vol. 161. P. 1–7.
8. Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сидоров А.И., Сульман Э.М. Метод определения активности глюкозооксидазы // Сборник трудов девятой международной научной конференции «Химическая термодинамика и кинетика, Тверь, 2019, с. 336–337.

УДК 582.26.27

МИКРОВОДОРОСЛИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Д.Д. Белова[1], В.Ф. Долганюк[1], О.О. Бабич[1,2], С.А. Сухих[1,2], Д.С. Кацеров[1]

[1] Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия
[2] Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

Микроводоросли – это группа автотрофных микроорганизмов, обитающих в морских, пресноводных и почвенных экосистемах, вырабатывающих органические вещества в процессе фотосинтеза [1]. Микроводоросли богаты питательными и биологически активными веществами, такими как белки, углеводы, липиды, полиненасыщенные жирные кислоты, витамины, пигменты, ферменты, фикобилипротеины и др. Биологически активные вещества из микроводорослей способны проявлять антиоксидантное, антибактериальное, противовирусное, противоопухолевое, регенеративное, антигипертензивное, нейропротективное и иммуностимулирующее действие [2]. Так, специфические полисахариды микроводорослей (глюканы) могут активировать иммунную систему или оказывать антиоксидантное и гипохолестеринемическое действие. Липиды микроводорослей включают полиненасыщенные жирные кислоты и способны оказывать противовоспалительное и нейропротекторное действие. Пептиды микроводорослей могут связывать или ингибировать специфические рецепторы при сердечно-сосудистых и онкологических заболеваниях. Каротиноиды микроводорослей проявляют высокое антиоксидантное действие. Данные соединения находят спрос в фармакологии, медицине, косметологии, пищевой промышленности, рыбоводстве, энергетике, сельском хозяйстве, при производстве кормов и функциональных продуктов питания [3].

Только несколько видов микроводорослей (Arthrospira (Spirulina) platensis, Chlorella или Chlorella vulgaris, Dunaliella, Aphanizomenon и Nostoc) разрешены для употребления человеком в пищу. Данные микроводоросли являются перспективным объектом для крупномасштабного культивирования из-за высокого содержания биологически активных веществ и сравнительно дешевого процесса производства. Другие виды микроводорослей, такие как Chlamydomonas sp., Chlorococcum sp., Scenedescmus sp., Tetraselmis chuii, Nanochloropsis sp. зарекомендовали себя, как источник полезных компонентов в аквакультуру, корма, удобрения и косметические средства, пока не имеют статус GRAS [4]. Поиск новых штаммов микроводорослей, которые еще не были изучены, может расширить область их промышленного применения и открыть новые перспективы использования.

В связи со всем вышесказанным актуальным направлением исследований является поиск комплексных технологий культивирования микроводорослей с целью выделения из биомассы различных биологически ценых веществ для повышения рентабельности водорослевых производств. Для реализации такого рода разработок необходимо, чтобы высокая производительность промышленных систем культивирования сопровождалась возможностью управления биосинтезом ценных в биотехнологическом отношении соединений в условиях интенсивного роста культуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований 19–316–60001\19 от 22.08.2019.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев, В.В. Микроводоросли для производства энергетической биомассы и топлива / В.В. Воробьев, Ю.А. Кожевников, Ю.М. Щекочихин // Инновации в сельском хозяйстве. – 2015. – № 2 (12). – С. 235–243.
2. Evaluation of Several Microalgal Extracts as Bioactive Metabolites as Potential Pharmaceutical Compounds / C. Gürlek, Ç. Yarkent, A. Köse et al. // International Conference on Medical and Biological Engineering. – Banja Luka, 2019. – P. 267–272.
3. Семочкина, М.А. Развитие альгобиотехнологий в странах Евросоюза / М.А. Семочкина, О.Н. Скоробогатова // Изучение взаимосвязи окружающей среды и здоровья человека с использованием опыта европейского союза: сб. науч. работ. – Нижневартовск, 2018. – С 47–60.
Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review / M. Rizwan, G. Mujtaba, S.A. Memon et al. // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2018. – Vol. 92. – P. 394–404

УДК 66.061.34:577.19

МОДЕЛИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ОБОГАЩЕННЫХ АНТИОКСИДАНТАМИ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ЯБЛОК НА ОСНОВЕ НЕИОНОГЕННЫХ ЭМУЛЬГАТОРОВ

Л.Н. Скрыпник, А.Е. Новикова

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, Россия

Яблоки относятся к наиболее потребляемым во всем мире фруктам и являются ценным источником биологически активных соединений, таких как флавоноиды, фенольные кислоты, каротиноиды, минеральные элементы и витамины [1]. В мире ежегодно производится около 70 миллионов тонн яблок [2], значительное количество (около 30 %) которых подвергается промышленной переработке, главным образом для производства соков. Во время этого процесса накапливается большой объем твердых остатков, состоящий в основном из кожуры, семян и мякоти, которые в совокупности известны как «яблочный жмых», который в среднем составляет приблизительно 25–30 % от веса свежих фруктов [3]. Использование этих отходов для производства ценных биопродуктов имеет как экономическое, так и экологическое значение. В настоящее время разрабатываются различные варианты использования отходов переработки яблок. Например, яблочный жмых можно использовать в качестве субстрата для микробиологического производства карбоновых кислот, ферментов, биотоплива, биополимеров и для непосредственного извлечения из них биологически активных соединений, например, полифенолов, обладающих выраженным антиоксидантным действием [4]. Полифенолы преимущественно локализованы в кожуре яблок и, следовательно, их большая часть остается в яблочном жмыхе [5]. В настоящее время для экстракции полифнолов и антиоксидатнов из отходов переработки яблок используются различные методы, как традиционные – мацерация, перемешивание, встряхивание [6], так и современные методы, относящиеся к методам «зеленой химии» – экстракция с помощью ультразвука, микроволновая экстракция, сверхкритическая флюидная экстракция [7]. Одним из перспективных направлений в экстракции полифенолов и других водорастворимых антиоксидантов из растительных объектов является мицеллярная экстракция, основанная на использовании в качестве экстрагентов растворов поверхностно-активных веществ. Ранее в ряде исследований было показано, что использование ПАВ (особенно неионогенных) повышает эффективность экстракции полифенолов из различных объектов растительного происхождения [8–10].

Цель исследования – оптимизация процесса мицеллярной экстракции антиоксидантов из отходов переработки яблок с использованием статистического плана Бокса-Бенкена.

В качестве объекта исследования использовали высушенный до постоянного веса при 60 °С и измельченных жмых яблок сорта Чемпион. Для проведения экстракции навеску яблочного жмыха (200 мг) помещали в пробирку типа «Фалькон», добавляли соответствующий объем экстрагента (8–24 мл) с концентрацией ПАВ от 0,1 до 1,9 % и pH от 2,0 до 6,0. В качестве ПАВ в данном исследовании использовался Твин-80 (синоним Полисорбат-80). Экстракция осуществлялась в течение определённого времени (от 40 до 80 минут) при постоянном перемешивании (Multi Bio RS-24, Biosan, Латвия). Исследуемые диапазоны параметров экстракции были подобраны в предварительных однофакторных экспериментах. После экстракции смесь центрифугировали при 6000g в течение 30 минут, супернатант использовали для анализа. Эффективность экстракции антиоксидантов оценивали по способности полученных экстрактов восстанавливать радикал 2,2 – дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) спектрофотометрическим методом согласно [11].

Таблица 1 – Переменные факторы и уровни их варьирования

Обозначение фактора	Фактор	Уровни		
		–1	0	+1
X_1	Концентрация ПАВ, %	0,1	1,0	1,9
X_2	Время, мин	40	60	80
X_3	Модуль, мл/г	40	80	120
X_4	pH	2,0	4,0	6,0

Дизайн эксперимента проводили по статистическому 3-х уровневому 4-х факторному плану Бокса-Бенкена с использованием программного обеспечения Minitab 19 (MINITAB Inc., США). Бокс-Бенкен дизайн относится к группе методов, основанных на расчёте поверхностей отклика и позволяющих проводить исследования по оптимизации условий с наименьшим количеством экспериментов по сравнению с другими статистическими подходами [12]. Переменные факторы и уровни их варьирования при экстракции антиоксидантов представлены в таблице 1.

Экспериментальный план состоял из 27 опыта с тремя центральными точками. Каждый опыт проводили в трех повторностях. В таблицах и на рисунках приведены средние значения антиоксидантной активности, выраженные на грамм сухого веса яблочного жмыха.

В результате проведенного исследования получены регрессионные уравнения зависимости концентрации антиоксидантов (Y) от факторов экстракции (X_1-X_4 согласно таблице 1):

$$Y = -4.996 + 0.958 \cdot X_1 + 0.1356 \cdot X_2 + 0.04223 \cdot X_3 + 0.5214 \cdot X_4 - 0.5802 \cdot X_1 \cdot X_1 - 0.001134 \cdot X_2 \cdot X_2 - 0.000223 \cdot X_3 \cdot X_3 - 0.06656 \cdot X_4 \cdot X_4 + 0.00861 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0.00062 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0.0639 \cdot X_1 \cdot X_4 + 0.000006 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0.000125 \cdot X_2 \cdot X_4 + 0.000750 \cdot X_3 \cdot X_4$$

С помощью этого уравнения были получены расчетные значения выхода антиоксидантов в процессе экстракции при заданных параметрах. Сравнение экспериментального и расчетного отклика было проведено с помощью коэффициента детерминации R^2, а также значения $P_{lack\text{-}of\text{-}fit}$. Коэффициент детерминации R^2 показывает корреляцию данных, полученных по уравнению, с данными, которые были получены экспериментально. $P_{lack\text{-}of\text{-}fit}$ в свою очередь показывает соответствие экспериментальных данных своей математической модели. Если $P_{lack\text{-}of\text{-}fit}$ принимает значения больше 0,05, то опытные данные соответствуют проверяемой модели. Значения R^2 равное 0,9857 (рис. 1) и $P_{lack\text{-}of\text{-}fit}$ равное 0,15 подтверждают соответствие данных математической модели и ее возможность объяснить 98,57 % дисперсии.

