

16+

ISSN 2304-4691

# Актуальная биотехнология

№4

2023

**ISSN 2304-4691**

**Основан в 2012г.  
г. Воронеж**

# **Актуальная биотехнология**

**№ 4**

**2023**

**16+**

Учредитель: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

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.т.н., Член-Корр. РАСХН Л.В. Римарева

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год

Официальный сайт «Актуальная биотехнология» [www.actbio-vsuet.ru](http://www.actbio-vsuet.ru)  
Подписной индекс издания в агентстве "Роспечать" 58012

Ответственный секретарь: ДЕРКАНОСОВА А.А. (эл. почта: [post@actbio-vsuet.ru](mailto:post@actbio-vsuet.ru))

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций:  
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-83978 от 21 сентября 2022 г.

---

---

**Адрес университета, редакции, издательства и отдела полиграфии ФГБОУ ВО «ВГУИТ»**

394036, Воронеж, пр. Революции д.19 ауд.11

тел./факс: (473) 255-37-16

E-mail: [post@actbio-vsuet.ru](mailto:post@actbio-vsuet.ru)

---

---

Сдано в набор 10.11.2023. Подписано в печать 17.11.2023

Выход в свет: 22.11.2023

Усл. печ. л. 10,65 Тираж 500 экз. Заказ.

Цена – свободная.

© ФГБОУ ВО

«Воронеж. гос. ун-т инж.  
технол.», 2023

## Содержание

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

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПУТЕМ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ АЛИФАТИЧЕСКИХ СПИРТОВ Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, А.И. Сидоров, В.Г. Матвеева	5
ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ПОЛНОТЫ ГИДРОЛИЗА АЗОКАЗЕИНА ЦИСТЕИНЫМИ ПРОТЕАЗАМИ ОТ ВРЕМЕНИ ИНКУБАЦИИ В.А. Королева <sup>1,2</sup> , Ю.А. Редько <sup>1</sup> , М.Г. Холявка <sup>1</sup> , В.Г. Артюхов <sup>1</sup>	6
ТОКСИКОЛОРАНТНЫЕ ГРИБЫ ПРЕВРАЩАЮТ БЕЛЫЙ ФОСФОР В ФОСФАТ А.З. Миндубаев <sup>1</sup> , Э.В. Бабынин <sup>2</sup> , Е.К. Бадеева <sup>2</sup>	7
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ГЛИКОЛИПИДНЫХ БИОПАВ БАКТЕРИЙ RHODOCOCCUS ERUYNOROLIS X5 Т.И. Леонова, Е.В. Акатова	8
ПРИМЕНЕНИЕ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ВЫСОКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЗ ЖЕНЫШЕНЯ, АРАЛИИ И ЯКОРЦЕВ А.И. Артемьев, Н.В. Меньшутина	9
АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ ИЗ ПРЕСНОВОДНЫХ БИОТОПОВ Е.Н. Капаруллина, Н.В. Доронина	10
КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА ЛОСЯ (ALCES ALCES), ПОЛУЧЕННОГО В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ ЭКСПЕРССИИ Д.В. Балабова <sup>1</sup> , В.Ю. Чиркова <sup>1</sup> , Е.А. Шарлаева <sup>1</sup> , Д.Н. Щербаков <sup>1,2</sup>	11
ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ RAENIVACILLUS POLYMYXA А.Б. Балханова, С.В. Гомбоева	12
РАЗРАБОТКА БИОРГАНИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ГРУНТОВ РАЗЛИЧНОГО ТИПА М.М. Герцен, Л.В. Переломов	13
БИОГЕННЫЕ СЕРЕБРО-СОДЕРЖАЩИЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК БИОЦИДНЫЕ АГЕНТЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ О.А. Журавлева <sup>1</sup> , А.Ю. Власова <sup>1,2</sup> , А.И. Килочек <sup>3</sup> , Т.А. Воейкова <sup>1</sup>	14
ДИНАМИКИ ТЕРМОДЕГИДРАТАЦИИ СЕМЯН НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ALLIUM L. В.Н. Зеленков <sup>1,2</sup> , М.И. Иванова <sup>1</sup>	15
ПРЕДИОСЕВНАЯ ОБРАБОТКА СЕМЯН НЕКОТОРЫХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР ГИДРОТЕРМАЛЬНЫМ НАНОКРЕМНЕЗЕМОМ В.Н. Зеленков <sup>1,2</sup> , В.В. Латушкин <sup>2</sup> , В.В. Потапов <sup>4</sup> , В.М. Косолапов <sup>5</sup> , Б.И. Сандухадзе <sup>6</sup>	19
СУММАРНАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СОИ ПРИ ТЕМНОВОМ ПРОРАЩИВАНИИ СЕМЯН В.Н. Зеленков <sup>1,2</sup> , В.В. Латушкин <sup>2</sup> , В.Т. Синеговская <sup>4</sup>	20
КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ «ДНК ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА А.В. Зубков, А.А. Корноухова, Н.С. Кузьмина, А.В. Сидоров, Л.Г. Бутова, О.А. Свитич	21
ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЗЕРНОВОГО ХЛЕБА, ПРИГОТОВЛЕННОГО НА ЗАКВАСКАХ С.В. Китаевская, О.А. Решетник, Д.Р. Камартинова	26
ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕНАМИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К PLASMOPLARA VITICOLA И ERYSIPIHE NESATOR, В ДИКОРАСТУЩИХ ФОРМАХ ВИНОГРАДА КРЫМА Г.В. Корнильев, В.И. Рисованная, Я.Ю. Рязанкина	27
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ METHYLORHILUS QUAYLEI И METHYLORUBRUM EXTORQUEUS ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ Е.Р. Митина, А.Б. Мин, А.Б. Пшеничникова	28
ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПОСТБИОТИКОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ И.С. Полянская <sup>1</sup> , М.В. Корюкина <sup>2</sup> , О.Б. Бадеева <sup>2</sup>	29
ВЛИЯНИЕ ИУК И АБК НА АТФ-азу МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПЛАЗМАЛЕММЫ ПРОРАСТАЮЩЕГО МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ Ю.В. Минкина <sup>1</sup> , А.С. Воронков <sup>2</sup>	30
ВЛИЯНИЕ ИНОКУЛЯТА НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ СМЕШАННЫХ БИОПЛЕНОК МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ К ПОЛИМИКСИНУ В Е.Р. Митина, А.А. Бершадская, А.Б. Пшеничникова	31
РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУРЫ НА ОСНОВЕ BACILLUS TOYONENSIS B-13249 И B. PUMILUS B-13250 И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова	32
КОМПЛЕКСНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ЭНДО- И ЭКЗОПЕПТИДАЗ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ Н.В. Цурикова, Е.И. Курбатова, Е.В. Костылева, А.С. Серета, Е.А. Фурсова	36
ИММОБИЛИЗАЦИЯ ОКСИДОРЕДУКТАЗ НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ХИТОЗАНОМ И ТРИПОЛИФОСФАТОМ НАТРИЯ Б.Б. Тихонов <sup>1</sup> , Д.Р. Лисичкин <sup>1</sup> , В.Г. Матвеева <sup>1</sup> , М.Г. Сульман <sup>1</sup> , А. Sh. Desai <sup>2</sup> , J.C.S. dos Santos <sup>3</sup>	37
БИОТЕХНОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ЕЕ КОМПОЗИТОВ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И БИОМЕДИЦИНЕ Т.И. Громовых <sup>1</sup> , М.А. Алехина <sup>1</sup> , И.И. Гайдашева <sup>1</sup> , П.С. Громовых <sup>1</sup> , В.С. Садыкова <sup>2</sup>	39
ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ GALLERIA MELLONELLA В БИОТЕХНОЛОГИИ Е.А. Прутенская, А. Айт Балахсен, В.А. Базулева	44
ФЕРМЕНТАТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТА БЕЛКА АМАРАНТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПИЩЕВЫХ ЦЕЛЯХ О.Л. Мещерякова, Л.И. Василенко, О.С. Корнеева	46
БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ Г.П. Шуваева, Т.В. Свиридова, О.В. Лепехина, А.Р. Арзуманова	47
БИОТЕХНОЛОГИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ КАРОТИНОИДОВ Г.П. Шуваева, Т.В. Свиридова, А.Р. Арзуманова, О.В. Лепехина	49
ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ САХАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА М.Ю. Шурбина, Р.Т. Валеева, Д.В. Тунцев	50
РАЗНООБРАЗИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕАКЦИИ МУЛЬТИГЕННОГО СЕМЕЙСТВА TRIM НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ ИНФЕКЦИЮ Е.А. Степаненко, В.В. Ненашева, В.З. Тарангул	51