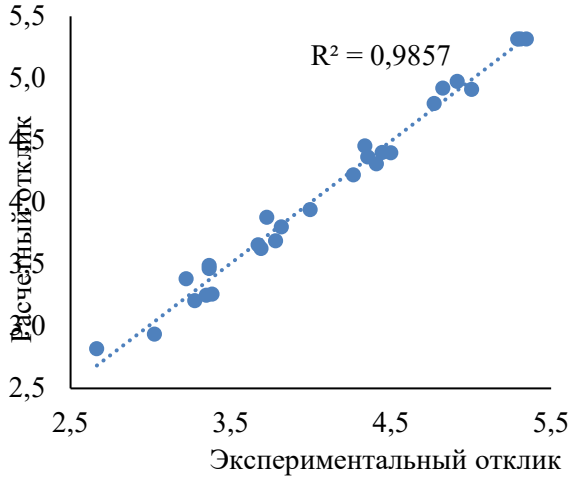


Рисунок 1 – Корреляция экспериментальных и расчетных данных экстракции антиоксидантов из яблочного жмыха

На основе уравнений регрессии построены поверхности отклика, которые представлены на рисунке 2.

Исходя из полученного уравнения регрессии и поверхностей отклика, были рассчитаны оптимальные условия мицеллярной экстракции антиоксидантов из яблочного жмыха: концентрация Твин-80–1,1 %; время – 64 мин; модуль – 1:100; pH 3,9.

Для подтверждения эффективности мицеллярной экстракции при извлечении антиоксидантов были проведены контрольные эксперименты, в которых в качестве экстрагента использовали 60 % раствор метанола, который согласно литературным данным наиболее часто применяется для экстракции антиоксидантов из растительного сырья. В результате данных опытов было установлено, что антиоксидантная активность экстрактов, полученных с использованием Твин-80 была в 1,6–1,8 раз выше.

Проведенные нами исследования показали, что одним из возможных путей интенсификации процесса экстракции биологически активных компонентов с антиоксидантным действием из растительного сырья является использование в качестве растворителей водных растворов поверхностно-активных веществ. Полученные нами результаты согласуются с проведенными ранее исследованиями, в которых была показана эффективность использования ПАВ для выделения фитокомпонентов различной химической природы, в частности полисахаридов, лектинов, алкалоидов, антрахинонов, изофлавонов, гидроксикоричных кислот, суммы фенольных соединений и антиоксидантов [13–15]. Несмотря на то, что ряд авторов придерживается мнения, что поверхностно-активные вещества являются «эко-дружелюбными» [13, 15], многие из этих соединений все-таки являются опасными для здоровья человека и окружающей среды [16]. В связи с тем, что получаемые из отходов переработки яблок экстракты с высоким содержанием антиоксидантов предполагается использовать в пищевой, косметической и / или фармацевтической промышленности в данной работе в качестве возможных растворителей изучали водные растворы Твин-80. Данное соединение активно используются в пищевой промышленности в качестве эмульгатора, в частности Твин-80 является допустимой пищевой добавкой (Е433) и разрешен к использованию на территории России и Евросоюза. Предложенная технология экстракции с использованием водного раствора Твин-80 в качестве растворителя позволяет получать экстракты с высоким содержанием антиоксидантов, которые подходят для применения в пищевых, косметических и фармацевтических продуктах, требующих одновременного наличия в своем составе как антиоксидантов, так и эмульгаторов для их стабилизации.

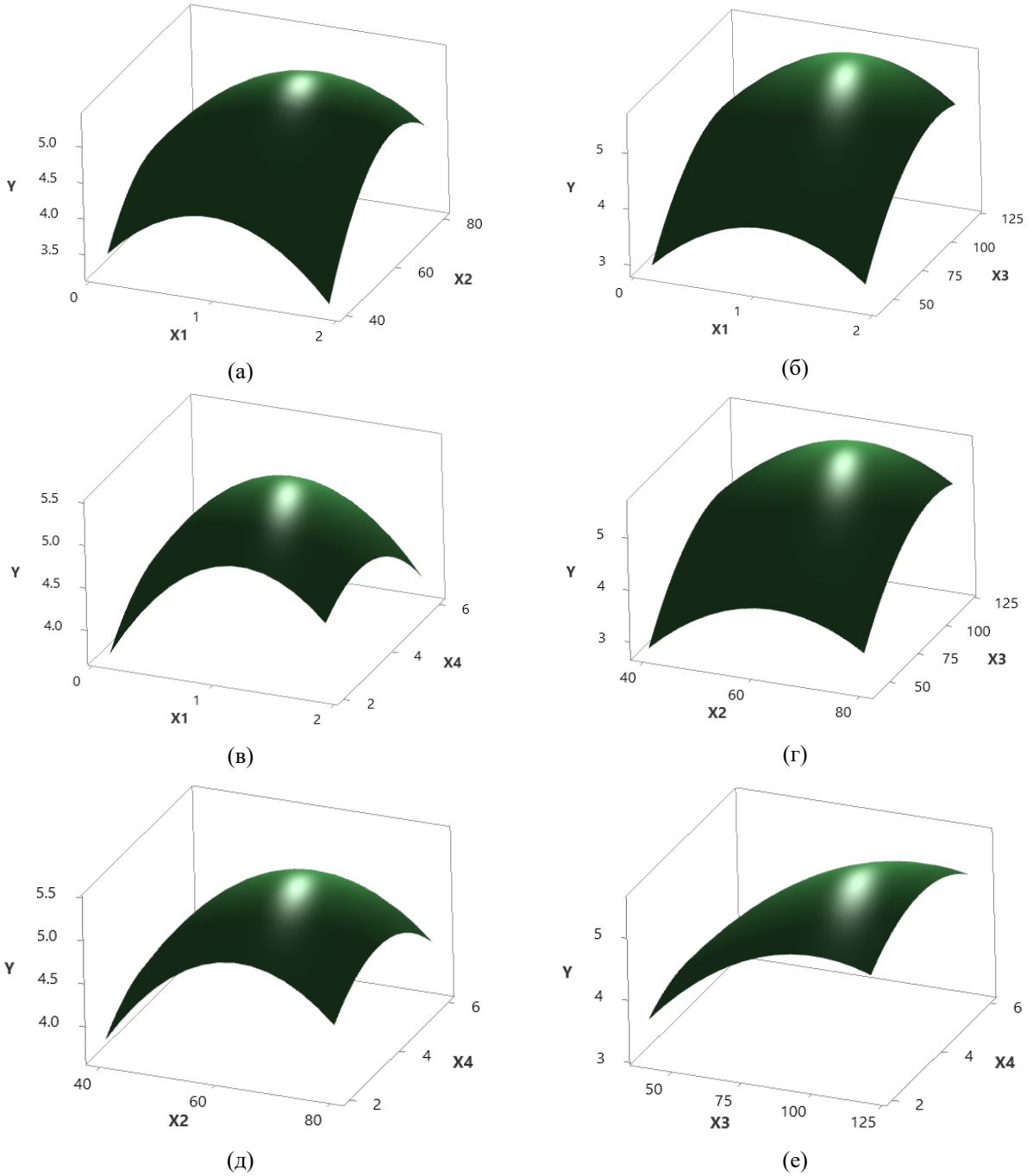


Рисунок 2 – Поверхности отклика, описывающие зависимость антиоксидантной активности экстрактов (Y) от исследуемых параметров: (а) концентрации Твин-80 (%) и времени (мин), (б) концентрации Твин-80 (%) и модуля (мл/г), (в) концентрации Твин-80 (%) и pH, (г) времени (мин) и модуля (мл/г), (д) времени (мин) и pH, (е) модуля (мл/г) и pH

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что применение мицеллярной экстракции с использованием в качестве растворителя водного раствора Tween 80 позволяет эффективно экстрагировать антиоксиданты из яблочного жмыха без использования дополнительного оборудования (ультразвуковых, микроволновых установок) с сопоставимым выходом целевого продукта. При этом полученное в ходе работы регрессионное уравнение экстракционного процесса, показывающее количественное влияние каждого фактора на выход антиоксидантов в процессе экстракции, позволяет управлять этим процессом и добиваться наибольшей эффективности.

Исследование было поддержано в рамках реализации Программы повышения конкурентоспособности БФУ им. И. Канта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Malinowska M., Śliwa K., Sikora E., Ogonowski J., Oszmiański J., Kolniak-Ostek J. Ultrasound-assisted and micelle-mediated extraction as a method to isolate valuable active compounds from apple pomace // J. Food Process. Preserv. 2018. Vol. 42. e13720.
2. Massias A., Boisard S., Baccaunaud M., Calderon F.L., Subra-Paternault P. Recovery of phenolics from apple peels using CO2+ ethanol extraction: Kinetics and antioxidant activity of extracts // J. Supercrit. Fluids. 2015. Vol. 98. P. 172–182.
3. Cargnin S.T., Gnoatto S.B. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties // Food Chem. 2017. Vol. 220. P. 477–489.
4. Yates M., Gomez M.R., Martin-Luengo M.A., Ibañez V.Z., Serrano A.M.M. Multivalorization of apple pomace towards materials and chemicals. Waste to wealth // J. Cleaner Prod. 2017. Vol. 143. P. 847–853.
5. Skinner R.C., Gigliotti J.C., Ku K.M., Tou J.C. A comprehensive analysis of the composition, health benefits, and safety of apple pomace // Nutr. Rev. 2018. Vol. 76. P. 893–909.
6. Candrawinata V.I., Golding J.B., Roach P.D., Stathopoulos C.E. Optimisation of the phenolic content and antioxidant activity of apple pomace aqueous extracts // CyTA-J. Food. 2015. Vol. 13. P. 293–299.
7. Zhang Z., Poojary M.M., Choudhary A., Rai D.K., Tiwari B.K. Comparison of selected clean and green extraction technologies for biomolecules from apple pomace // Electrophoresis. 2018. Vol. 39. P. 1934–194.
8. Sharma S., Kori S., Parmar A. Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices // Food Chem. 2015. Vol. 185. P. 284–288.
9. Cortés-Rojas D.F., Souza C.R.F., Oliveira W.P.D. Surfactant mediated extraction of antioxidants from Syzygium aromaticum // Sep. Sci. Technol. 2015. Vol. 50. P. 207–213.
10. Skrypnik L., Novikova A. Response Surface Modeling and Optimization of Polyphenols Extraction from Apple Pomace Based on Nonionic Emulsifiers // Agronomy. 2020. Vol. 10. 92.
11. Feduraev, P., Chupakhina, G., Maslennikov, P., Tacenko, N., Skrypnik, L. Variation in Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Different Plant Organs from Rumex crispus L. and Rumex obtusifolius L. at Different Growth Stages // Antioxidants. 2019. Vol. 8. 237.
12. Jeganathan P.M., Venkatachalam S., Karichappan T., Ramasamy S. Model development and process optimization for solvent extraction of polyphenols from red grapes using Box–Behnken design // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2014. Vol. 44. N. 1. P. 56–67.
13. Ziyatdinova G., Ziganshina E., Cong P.N., Budnikov H. Ultrasound-assisted micellar extraction of phenolic antioxidants from spices and antioxidant properties of the extracts based on coulometric titration data // Analytical Methods. 2016. Vol. 8. N. 39. P. 7150–7157.
14. He S., Shi J., Walid E., Ma Y., Xue S.J. Extraction and purification of a lectin from small black kidney bean (Phaseolus vulgaris) using a reversed micellar system // Process Biochem. 2013. Vol. 4. P. 746–752.
15. Takla S.S., Shawky E., Hammoda H.M., Darwish F.A. Green techniques in comparison to conventional ones in the extraction of Amaryllidaceae alkaloids: Best solvents selection and parameters optimization // J. Chromatogr. A. 2018. 1567. 99–110.
16. Lechuga M., Fernández-Serrano M., Jurado E., Núñez-Olea J., Ríos F. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2016. Vol. 125. P. 1–8.

УДК 58.085

АППАРАТУРНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК IN VITRO PHLOJODICARPUS SIBIRICUS (STEPH. EX SPRENG.) K. – POL.

М.Т. Ханды[1,2], А.Г. Клюшин[3], С.В. Томилова[3,4], А.М. Носов[3,4]

[1] ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия
[2] Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Россия
[3] Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия
[4] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

При быстром темпе развития науки и техники в XXI веке, важно обеспечить сохранность окружающей природной среды для будущих поколений. В связи с этим остро встает вопрос об оптимальном использовании растительных ресурсов – в условиях активного применения ценных видов растений, обеспечить сохранение их естественных ареалов. С этой точки зрения актуальны работы по исследованию культур клеток высших растений, синтезирующих ценные вторичные метаболиты и возможности их аппаратного выращивания Данная технология позволяет получить возобновляемое растительное сырье и имеет ряд преимуществ, основным из которых является радикальное снятие проблемы его дефицита. Кроме того, становится возможным получение биомассы культур клеток и тканей редких и исчезающих видов растений, при этом, получаемое сырье стандартно, полностью свободно от всех видов поллютантов. Все это делает исследования в области культур клеток высших растений крайне востребованными и актуальными.

Вздутоплодник сибирский (Phlojodicarpus sibiricus (Steph. ex Spreng.) K. – Pol.) – эндемик Сибири и Дальнего Востока, ценное лекарственное растение. Корни Ph. sibiricus используют для профилактики и лечения сердечнососудистых заболеваний, некоторых неврологических расстройств, нарушений функций желудка и легких [1]. Лечебные свойства Ph. sibiricus обусловлены содержанием фенольных соединений, а именно пирано- и гидроксикумаринов. Вздутоплодник сибирский использовали при производстве препаратов спазмолитического действия «Димидин» и «Фловерин», а также комплексного препарата сердечно-сосудистого действия «Сафинор». В настоящее время производство названных препаратов приостановлено из-за отсутствия сырья.

В 2019 году авторами были получены каллусные и суспензионные культуры Ph. sibiricus [2], как потенциальные источники редких и новых фенольных соединений. Целью настоящей работы было изучить возможность эффективного аппаратного культивирования клеток вздутоплодника сибирского на основании анализа физиологических показателей в процессе выращивания в двух типах биореакторов.

В качестве объекта исследования использовали суспензионную культуру клеток вздутоплодника сибирского, полученную из каллусов листового происхождения [2].

Для выращивания клеток использовали жидкую питательную среду Мурасиге и Скуга (MS), приготовленную по прописи [3] с добавлением инозитола (0,1 г/л), 3 % сахарозы и регуляторов роста – 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4 – Д) (1,0 мг/л) и 6-бензиламинопурина (БАП) (0,5 мг/л) (Merck, Германия).

Культивирование проводили в биореакторах с различным типом перемешивающего устройства:

1) Микробиологический биореактор с механической мешалкой, общим объемом 7,5 л (New Brunswick, модель MF-107). Перемешивающее устройство – типа «морской винт» (100 об/мин).

2) Барботажный соплоконусный биореактор, общим объемом 21 л (собственная разработка лаборатории биологии культивируемых клеток ИФР РАН). Перемешивающее устройство – барботер с одним отверстием диаметром 6 мм.

В обоих аппаратах использовали одинаковый тип трубчатого аэратора с микроотверстиями для мелкодисперсной подачи воздуха в питательную среду. Скорость подачи воздуха для аэрации – от 0,17 до 0,25 л на 1 л питательной среды в минуту (постепенно повышается из-за уменьшения объёма суспензии после отбора проб, в случае барботажного биореактора – это сумма воздуха на барботаж и аэрацию вместе взятые).

Для инокуляции в биореакторы использовали двухнедельную культуру, выращенную в колбах. Исходная плотность сухой биомассы составляла около 0,5–1 г./л. Культивирование проводили при температуре 26±0,1 °С в темноте.

Жизнеспособность культур определяли с помощью окрашивания клеток прижизненным красителем феносафранином (0,1 %-ный раствор) (Merck, Германия) путем подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом. Для определения сухой биомассы в 1 л среды фиксированный объем суспензии (не менее 10 мл в двух биологических повторностях) фильтровали под вакуумом через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера [4]. Биомассу высушивали в сушильном шкафу при 50 °С в течение 24 часов.

На основании полученных результатов рассчитывали параметры роста суспензионных культур клеток, такие как индекс роста (I), удельная скорость роста (μ), время удвоения биомассы (τ), максимальное накопление сухой биомассы (M_{max}), экономический коэффициент (Y), продуктивность по биомассе (P).

Для расчетов использовали следующие формулы [4]:

$I = X_{max}/ X_o$, $\mu\ (сут^{-1}) = \ln X_2 - \ln X_1)/(t_2-t_1)$, $\tau\ (сут) = \ln 2 / \mu$.

$Y = (X_{max} – X_o) / S_o$, $P\ (г/л \times сут) = (X_i – X_o) / (t_i – t_o)$,

где X_{max}и X_o – максимальное и начальное значения критерия роста соответственно (сухая биомасса, сырая биомасса, концентрация клеток); X_2 и X_1 – значения критерия роста (концентрация клеток, содержание сырой / сухой биомассы в литре среды) в момент времени t_2 и t_1, соответственно (рассчитывается для экспоненциальной фазы роста); X_{max}и X_o – максимальная и начальная концентрации сухой биомассы (г/л), соответственно; S_o – начальная концентрация субстрата (сахарозы) в среде (г/л среды); X_oи X_i – количество сухой биомассы в начале культивирования и в момент времени t_i соответственно.

Для сравнительного анализа при аппаратурном выращивании было проведено определение минимальной плотности, при которой культура может быть культивирована. Исходная плотность биомассы при выращивании суспензионной культуры клеток высших растений влияет на многие показатели роста. Поэтому для каждой культуры важно определить границы значений, при которых в периодическом двухнедельном режиме выращивания наблюдается устойчивый рост без ухудшения ростовых и биосинтетических характеристик. При выращивании культуры клеток вздутоплодника сибирского в колбах было использовано значение около 1 г/л сухой биомассы [2]. При аппаратном выращивании культуры возможно негативное воздействие на клетки систем перемешивания и аэрации, особенно для биореакторов с механическим типом перемешивания. Это вызывает необходимость оптимизации начальной плотности культуры, что было проведено для выращивании полученной суспензионной культуры клеток Phlojodicarpus sibiricus в биореакторе MF-107.

Использовали два значения начальной плотности клеток – 0,5 и 1 г/л. При плотности 0,5 г/л наблюдали снижение жизнеспособности культуры с 65–70 % до 55 % на протяжении первых двух суток, а затем резкое понижение до 10–11 % на 4 сутки. При этом было равномерное снижение плотности сухой биомассы с 0,5–0,55 до 0,3 г/л. Далее культивирование при этой плотности прекратили. При значении 1 г/л на 3 сутки было небольшое снижение жизнеспособности с 65–70 % до 60–65 %, при этом уменьшилась плотность сухой биомассы с 1,15 до 1,1 г/л. Затем началось увеличение плотности до 8,9 г/л на 24 сутки при сохранении жизнеспособности 60–65 %. Таким образом, начальную плотность в районе 1 г/л можно считать оптимальной для этого типа биореактора. Для сравнения, с этой же начальной плотностью было проведено выращивание культуры клеток вздутоплодника сибирского в барботажном биореакторе. В этом случае снижения плотности биомассы обнаружено не было и жизнеспособности клеток постоянно сохранялась на уровне 65–70 %.