УДК 66.097

## ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПУТЕМ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ АЛИФАТИЧЕСКИХ СПИРТОВ

*Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, А.И. Сидоров, В.Г. Матвеева*

*Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия*

В наши дни химическая промышленность является неотъемлемой частью нашей повседневной жизни. Нефтехимический синтез, посредством, практически неограниченных возможностей преобразования нефти и ее продуктов, позволяет получать продукты и ресурсы, ставшие привычными, а порой и полностью незаменимыми в быту. От машиностроения и топлив до лекарств и косметики, все это получают из нефтехимических продуктов. Но данный тип ресурсов не является возобновляемым и его количество ограничено, что приводит к проблеме возможного исчезновения данного ресурса в будущем. В связи с этим начинает свое развитие направление биоэнергетики, направленное на поиск и использование альтернативных источников ресурсов для технологических процессов. Например, использование биоспиртов для получения ароматических соединений, нашедших свое применение в фармацевтическом синтезе лекарственных препаратов, посредством каталитической трансформации на пористых катализаторах ZSM-5. Таким образом, исследование оптимальных условия проведения процесса каталитической трансформации на пористых катализаторах ZSM-5 является актуальной проблемой синтеза ароматических соединений.

Одним из факторов, влияющих на каталитическую трансформацию биоэтанола, является изменение массы катализатора, используемого в процессе каталитической трансформации. В работе проводились исследования, в ходе которых варьировали массу катализатора от 0,1 г до 0,8 г, скорость подачи алифатического спирта 0,3 мл/мин.

Полученные результаты представлены на рисунке 1.

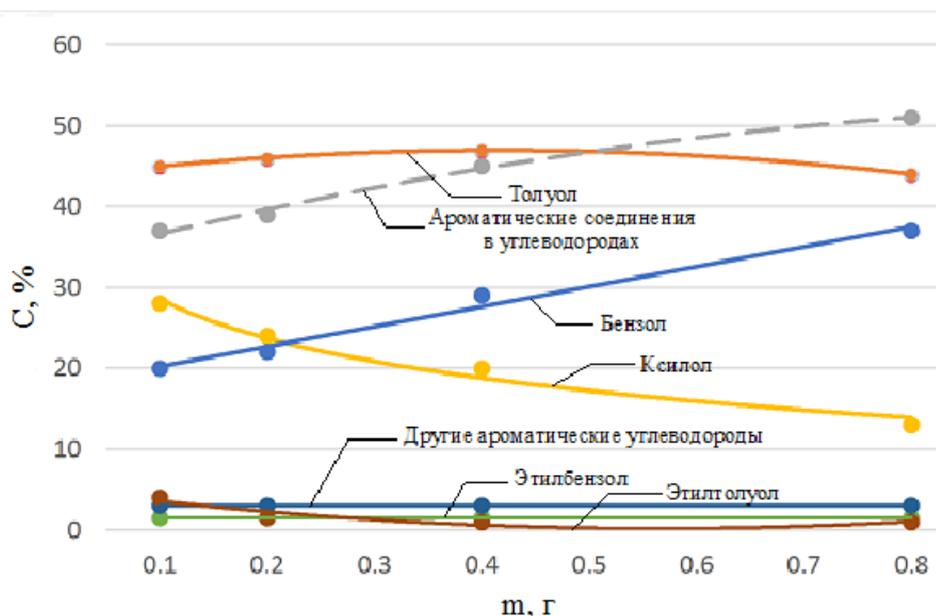


Рис. 1 – Зависимость степени ароматизации и распределения ароматических соединений при конверсии этанола при  $T=400^{\circ}\text{C}$  от массы катализатора