Следующим этапом работ было, исследование ростовых характеристик культур клеток при выращивании в биореакторах. Из полученных результатов следует, что аппаратурное выращивание клеток в барботажном биореакторе приводит к стабильному росту культуры с длительностью лаг-фазы около 3-х суток и улучшению ее основных ростовых показателей относительно колб (индекс роста по сухой биомассе I = 12,7; максимальное накопление сухой биомассы M = 15,8 г/л на 24 сутки культивирования, удельная скорость роста по сухой биомассе – 0,18, продуктивность по сухой биомассе P = 0,78 г./(л×сут), экономический коэффициент Y = 0,49). Напротив, при использовании биореактора с механическим перемешиванием отмечено ухудшение ростовых параметров (индекс роста по сухой биомассе – 7,6; удельная скорость роста по сухой биомассе – 0,13 сут-1; максимальное накопление сухой биомассы – 8,9 г/л.).

Снижение ростовых показателей при их выращивании в биореакторах с механическим типом перемешивания были получены ранее при работе с культурами клеток других видов (диоскореи Dioscorea deltoidea Wall., женьшеня Panax japonicus var repens, стефании Stephania glabra Roxb [5, 6]). При этом улучшение ростовых характеристик в барботажном биореакторе предположительно связано с улучшением аэрации клеток, а ухудшение роста при использовании биореактора с механическим перемешиванием – с повреждающим действием на клетки перемешивающих устройств. Полученные результаты свидетельствуют, что при аппаратурном культивировании суспензионной культуры клеток Ph. sibiricus предпочтительной системой ожидаемо оказался барботажный биореактор.

Таким образом, впервые проведено успешное выращивание клеток in vitro Ph. sibiricus в лабораторных биореакторах различной конструкции и оптимизированы условия аппаратурного выращивания этой культуры с достаточно высокими ростовыми характеристиками.

Работы выполнены при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки России (FSRG-2020–0019).

ЛИТЕРАТУРА

1. Olennikov D.N., Fedorov I.A., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Vennos C. Khellactone Derivatives and Other Phenolics of Phlojodicarpus sibiricus (Apiaceae): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS/MS and HPLC-UV Profile, and Antiobesity Potential of Dihydrosamidin // Molecules. 2019. V. 24 I. 12. P. 2286. doi 10.3390/molecules24122286
2. Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Томилова С.В., Галишев Б.А., Клюшин А.Г., Носов А.М. Получение и фитохимический скрининг каллусных и суспензионных культур клеток вздутоплодника сибирского Phlojodicarpus sibiricus (Steph. ex Spreng.) K. – Pol. / Биотехнология. 2020. В печати
3. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. V.15. P.473–497.
4. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Ред. Вл. В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: БИНОМ, 2012. С. 386–403.
5. Titova M.V., Shumilo N.A., Kulichenko I.E., Ivanov I.M., Sukhanova E.S., Nosov A.M. Features of respiration and formation of steroidal glycosides in Dioscorea deltoidea cell suspension culture grown in flasks and bioreactors // Russian Journal of Plant Physiology. 2015. V. 62. № 4. P. 557–563. doi 10.1134/S1021443715040160
6. Titova M.V., Reshetnyak O.V., Osipova E.A., Shumilo N.A., Oreshnikov A.V., Osip'yants A.I., Nosov A.M. Submerged cultivation of Stephania glabra (Roxb.) Miers cells in different systems: Specific features of growth and accumulation of alkaloid stepharine // Applied Biochemistry and Microbiology. 2012. V. 48. № 7. P. 645–649. doi 10.1134/S0003683812070046

УДК 579.61

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАЦИЛЛ: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ И ИХ ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ

Е.А. Анисимова, И.В. Горохова, Г.Р. Каримуллина, Д.Р. Яруллина

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Бактерии рода Lactobacillus входят в состав естественной микробиоты кишечника человека, где выполняют ряд полезных для здоровья функций [1]. Данная особенность обусловила их широкое применение в пробиотиках и продуктах функционального питания. Бактерии этой группы имеют статус GRAS (Generally Regarded As Safe) и включены в список QPS (Qualified Presumption of Safety) Евросоюза [2], поэтому без ограничения используются в пищевой и фармацевтической промышленности. Тем не менее, показано, что используемые в пробиотикотерапии устойчивые к антибиотикам бактерии потенциально могут служить источником распространения генов антибиотикорезистентности, если последние локализованы на плазмидах и транспозонах. Так, у лактобацилл выявлены гены устойчивости к тетрациклину tetW, tetM, tetS, tetO, tetQ, tetK, tetL [3] и описана их потенциальная мобильность [4, 5]. Также обнаружен ряд генов устойчивости к эритромицину ermB, ermA, ermC, erm(T) [4–7] и доказана возможность их конъюгативного переноса [3, 4]. Поэтому целью работы являлось выявление генетических детерминант устойчивости к клинически распространенным антибиотикам у потенциально пробиотических штаммов лактобацилл и анализ их мобильности.

У 72 штаммов лактобацилл, выделенных нами ранее из фекалий человека, кисломолочных продуктов, растительного материала и пробиотических препаратов, диско-диффузионным методом оценили устойчивость к 25 клинически распространенным антибиотикам. Мы показали, что большинство штаммов лактобацилл проявляли чувствительность к ингибиторам биосинтеза клеточной стенки: карбапенемам (имипенему – 95 % исследованных штаммов, меропенему – 84 %, эртапенему – 74 %) и пенициллинам (ампициллину – 97 % и амоксициллину – 85 %). Для лактобацилл также была характерна чувствительность к рифампицину (91 %), макролидам (кларитромицину – 77 % и эритромицину – 96 %), тетрациклину (83 %), линезолиду (95 %) и хлорамфениколу (96 %). У исследованных штаммов лактобацилл выявили высокий уровень резистентности к ванкомицину (89 %), аминогликозидам: амикацину (100 %), гентамицину (98 %), канамицину (96 %) и стрептомицину (79 %), а также к фторхинолонам: ципрофлоксацину (90 %) и норфлоксацину (95 %). Для исследуемых лактобацилл была характерна устойчивость к цефалоспоринам – цефепиму (96 %), цефтазидиму (95 %), цефтриаксону (89 %), цефотаксиму (84 %), цефоперазону (84 %), цефоперазону/сульбактаму (63 %) и цефазолину (58 %).

С помощью комплекса молекулярно-биологических методов (в том числе секвенирования) в геномах лактобацилл выявили детерминанты устойчивости к ванкомицину (vanX – 75 % исследованных штаммов), стрептомицину (aadA – 1.4 %, aadE – 4 %), эритромицину (ermB – 4 %, ermC – 1.4 %, mefA – 1.4 %), тетрациклину (tetM – 8.3 %, tetK – 11 %, tetL – 4 %), фторхинолонам (parC – 21 %). В геномах 87 % устойчивых к цефалоспоринам бактерий методом ПЦР обнаружен ген blaTEM, кодирующий β-лактамазы расширенного спектра, способные инактивировать цефалоспорины. Наличие гена blaTEM подтверждено секвенированием полученного ПЦР-продукта.

Штаммы лактобацилл, характеризующиеся устойчивостью к тетрациклину и эритромицниу, представляют угрозу в качестве потенциальных источников распространения генов антибиотикорезистентности внутри кишечного микробиома или по трофическим цепям. Поэтому на следующем этапе провели исследования по выяснению природы обнаруженной устойчивости у лактобацилл и способности к ее передаче другим микроорганизмам. По результатам молекулярно-генетического анализа генов антибиотикорезистентности отобрали 6 штаммов лактобацилл для проверки возможности передачи генов устойчивости к тетрациклину и эритромицину условно-патогенным бактериям. У штаммов L. fermentum HF-A1, L. fermentum HF-B1, L. fermentum HF-A4, L. fermentum 3–4, L. fermentum 5–2 гены tetK и tetM находятся на плазмиде, и у всех пяти штаммов наличие данных генов имеет фенотипическое проявление в виде устойчивости к тетрациклину. Бактерии L. fermentum 5–1 обладают плазмидными генами tetK и tetM, но проявляют чувствительность к тетрациклину. В то же время штамм L. fermentum 5–1 несет ген устойчивости к эритромицину ermB.

В качестве потенциальных реципиентов генов erm и tet с помощью метода градиентного агара были отобраны чувствительные к тетрациклину бактерии Citrobacter freundii, Acinetobacter baumannii, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, S. epidermidis и Listeria monocytogenes и чувствительные к эритромицину S. haemolyticus.

Основным механизмом горизонтального переноса генов антибиотикорезистености в природе считается конъюгация. Наиболее распространенным методом изучения мобильности генов антибиотикорезистентности является метод «конъюгации на мембране». Он представляет собой совместную инкубацию клеток донора и реципиента, плотно контактирующих на нитроцеллюлозном фильтре, что повышает способность к конъюгативному переносу генетического материала [8]. В проведенном нами эксперименте «конъюгации на мембране» не происходила передача устойчивости к тетрациклину от лактобацилл к бактериям-реципиентам. Далее мы проверили возможность передачи генов устойчивости к тетрациклину от лактобацилл в процессе трансформации. Известно, что филогенетически далекие друг от друга микроорганизмы в естественных эконишах могут обмениваться генами лекарственной устойчивости посредством трансформации [9]. Поскольку точно неизвестно, какие факторы в природе инициируют переход клеток в состояние компетентности, реципиентные бактерии были подвергнуты электропорации. Проведенная после этого трансформация плазмидной ДНК L. fermentum 5–1 привела к появлению у Citrobacter freundii устойчивости к тетрациклину. Из бактерий-трансформантов, выросших на селективной среде с тетрациклином, выделили ДНК и в ней методом ПЦР детектировали ген tetK размером 278 п.о. Факт того, что чувствительные к тетрациклину бактерии L. fermentum 5–1, несущие гены устойчивости к тетрациклину, могут служить вектором распространения антибиотикорезистентности в микробиоме кишечника, вызывает тревогу. Однако отметим, что при электропорации компетентные клетки создаются искусственно, что повышает вероятность приобретения чужеродного материала реципиентом от донора. Поэтому важно исследовать транспорт генов антибиотикорезистентности не только in vitro, но и in vivo в условиях максимально приближенных к условиям ЖКТ.