По полученным результатам можно сделать вывод, что с увеличением массы катализатора увеличивается время контакта спирта с катализатором. В следствие чего, процесс синтеза ароматических соединений имеет преимущество по сравнению с процессами синтеза других соединений. Количественное распределение ароматических соединений может изменяться посредством реакций вторичного крекинга или деалкилирования.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21–19–00–192.*

**ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ПОЛНОТЫ ГИДРОЛИЗА АЗОКАЗЕИНА ЦИСТЕИНОВЫМИ ПРОТЕАЗАМИ ОТ ВРЕМЕНИ ИНКУБАЦИИ****В.А. Королева<sup>1,2</sup>, Ю.А. Редько<sup>1</sup>, М.Г. Холявка<sup>1</sup>, В.Г. Артюхов<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия<sup>2</sup> Воронежский государственный университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

Протеазы растительного происхождения используются в различных сферах производства: для смягчения мяса в пищевой промышленности, для осветления напитков в пивоварении, на их основе изготавливают ранозаживляющие препараты для медицины и ветеринарии.

Фицин (КФ 3.4.22.3) получают из высушенного латекса растений рода *Ficus*. Оптимальный диапазон pH для фермента составляет от 5,0 до 8,0, а оптимальная температура – от 45 до 55 °С [1]. Папаин (КФ 3.4.22.2) выделяют из латекса *Carica papaya*. Папаин проявляет протеазную, амидазную, эстеразную, трансамидазную, трансэстеразную и тиолэстеразную виды активности. Оптимальный диапазон pH для проявления каталитической способности папаина варьирует в зависимости от природы субстрата в пределах 5,0–7,0, а диапазон оптимальных температур составляет 50–65 °С. Бромелин экстрагируют из стеблей (КФ 3.4.22.32) и незрелых плодов (КФ 3.4.22.33) *Ananas comosus* из семейства Bromeliaceae. Оптимальный уровень pH для проявления активности бромелина составляет 6,0–8,5 для большинства субстратов при 50–60 °С.

Хитозан является перспективным материалом для биомедицинской и фармацевтической промышленности. Хитозаны могут быть использованы при разработке способов направленной доставки лекарственных средств, они контролируют высвобождение, абсорбцию и биоадгезию медицинских субстанций.

Для любой сферы применения протеолитических ферментов важно знать время полного гидролиза субстрата тем или иным энзимом.

Цель работы – изучение зависимости полноты гидролиза азоказеина протеолитическими ферментами (фицином, бромелином и папаином) от времени инкубации.

Объектами исследования являлись фицин, папаин и бромелин (Sigma-Aldrich). Носителями для иммобилизации служили средне- и высокомолекулярный хитозаны (ЗАО «Биопрогресс»). В качестве субстрата для гидролиза был выбран азоказеин (Sigma-Aldrich). Для иммобилизации фицина и папаина на матрицах средне- (pH 10,0 и 9,0) и высокомолекулярного (pH 8,6 и 9,0) хитозанов использовали 0,05 М глициновый буфер. Для сорбции бромелина на матрицах средне-и высокомолекулярного хитозанов использовали 0,05 М трис-глициновые буферы со значениями pH 9,0 и 8,5 соответственно. Инкубация ферментов с субстратом проводилась при оптимальных температурах (37 °С – для фицина, при 60 °С – для папаина и бромелина) в течение 10, 20, 30, 60, 90, 120 и 150 минут.

В ходе анализа значений общей активности (в единицах на мл раствора фермента) было показано, что максимальное количество продуктов гидролиза азоказеина можно наблюдать уже при 30 минутах инкубации. При увеличении времени инкубирования показатели активности фицина, бромелина и папаина варьируют в пределах 5 %. Причем, иммобилизация энзимов не приводит к увеличению скорости гидролиза субстрата.

Таким образом, было показано, что 30-минутная инкубация для 0,5 % раствора азоказеина растительными протеазами является оптимальной.

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023-0009*

**Литература**

1. Holyavka M., Koroleva V., Olshannikova S., Artyukhov V., Faizullin D., Zakhartchenko N., Zuev Y., Kondratyev M., Zakharova E. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity. International Journal of Biological Macromolecules. 2021. T. 180. С. 161–176.