Поэтому на завершающем этапе работы проверили возможность передачи генов антибиотикорезистентности от лактобацилл бактериям кишечной микробиоты. Исследование выполнили на мышах, которым в течение двух недель вводили per os смесь из четырех штаммов-доноров генов антибиотикорезистентности: L. fermentum 5–1, L. plantarum AG1, L. paracasei E1 и L. plantarum Act-2. В хромосомной ДНК данных лактобацилл ранее мы обнаружили гены устойчивости к ванкомицину vanX (все штаммы), цефалоспоринам blaTEM (L. paracasei E1, L. plantarum Act-2), ципрофлоксацину parC (L. plantarum Act-2), эритромицину ermB (L. fermentum 5–1, L. plantarum AG1) и тетрациклину tetK (L. paracasei E1). В плазмидной ДНК штамма L. fermentum 5–1 детектировали гены tetK и tetM. Мы показали, что введение мышам лактобацилл-доноров, привело к повышению уровня фенотипической устойчивости к тетрациклину у микробного кишечного сообщества животных. С помощью ПЦР в реальном времени установили, что в метагеномной ДНК, выделенной из фекалий опытных мышей, происходило увеличение количества гена tetM, не связанное с размножением введенных лактобацилл. Распространение генов устойчивости к эритромицину (ermB), ванкомицину (vanX), ципрофлоксацину (parC), стрептомицину (aadE) и генов, кодирующих b-лактамазы расширенного спектра действия (blaTEM), от лактобацилл в микробном сообществе толстого кишечника не происходило.

Таким образом, в данной работе мы показали, что чувствительные к тетрациклину бактерии L. fermentum 5–1, несущие гены устойчивости tetM и tetK на плазмидной ДНК, могут служить потенциальными векторами накопления и распространения генов антибиотикорезистентности в микробном сообществе ЖКТ. Практическое применение таких штаммов лактобацилл в пищевой отрасли и в пробиотикотерапии недопустимо, поскольку является опасным с позиций распространения устойчивости к антимикробным препаратам, что, по современным оценкам, представляет собой одну из самых серьезных угроз глобальной национальной безопасности. В связи с вышесказанным, отбор штаммов микроорганизмов для конструирования пробиотиков должен включать проверку их антибиотикорезистентности, а при ее выявлении – анализ мобильности генетических детерминант данного признака. Такой новый подход к скринингу штаммов позволит не допустить распространения антибиотикорезистентности среди патогенных микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17–00–00456 и 18–34–00268 в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ с использованием оборудования Междисциплинарного ЦКП КФУ для обеспечения клеточных, геномных и постгеномных исследований в Приволжском регионе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Giraffa G., Chanishvili N., Widyastuti Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology // Res. Microbiol. 2010; 161(6):480–487.
2. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update), // EFSA J. 2012; 10(12):3020.
3. Gueimonde M., Sánchez B., et al Antibiotic resistance in probiotic bacteria // Front Microbiol. 2013; 4: 202.
4. Feld L., Schjorring S., et al A. Selective pressure affects transfer and establishment of a Lactobacillus plantarum resistance plasmid in the gastrointestinal environment //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008; 61: 845 – 852.
5. Zonenschain D., Rebecchi A., Morelli L. Erythromycin – and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages // J Appl Microbiol. 2009; 107(5):1559–68
6. Egervarn M., Roos S., Lindmark H. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in Lactobacillus reuteri and Lactobacillus plantarum // Journal of Applied Microbiology 2009; 107: 1658–1668.
7. Jacobsen L., Wilcks A., et al. Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of Lactobacillus plantarum to Enterococcus faecalis JH2–2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats //FEMS Microbiol. 2007; 59(1):158–66.
8. Gevers D., Huys G., Swings J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from Lactobacillus isolates to other Gram-positive bacteria // FEMS Microbiol Lett 2003; 225:125–130.
9. Domingues S, Harms K, Fricke WF, et al. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes. // PLoS Pathog; 2012; 8(8):e1002837.

УДК 579.6 + 571.27

МЕТОДОЛОГИЯ ИММУНОХИМИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ ЦЕЛЫХ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ И РАСТВОРИМЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ НУЖД БИОТЕХНОЛОГИИ

Е.П. Киселева [1], К.И. Михайлопуло [1], Г.И. Новик [3]

[1] Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
[2] Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

ВВЕДЕНИЕ

Bifidobacterium bifidum, Lactococcus lactis и *Bacillus cereus* широко используются в биотехнологических процессах [1–6], контроль которых требует определения количества клеток, концентрации их компонентов или секретируемых соединений, в зависимости от решаемой задачи. С этой целью успешно используют иммунохимические методы, в частности, метод иммуноферментного анализа (ИФА). Его преимуществами являются высокие специфичность и чувствительность, быстрота и простота, а также доступность реагентов, включая антитела требуемой специфичности, и относительная дешевизна необходимого оборудования.

Цель работы – разработка методологии определения динамики удельной концентрации ($C_{уд}$) (из расчета на клетку) внутриклеточных, секретируемых и локализованных в клеточной стенке (КС) антигенов биотехнологически перспективных бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате иммунизации кроликов целыми клетками *B. bifidum* БИМ В-733 Д, *L. lactis* БИМ В-493Д или *B. cereus* БИМ В-491, лишенными жизнеспособности в ходе лиофилизации, получены соответствующие препараты ПАТ, $ПАТ_{анти\text{-}Bb\ 733D}$, $ПАТ_{анти\text{-}Ll\ 493D}$, $ПАТ_{анти\text{-}Bc\ 491}$, соответственно. Установлено, что $ПАТ_{анти\text{-}Bb\ 733D}$, $ПАТ_{анти\text{-}Ll\ 493D}$, $ПАТ_{анти\text{-}Bc\ 491}$ взаимодействуют с внутриклеточными, секретируемыми и локализованными в КС антигенами большинства штаммов бактерий, используемых в качестве иммуногенов, а также с гомологичными антигенами других видов бактерий тех же родов [7–9].

С использованием трех препаратов родоспецифичных ПАТ в качестве базовых реагентов разработана методология исследования динамики синтеза и секреции антигенов бактерий [10–12]. Методология включает следующие этапы: *1. выбор микроорганизмов в качестве объектов исследования*. Таковыми могут являться только штаммы бактерий, содержащие антигены, гомологичные антигенам штамма-иммуногена. Присутствие таких антигенов подтверждают на основании определения значений перекрестной реакции с используемыми антителами; значения перекрестной реакции должны быть не менее 10 %; *2. критерии количественной оценки препаратов, являющихся источником антигенов*. Такими препаратами являются бесклеточная фракция (БФ), культуральная жидкость (КЖ) и КС, где БФ – супернатант, полученный в результате разрушения клеток ультразвуком и осаждения КС, а КЖ – культуральная среда после роста бактерий и последующего осаждения клеток. Распределение антигенов между БФ, КС и КС зависит от стадии роста культуры [10]. Количественная оценка препаратов включает (1) расчет общей нуклеиновой кислоты (НК) в БФ; НК (усл. ед.) = $A_{260\ нм,\ 1\ см}$ (единицы адсорбции) × объем БФ (мл); значение параметра пропорционально числу клеток бактерий; (2) определение веса КС, (мг); значение параметра является функцией числа клеток бактерий и толщины КС; *3. определение концентрации антигенов методом ИФА и расчет $C_{уд}$ антигенов* (рисунок); *4. интерпретация результатов, основанная на сравнении динамики концентрации НК и совокупного веса КС в культуре бактерий с динамикой $C_{уд}$ антигенов*. Например, увеличение антигенов во внешней среде может быть следствием (*1*) первичной секреции (ПС), т. е. секреции антигенов, выполняющих свою биологическую функцию вне клетки, (*2*) вторичной секреции (ВС), т. е. перехода в раствор части компонентов КС по мере старения культуры, (*3*) гибели клеток (ГК) в поздней стационарной фазе. ПС может происходить в следующих условиях: НК ↑, КС const или НК const, КС ↑. ВС происходит в следующих случаях: НК const, КС ↓ или НК ↑, КС ↓. Снижение количества общей НК указывает на ГК (или образование спор, в случае бацилл), но не исключает ВС как вторую возможную причину увеличения антигенов во внешней среде [11].

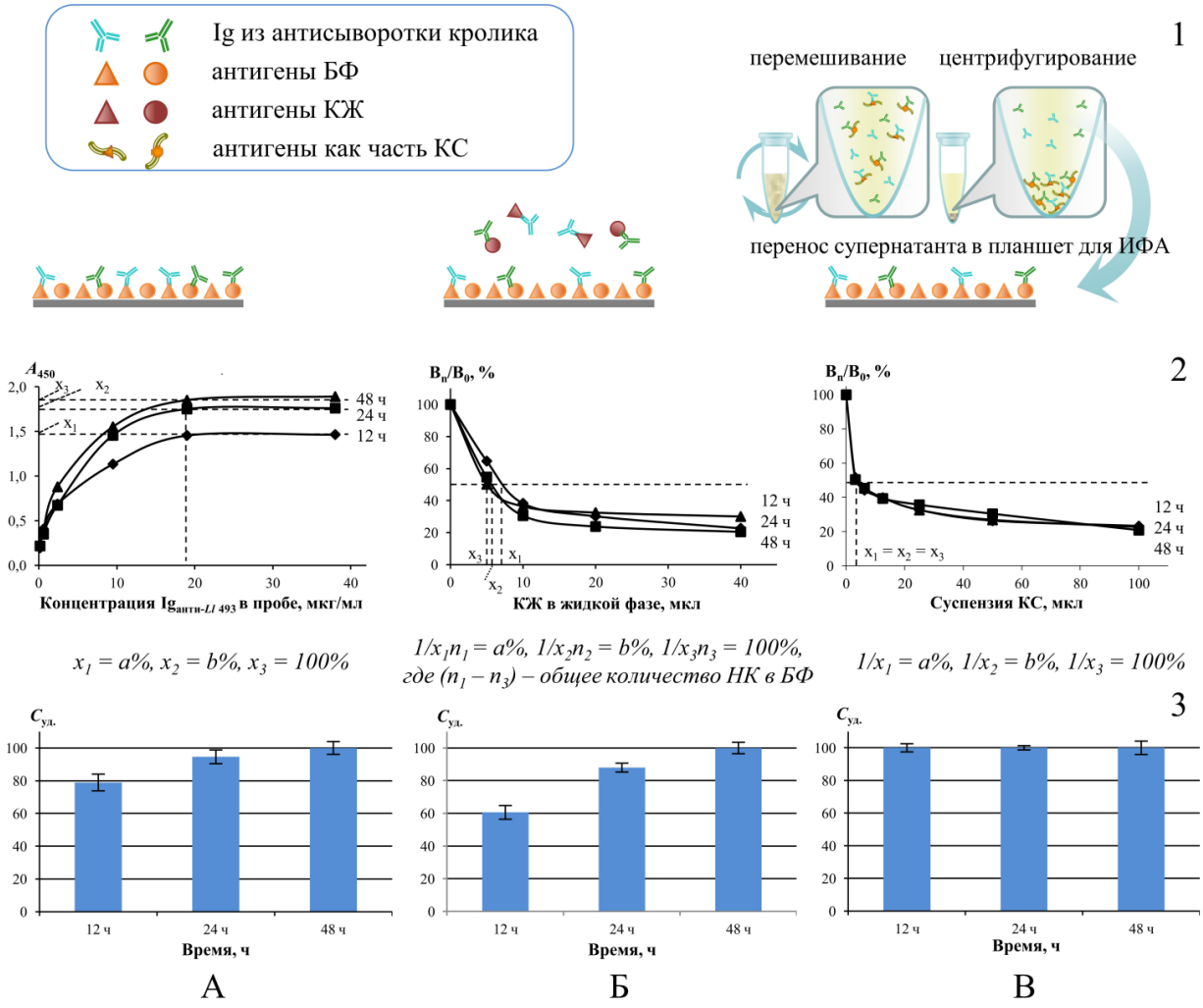


Рисунок 1. Схема ИФА (1), типичные результаты (2) и расчет $C_{уд}$ антигенов (3) на примере штамма *L. lactis* БИМ В-922, культивируемого в среде MRS. (А – В) – анализ антигенов в БФ, КЖ и КС, соответственно.

Разработанная методология использована для определения динамики синтеза и секреции антигенов 6 штаммов бацилл, 4 штаммов лактококков и 6 штаммов бифидобактерий. Установлено, что динамика синтеза и секреции антигенов зависит от штамма и условий культивирования и для каждого объекта, используемого в биотехнологиях, должна быть предварительно определена в индивидуальном порядке в интересах оптимизации биотехнологического процесса [10–12]. В целом, $C_{уд}$ секреторных антигенов в период роста культуры изменяется в существенно большей степени, чем $C_{уд}$ внутриклеточных антигенов и антигенов КС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены ПАТ кроликов, иммунизированных целыми клетками *B. bifidum* БИМ В-733 Д, *L. lactis* БИМ В-493Д или *B. cereus* БИМ В-491, которые позволяют определять как целые клетки, так и растворимые антигены штаммов-иммуногенов и большинства микроорганизмов соответствующего рода, независимо от вида и штамма, в различных средах и биологических жидкостях.

2. С использованием указанных ПАТ в качестве базовых реагентов разработана методология определения динамики $C_{уд}$ (из расчета на клетку) внутриклеточных и секретируемых антигенов, а также антигенов КС методом ИФА. Разработанная методология является универсальной и применима при наличии любых антител требуемой специфичности, в зависимости от микроорганизма, используемого в биотехнологическом процессе, и целевого биополимера, обладающего антигенными свойствами.

3. Преимущества методологии состоят в возможности осуществлять контроль биотехнологического процесса (1) по следам жизнедеятельности бактерии (секретируемым антигенам) в случае недоступности самой бактерии без прерывания процесса (например, оценка необходимости замены носителя с бактериями при очистке сточных вод); (2) в случае трудоемкой, длительной или требующей дорогостоящего оборудования процедуры детекции целевого продукта, но при наличии заранее установленной зависимости между выходом этого продукта и концентрацией антигенов (например, производство секреторного фермента, для оценки выхода и активности которого требуется многоэтапная процедура очистки); (3) в случае среды сложного состава и содержащей другие микроорганизмы (например, производство биогаза, деградация отходов пищевой промышленности и сельского хозяйства).

4. Методология использована для определения динамики синтеза и секреции антигенов 6 штаммов бацилл, 4 штаммов лактококков и 6 штаммов бифидобактерий. Установлено, что динамика синтеза и секреции антигенов зависит от штамма и условий культивирования и для каждого объекта, используемого в биотехнологиях, должна быть предварительно определена в индивидуальном порядке в интересах оптимизации биотехнологического процесса [10–12]. Методология позволяет выбрать штамм-продуцент; фракцию (БФ, КС или КЖ), обогащенную целевым биополимером; состав культуральной среды и продолжительность роста культуры, обеспечивающие максимальный выход целевого продукта с минимальными затратами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee B.H. Chapter 4.1. Dairy products. Chapter 5.7. Bacteriocins. Chapter 5.8. Functional foods and nutraceuticals // Fundamentals of food biotechnology. – Wiley Blackwell, 2014. – p. 241–261, 372–382, 383–410.
2. Borah D., Yadav R.N.S. Optimization of BH medium for efficient biodegradation of diesel, crude oil and used engine oil by a newly isolated *Bacillus cereus* strain DRDU1 from an automobile engine // Biotechnology. 2014. Vol. 13, № 4. – P. 181–185.
3. Sowmya H.V., Ramalingappa B., Krishnappa M., Thippeswamy B. Biodegradation of polyethylene by *Bacillus cereus* // Advances in Polymer Science and Technology: An International Journal. – 2014. Vol. 4, № 2ю – P. 28–32.
4. Hong H.A. et al. The use of bacterial spore formers as probiotics // FEMS Microbiol. Rev. 2005. V. 29, № 4. P. 813–835.
5. Sorokulova I. Modern status and perspectives of *Bacillus* bacteria as probiotics // J. Prob. Health. – 2013. – Vol. 1. – e106. doi: 10.4172/2329–8901.1000e106
6. Cawoy H., Bettiol W., Fickers P., Ongena M. Chapter 13. *Bacillus*-based biological control of plant diseases // Pesticides in the modern world – pesticides use and management. – Ed. by M. Stoytcheva, InTech, Rijeka, Croatia. – 2011. – P. 273–302.
7. Киселева Е.П. и др. Получение, характеристика, перспективы использования поликлональных антитител кроликов к антигенам бифидобактерий // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. Минск, 2010. №3. С. 644–649.
8. Езубец А.П. и др. Поликлональные антитела кролика, иммунизированного целыми клетками *Lactococcus lactis* БИМ В-493 Д: получение, методология тестирования и основные свойства // Известия НАН Беларуси. Приложение. 2014. С. 32–36.
9. Киселева Е.П. и др. Поликлональные антитела кролика, иммунизированного клетками *Bacillus cereus* БИМ В-491: получение и возможные области применения // Научный фонд "Биолог". – 2016. – № 2 (16). – С. 29–35.
10. Киселева Е.П. и др. Антигены бифидобактерий: синтез и распределение в системе клетка – среда // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси; под. науч. ред. Э.И. Коломиец, А.Г. Лобанка – Минск: Белнавука, 2014. – Том 6. – С. 286–300.
11. Киселева Е.П. и др. Методология исследования динамики синтеза и секреции антигенов непатогенных микроорганизмов на примере *Lactococcus lactis* // Известия НАН Беларуси. Серия биол. наук. 2016. № 4. С. 72–80.
12. Киселева Е.П. и др. Антигены клеточной стенки *Lactococcus lactis*: методология определения динамики удельной концентрации и зависимость указанного параметра от штамма, состава среды и продолжительности роста культуры // Современные проблемы биохимии: сб. науч. статей, часть 2. – Гродно, 2016. – С. 148–153.

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 378.14

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИСЦИПЛИН ВАРИАТИВНОЙ ЧАСТИ БЛОКА 1 ДЛЯ РАЗВИТИЯ НАВЫКОВ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ МАГИСТРАНТОВ

М.Г. Сульман, Г.Н. Демиденко, О.В. Манаенков

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

Согласно ФГОС ВО к задачам профессиональной деятельности выпускников, освоивших программу магистратуры по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология для вида профессиональной деятельности «научно-исследовательская», относятся [1]:

– подбор, обработка и анализ научно-технической и патентной информации по тематике исследования с использованием специализированных баз данных с использованием информационных технологий;

– анализ показателей технологического процесса на соответствие научным разработкам;

– разработка программ научных исследований, оценка и анализ полученных результатов;

– поиск и разработка новых эффективных путей получения биотехнологических продуктов, создание современных биотехнологий, в том числе нанобиотехнологий, технологий рекомбинантных дезоксирибонуклеиновых кислот, клеточных технологий;

– выделение, идентификация и анализ продуктов биосинтеза и биотрансформации, получение новых штаммов-продуцентов биологических препаратов;

– создание композиционных форм и оптимальных способов применения биопрепаратов;

– проведение валидации технологических процессов и аналитических методик;

– изучение биохимических и биологических закономерностей процессов биосинтеза, микро- и макростехиометрии, микро- и макрокинетики роста популяций микроорганизмов и клеточных культур, взаимодействия микроорганизмов, вирусов с клетками, метаболических путей и особенностей утилизации субстрата и синтеза продуктов метаболизма;

– создание теоретических моделей, позволяющих прогнозировать характер изменения свойств сырья в процессе его биотрансформации и получать продукцию с заданными качественными характеристиками;

– экспериментальное исследование биологической и физико-химической кинетики на всех стадиях технологического процесса и их математическое описание;

– подготовка научно-технической отчетной документации, аналитических обзоров и справок, документации для участия в конкурсах научных проектов, проектов фармакопейных статей (государственных стандартов), публикация научных результатов, защита интеллектуальной собственности.