УДК 579.695; 546.85; 502.55; 661.63

**ТОКСИКОТОЛЕРАНТНЫЕ ГРИБЫ ПРЕВРАЩАЮТ БЕЛЫЙ ФОСФОР В ФОСФАТ****А.З. Миндубаев<sup>1</sup>, Э.В. Бабынин<sup>3</sup>, Е.К. Бадеева<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Казанский национальный исследовательский технологический университет<sup>2</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН<sup>3</sup> Татарский НИИХП ФИЦ КазНЦ РАН

Белый фосфор Р<sub>4</sub> является простым веществом, аллотропной модификацией элементного фосфора. Он – самая химически активная и термодинамически нестабильная модификация фосфора. Из всех аллотропных модификаций фосфора обладает наибольшей токсичностью.

Согласно [1], еще ранее 1985 года велись исследования биодegradации белого фосфора микроорганизмами в анаэробных условиях. Однако, авторы исследования в своей работе, содержащей интересные данные по биодegradации соединений фосфора различных степеней окисления и биологическому восстановлению фосфата, пришли к заключению об отсутствии роста микробной биомассы в присутствии белого фосфора и трансформации последнего в менее токсичные соединения. То же самое заключение сделано ими и в отношении красного фосфора. Тем не менее, авторы постулируют абиогенную дegradацию белого и красного фосфора, с последующей микробиологической редукцией токсичных полупродуктов распада, т.е. признают участие микрофлоры в процессе детоксикации.

В наших работах [2, 3] впервые исследованы экстремотолерантные культуры микроорганизмов, растущих в культуральных средах с содержанием белого фосфора до 1 %. Это превышение ПДК в сточных водах в 5000 раз! Эти культуры уникальны, и имеются только у нас.

Впервые произведены посевы плесневых грибов из родов *Aspergillus* и *Trichoderma* в культуральные среды, содержащие белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В данных средах микроорганизмы росли и не испытывали фосфорное голодание. То есть окисляли белый фосфор до фосфата, необходимого для жизнедеятельности! Это первый в мире пример включения белого фосфора в биосферный круговорот элемента фосфора, и обезвреживания его живыми организмами. Причем, штамм *Aspergillus niger* AM1 был выделен из емкости, в которой хранился кусковой белый фосфор в толще воды. В этих экстремальных условиях токсического воздействия споры гриба смогли выжить.

Показана устойчивость культуры AM1 к продуктам неполного окисления Р<sub>4</sub> и метаболизм некоторых из них. Поскольку метаболизм связан с окислением кислородом, мы предполагаем, что в нем задействованы ферменты оксидазы.

**Литература**

1. Spanggord, R.J. Environmental fate of white phosphorus/felt and red phosphorus/butyl rubber military screening smokes. Final Report / R.J. Spanggord, R. Renwick, T. – W. Chou, R. Wilson, R.T. Podoll, T. Mill, R. Parnas, R. Platz, D. Roberts // SRI International, Menlo Park, CA. Contract No. DAMD17–82-C-2320. AD176922. Prepared by SRI International, Menlo Park, Calif., for U.S. Army Medical Research and Development Command. – 1985. – p. 48.

2. Миндубаев, А.З. Биологическая дegradация желтого (белого) фосфора – вещества первого класса опасности / А.З. Миндубаев, Э.В. Бабынин, Е.К. Бадеева, С.Т. Минзанова, Л.Г. Миронова, Й.А. Акосах // Журнал неорганической химии. 2021. Т.66. № 8. С. 1137–1142. DOI: 10.31857/S0044457X21080158

3. Миндубаев, А.З. Черный аспергилл AM1 – организм, приспособленный к дефициту фосфора / А.З. Миндубаев, Э.В. Бабынин, Й.А. Акосах // Актуальная биотехнология. 2022. № 1(35). С. 263.