В процессе обучения поставленные задачи раскрываются в различных формах обучения, отраженных в структуре программы магистратуры: дисциплинах базовой и вариативной части Блока 1, практиках (в том числе, научно-исследовательской работе) Блока 2, государственной итоговой аттестации Блока 3.

Одним из вариантов развития навыков исследовательской деятельности является закрепление вузом в учебном плане для магистратуры в вариативной части Блока 1 ряда специальных дисциплин, направленных на развитие и закрепление таких общепрофессиональных (ОПК) и профессиональных компетенций (ПК), как «готовностью к защите объектов интеллектуальной собственности и коммерциализации прав на объекты интеллектуальной собственности» (ОПК-6) и «способностью проводить анализ научной и технической информации в области биотехнологии и смежных дисциплин с целью научной, патентной и маркетинговой поддержки проводимых фундаментальных исследований и технологических разработок» (ПК-2) [1]. В проекте ФГОС ВО 3++ по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология предложена формулировка общепрофессиональной компетенции ОПК-6 «Способен разрабатывать техническую документацию, участвовать в установлении требований к документообороту организации, готовить материалы и документы для защиты объектов интеллектуальной собственности» [2].

Для магистрантов, обучающихся в Тверском государственном техническом университете по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология, преподаются следующие дисциплины вариативной

части Блока 1: «Защита интеллектуальной собственности и патентоведение» и «Технология подготовки научной документации».

Содержание рабочей программы по дисциплине «Защита интеллектуальной собственности и патентоведение» направлено, в первую очередь, на формирование представлений о российском и зарубежном законодательстве в сфере охране интеллектуальной собственности и системе правового регулирования в рассматриваемой области; развитие способности к проведению патентных исследований, к обеспечению патентной чистоты новых проектных решений и патентоспособности показателей технического уровня проекта; формирование практических навыков составления заявок и проведения патентного поиска.

Лекционный материал разбит на несколько модулей и включает такие темы как: понятие интеллектуальной собственности и система ее правовой охраны; авторское право; защита прав авторов и патентообладателей; объекты и субъекты патентного права; оформление патентных прав; патент как форма охраны объектов промышленной собственности. Особое внимание уделяется проведению практических занятий, на которые выделена значительная часть аудиторной нагрузки. Разработан ряд методических указаний, позволяющих студентам освоить на практике проведение патентного поиска в ФИПС, Европейской, Американской и других патентных базах, оформление отчет о патентных исследованиях, оформление заявки на выдачу патента на изобретение (заявление о выдаче патента на изобретение, описание изобретения, формула изобретения и реферат) и т. д.

Содержание рабочей программы по дисциплине «Технология подготовки научной документации» направлено на формирование представления о видах научно-технической документации, общих правилах и требованиях подготовки научно-технической документации, процедуре оформления заявочной и отчетной документации по грантам; развитию способностей ориентироваться в источниках научно-технической информации в области биотехнологии, химической технологии, химии; формирование практических навыков оформления научно-технической документации, заявочной и отчетной документации по грантам.

Модули дисциплины включают изучение классификации и типов научно-технической документации, общих правил и требований к подготовке научно-технической документации; подготовку и оформление научно-технической документации, связанной с выполнением научно-исследовательской работы; оформление заявочной и отчетной документации по грантам; охрану изобретений. Во время практических занятий студенты овладевают навыками:

– разработки технического задания на научно-исследовательскую работу;

– подготовки и написания научной статьи и материалов на депонирование; –

– особенностями заполнения заявки на грант, оформления промежуточных и заключительных отчетов о выполнении работы по грантам;

– подготовки и оформления отчета по научно-исследовательской работе.

Успешное освоение студентами дисциплин вариативной части Блока 1 учебного плана магистратуры по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология не только позволяет выпускникам сформировать заложенные ФГОС ВО общепрофессиональные компетенции, но и формирует умения и навыки исследовательской деятельности, имеющие большое значение для подготовки высококвалифицированных научно-исследовательских кадров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный государственный образовательный стандарт высшего образования. Направление подготовки 19.04.01 Биотехнология (уровень магистратуры). Утвержден приказом Министерства образования и науки 21 ноября 2014 г. № 1495. Портал Федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования [сайт]: URL: www.fgosvo.ru (дата обращения 23.07.2020).

2. Проект «Федеральный государственный образовательный стандарт высшего образования – магистратура по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология». Портал Федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования [сайт]: URL: www.fgosvo.ru (дата обращения 23.07.2020).

УДК 637.514.92

РЕАЛИЗАЦИЯ ОСНОВНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ПО НАПРАВЛЕНИЮ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»

Р.Р. Биглов, В.А. Соломонов

МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

Реализацию основных образовательных программ по направлениям бакалавриата и магистратуры вузы Российской Федерации осуществляют на основе разрабатываемых преподавателями основных профессиональных образовательных программ (ОПОП), центральными элементами которых являются учебные планы и рабочие учебные программы дисциплин и практик. Разработчики ОПОП должны: быть хорошо знакомы с тенденциями развития высшего образования в ведущих странах мира, знать нормативную базу построения системы высшего образования Российской Федерации, представлять учебно-методические интересы кафедр, владеть современными образовательными технологиями, знать основы экономики высшего образования, иметь опыт проведения системных научно-методических исследований, владеть навыками работы в команде. Эффективная разработка ОПОП требует тщательного подбора команды разработчиков и поддержки со стороны администрации университета новой программы на этапе внедрения.

При подготовке учебных планов для программ по направлению бакалавриата «Биотехнология» сложными моментами являются выделение дисциплин для получения фундаментального естественнонаучного образования и составление «образовательных полей» освоения универсальных и общепрофессиональных компетенций. Направление «Биотехнология» относится к числу направлений, по которым для обеспечения успешной специальной подготовки требуется изучение большого числа общенаучных дисциплин в области химии, физики, биологии, математики, информатики. Размещение общих учебных дисциплин на младших курсах позволяет проводить распределение студентов по выпускающим кафедрам на третьем курсе и сокращать затраты на изучение учебных дисциплин на первом и втором курсах.

Формирование компетенций предполагает освоение владений, являющихся составными частями компетенций. Владения проявляются прежде всего в практической деятельности студентов: в лабораторных работах, в практиках, при выполнении квалификационной работы. В отличие от владений освоение знаний, умений и навыков, необходимых для формирования компетенций осуществляется в ходе изучения различных учебных дисциплин. Образовательное поле компетенции включает набор учебных дисциплин и практик, обеспечивающих формирование компетенции. Сложности в определении образовательного поля компетенции связаны: с размещением учебных дисциплин и практик в учебном плане; выделением знаний, умений, навыков и владений компетенции, подлежащих освоению при изучении конкретной дисциплины; формированием индикаторов освоения компетенций; подготовкой и проведением контрольных мероприятий по оценке степени сформированности компетенции (контрольные мероприятия могут включать учебный материал нескольких дисциплин).

Программы по направлению «Биотехнология» могут иметь академическую или прикладную направленность, могут охватывать разнообразные области и сферы профессиональной деятельности, могут быть направлены на решение различных задач профессиональной деятельности с использованием отличающихся объектов или областей знаний. Для обеспечения практической подготовки необходимого уровня целесообразно использование дистанционных образовательных технологий и сетевой формы обучения, которые позволяют отвести для практической подготовки 4 курс программ бакалавриата и 2 курс магистратуры, сделав практику распределенной с параллельным дистанционным изучением ограниченного числа учебных дисциплин.

ЛИТЕРАТУРА

ФГОСВО по направлению 19.03.01 Биотехнология от 10.03.2015

УДК 606

БИОТЕХНОЛОГИЯ НА СЛУЖБЕ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ

Д.А. Девришов, А.А. Олешкевич, С.Н. Марзанова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии, Москва, Россия

Биотехнология – междисциплинарная область научно-технического прогресса, возникшая на стыке биологических, химических, технических и сельскохозяйственных наук.

Биотехнология охватывает различные отрасли промышленности, включая микробиологические, химические, пищевые, сельскохозяйственные, биомедицинские производства и рассматривается, как одно из самых перспективных направлений развития и на этом основании во многих странах включена в исследовательские программы по созданию новых промышленных технологий и продукций.

Биофармацевтика – это одно из наукоемких и востребованных направлений в медицинской и ветеринарной биотехнологии, охватывающее разработку и применение живых систем, а также неживых систем биологического происхождения и технологических методов, в том числе, молекулярной биологии, клеточной инженерии, микробиологического и химического синтеза создания и производства лекарственных средств.

В развитых странах Европы и США существует государственная программа развития биотехнологии, направленная на разработку новых технологий получения гормонов, интерферонов, вакцин, витаминов, аминокислот, антибиотиков, диагностических препаратов и других лекарственных средств, финансирование которых составляет от десятков миллиардов до более сотни миллиардов долларов США.

Лидером по объему выпуска биотехнологической продукции в мире является Японии, а по производству фармацевтической продукции – США. В новых продуктах, полученных с помощью биотехнологий, более 40 % составляют лекарственные средства медицинского и ветеринарного применения, 20–25 % – пищевой или химической промышленности.

Наукоёмкость, высокотехнологичность и многоэтапность биотехнологического процесса обусловливает необходимость подготовки и привлечения различных специалистов: генетиков, молекулярных биологов, иммунологов, биохимиков, биооргаников, вирусологов, микробиологов, клеточных физиологов, инженеров-технологов, конструкторов биотехнологического оборудования и других.

Определённые успехи в области биотехнологии, достигнутые в рамках реализации Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (утв. Правительством РФ от 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8), есть и у Российской Федерации. Комплексная программа предусматривает увеличение в 8,3 раза объёма потребления биотехнологической продукции, увеличение объёма производства биотехнологической продукции в 33 раза, сокращение доли импорта в потреблении биотехнологической продукции на 50 %, увеличение доли экспорта биотехнологической продукции более чем в 25 раз, а также к 2020 году выход на уровень производства биотехнологической продукции в России в размере около 1 % ВВП, и не менее 3 % ВВП – к 2030 году. Но на 2020 год не достигнуты намеченные целевые показатели. Причинами этого, наряду с многими факторами, в первую очередь, являлось отсутствие должного уровня материально-технологической базы, недостаточный уровень квалификации специалистов, малый объем программного финансирования. В рамках развития фармацевтических технологий положительной динамикой следовало бы считать возрастание доли фармацевтических и лекарственных препаратов производства Российской Федерации. Однако это достижение не отражает реальное положение дел, т. к. фармацевтическая промышленность практически полностью зависит от импорта оборудования и субстанций лекарственных средств.

Иммунобиотехнология является одним из развитых в Российской Федерации направлений. По эффективности отечественные вакцины и диагностические препараты медицинского и ветеринарного применения не уступают европейским и американским аналогам и представляет достойную конкуренцию на мировом рынке.

В качестве первоочередных задач биотехнологии на данном этапе следует рассматривать следующие направления:

– подготовка высококвалифицированных кадров биотехнологов с профилизацией по приоритетным направлениям развития биотехнологии;

– развитие аппаратурно-технологической базы для создания биотехнологических производств мирового уровня;

– обеспечение бюджетного финансирования фундаментальных и субсидирование прикладных исследований приоритетных направлений биотехнологии на уровне ведущих западных стран:

а. разработка новых биологически активных веществ (субстанций) и их производство в медицинских, ветеринарных, агротехнических целях;

б. разработка и освоение производства терапевтических лекарственных средств, позволяющих снизить долю импортных препаратов и ориентированных на экспорт, для медицины и ветеринарии;

в. разработка и освоение производства средств диагностики и защиты от инфекционных и паразитарных болезней человека, животных и растений (вакцины, диагностические тесты, средства дезинфекций и обеззараживания, средства химической, биологической и радиационной защиты);

г. разработка и освоение производства регуляторов роста растений, новых сортов, пород и гибридов продуктивных животных и растений, полученных методами генетической модификации (селекции) и клеточной инженерии;

д. разработка и освоение производства ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, ветеринарных препаратов и др.) для повышения выхода сельскохозяйственной продукции продуктивного животноводства;

е. разработка биотехнологического оборудования и новых технологий получения продуктов для использования в биомедицине, пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности.

УДК 608.7

НАПРАВЛЕНИЕ ПОДГОТОВКИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ» 19.03.01 (БАКАЛАВРИАТ) 19.04.01 (МАГИСТРАТУРА) В МОСКОВСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ АКАДЕМИИ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИИ

А.А. Олешкевич, Д.А. Девришов, С.Н. Марзанова

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии, Москва, Россия

Специальность Биотехнология является перспективной и востребованной в сфере высоких наукоемких технологий в различных отраслях промышленности – пищевой, сельскохозяйственной, фармацевтической, медицинской, ветеринарной, биологической и в других областях, где используются технологии микробного, химического, биологического синтеза и переработка растительного и животноводческого сырья, а также получение биологически активных веществ для пищевой, фармацевтической и других отраслей. Объекты профессиональной деятельности наших выпускников это:

– микробиологические производства: получение активных субстанций – антибиотиков, витаминов, ферментов, гормонов, вакцин; агробиотехнологические компании и исследовательские центры по переработке растительного и животного сырья, разработке технологий производства сельхозпродукции;

– предприятия пищевой промышленности: мясная, рыбная, хлебобулочная и другие отрасли;

– цветная металлургия: разработка методов извлечения цветных благородных металлов из руд и промышленных отходов; нефтегазовая сфера – технологии повышения нефтеотдачи пластов;

– научно-исследовательские институты и вузы биотехнологического, биолого-медицинского, сельскохозяйственного профиля; испытательные центры и лаборатории пищевой и перерабатывающей, микробиологической, фармацевтической промышленностей; Лаборатории контроля качества и безопасности лекарственных средств; Станции защиты и селекции растений и животных; экологические службы.

Бакалавры-биотехнологи 19.03.01 специализируются на получении, исследовании и применении в работе ферментов, штаммов вирусов и микроорганизмов, культур клеток животных и растений. Закончив обучение, наш выпускник способен получать продукцию путем микробиологического синтеза, биокатализа, генной инженерии и нанобиотехнологий; проводить испытания по определению показателей физико-химических свойств сырья и продукции; разрабатывать и использовать в производстве ферментационное и вспомогательное оборудовании и производить на нём расчёты; использовать национальные и международные стандарты при оценке, контроле качества и сертификации сырья, промежуточных продуктов и готовой продукции; организовывать рабочие места на микробиологическом производстве, а именно размещать и настраивать технологическое оборудование (рисунок).



Биотехнологическая производственная практика. Аудиторный практикум.

При освоении образовательной программы применяются инновационные технологии (обсуждение ситуационных проблемных вопросов, проблемных задач, имитационные игры и др.), творческий подход и современная практика. Срок обучения в бакалавриате на базе 11 класса либо после колледжа/техникума составляет 4 года. Бакалавр, по окончанию вуза по направлению «Биотехнология», может продолжить образование в магистратуре по биотехнологии. В магистратуру по Биотехнологии принимаются после бакалавриата по направлениям подготовки «Товароведение», «Продукты питания животного происхождения», «Зоотехния», «Ветеринарно-санитарная экспертиза», окончившие образовательную программу, по специальности «Ветеринария» уровень специалитет, бакалавры и специалисты в области тонкого химического машиностроения, нефтехимических производств, биомедицины и фармацевтики. Руководитель программы магистратуры по направлению «Биотехнология» (19.04.01) «Биотехнологические производства» – член-корр. РАН, профессор Д.А. Девришов.



Уважаемые коллеги!
Дорогие друзья!

Мы выражаем большую и искреннюю благодарность всем участникам VIII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» за ваш труд в определении основных проблем в области биотехнологии и выявлении тенденций развития в данной области, за обмен достижениями биотехнологии и обсуждение путей оптимизации образовательного процесса студентов-биотехнологов. Желаем вам творческих успехов, больших научных достижений и побед!

До новых встреч!

С уважением, оргкомитет.

Организаторы:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Воронежский государственный университет инженерных технологий»,
Научно-образовательный центр «НаноБиоТех»,
ООО «Вега-Эко»,
ООО «Биоактуаль»

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

журнала ***«Актуальная биотехнология»***

Приглашает к публикации студентов, аспирантов и научных работников по следующим тематикам:

- *Актуальные вопросы современной биотехнологии*
- *Биоинженерия и биоинформатика*
- *Экология и ресурсосбережение*
- *Биоэнергетика, пищевая биотехнология, биохимия, биогеотехнология*
- *Сельскохозяйственная и лесная биотехнология*
- *Биофармацевтика и биомедицина*

Требования к оформлению статей

1. Материалы представляются в двух видах: на электронном носителе и распечатанные на одной стороне листа белой бумаги формата А4 (1 экз.) на лазерном принтере. Они должны быть набраны в редакторе MSWord версия не ниже 6.0 (Office не выше 2007) и напечатаны через одинарный интервал в две колонки шрифтом:
• основной текст –TimesNewRomanCyr 11 с полями: левое 22 мм, правое 18 мм, верхнее и нижнее 25 мм;
• колонтитулы от края – верхний и нижний 18 мм;
• заголовки по центру –TimesNewRomanCyr 11, жирный;
• красная строка -1 см;
• перенос слов – автоматический.
Со смещением на 5 см от рамки текста в начале статьи набираются:
• УДК– Times New Roman Cyr 12;
• должность, степень И. О. Ф. авторов –TimesNewRomanCyr 12;
• название статьи –TimesNewRomanCyr 16, жирный, строчной (без переноса);
• аннотации– Times New Roman Cyr 9;
• ключевые слова – TimesNewRomanCyr 9, до 10 слов;
2. Объем для статьи – 3-8 с. Структурно статья должна иметь четко выраженное *введение,* в котором ставится задача (описывается решаемая проблема), *основную часть,* где излагаются используемые авторами пути решения поставленной задачи, приводятся и обсуждаются результаты, и *заключение,* в сжатой форме подводящее итог работы. Повторение одних и тех же данных в статье, таблице и графике не допускается. Размерность всех характеристик приводится в системе СИ.
3. К каждой статье под заглавием дается аннотация (объем до 600 печатных знаков) на русском и английском языках через 1 строку друг от друга. Название статьи, фамилия и инициалы приводятся отдельно на английском языке.
4. Название статьи или краткого сообщения должно быть лаконичным и точно отражать содержание.
5. Иллюстрации в формате jpeg или gif:
должны быть расположены после ссылки на них в тексте;
должны выполняться на компьютере с обозначением всех необходимых букв и символов в соответствии с ЕСКД и Р 50-77-80. Все буквенные и цифровые обозначения, приведенные на рисунках, поясняются в основном или подрисуночном тексте. Подрисуночные подписи даются TimesNewCyr 10, на формат рисунка.
Графические объекты (диаграммы, графики) должны быть активными (т.е. подлежать редактированию стандартными средствами, например, MSExcel).
6. Формулы и буквенные обозначения:
×буквы латинского алфавита, используемые в индексах, набирают курсивом;
×буквы русского и греческого алфавита – прямым шрифтом; знак вектора – полужирным;
×нумерация формул в тексте сквозная. Нумеруются только те формулы, на которые есть ссылки в тексте.
Формат формул (стандартный редактор) :
× стиль –«математический»;
× размер символа —11

Sizes (Размеры)	
Full (Обычный)	11 – 10
Subscript/Superscript(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.

•