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ГЛИКОЛИПИДНЫХ БИОПАВ БАКТЕРИЙ RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS X5****Т.И. Леонова, Е.В. Акатова***Тульский государственный университет, Тула, Россия  
НИЦ «БиоХимТех», лаборатория ЭиМБ, Тула, Россия*

Поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами (биоПАВ) изучаются в перспективе достойной альтернативы синтетическим ПАВ (СПАВ). Их основными преимуществами является низкая токсичность, экологическая безопасность и биоразлагаемость. Однако производство биоПАВ сдерживается высокой стоимостью их получения, что связано с низким содержанием в среде [1]. Одним из решений данной проблемы может выступать поиск микроорганизмов-продуцентов биоПАВ и увеличение выхода продукции за счёт подбора условий культивирования и использования дешёвого сырья. В связи с этим, целью данного исследования была оптимизация условий периодического культивирования бактерий *Rhodococcus erythropolis* X5 для увеличения выхода гликолипидных биосурфактантов.

Периодическое культивирование штамма X5 проводили при 28 °С 180 об/мин на минеральной среде Эванса с добавлением 2 % подсолнечного масла (об/об) [2] в качестве источника углерода и энергии и 4 % инокулята в течение 6 суток [3].

Исследовали влияние  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , мочевины и дрожжевого экстракта на продукцию гликолипидов, которые добавляли в питательную среду в эквимолярном по азоту количестве, заменяя хлорид аммония. Поверхностное натяжение бесклеточных супернатантов при всех источниках азота после 6 суток культивирования снижалось с 67 мН/м до 35–36 мН/м и значительно не отличалось, что может быть связано с достижением критической концентрации мицеллообразования. Количественный анализ гликолипидов в культуральной среде проводили спектрофотометрическим методом при участии фенольно-серного реагента [4]. Наибольшая концентрация гликолипидов ( $0,22 \pm 0,08$  г./л) была достигнута при культивировании с нитратом натрия в качестве источника азота.

Соотношения углерода к азоту варьировали в зависимости от концентрации нитрата натрия в среде от 0,05 г./л до 3,4 г./л. Содержание источника углерода оставалось неизменным (2 % об/об). Максимальный выход продукции гликолипидов по концентрации сахаров ( $0,65 \pm 0,07$  г./л) и минимальное поверхностное натяжение (35 мН/м) бесклеточных супернатантов отмечено при С/№ 50.

В ходе работы были определены условия культивирования (2 % подсолнечного масла,  $\text{NaNO}_3$  в качестве источника азота, С/№ 50), позволяющие повысить выход продукции гликолипидных биоПАВ бактериями *Rh. erythropolis* X5.

***Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021–0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).***

**Литература**

1. Рудакова М.А., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю. Биосурфактанты: современные тренды применения // ученые записки казанского университета. Серия естественные науки. 2021. Т.163. № 2. С. 177–208.
2. Леонова Т.И., Акатова Е.В. Влияние гидрофобного субстрата на продукцию гликолипидных биосурфактантов, продуцируемых бактериями *Rhodococcus erythropolis* X5 // Материалы IX международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков, Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2022. С. 195–196.
3. Леонова Т.И., Акатова Е.В. Динамика продукции гликолипидного биосурфактанта бактериями рода *Rhodococcus* при длительном культивировании // Биология – наука XXI века: материалы 26-ой Пущинской школы-конференции молодых учёных с международным участием, 9–14 апр. 2023. Пущино, 2023. С. 163.
4. DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. Vol. 28, № 3. P. 350–356.

УДК 66.083

## ПРИМЕНЕНИЕ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ВЫСОКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИЗ ЖЕНЬШЕНЯ, АРАЛИИ И ЯКОРЦЕВ

*А.И. Артемьев, Н.В. Меньшутина*

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия*

Извлечение биологически активных веществ из растительного сырья с сохранением их целостности и биологической активности является актуальной задачей. На данный момент для получения биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья используются такие способы как сушка, измельчение, стерилизация, отгонка эфирных масел с водяным паром, экстракция водой, маслом, глицерином или органическими растворителями и комбинаторные способы. Экстракция с применением дорогостоящих органических растворителей приводит к извлечению как полярных, так и не полярных соединений. В результате получаемый экстракт имеет более обширный спектр компонентов в отличие от требуемого набора. При этом требуется дополнительный этап с целью регенерации экстрагента. Это приводит к усложнению процесса и введению дополнительных этапов в технологический процесс. Актуальной задачей химической промышленности в рамках Индустрии 4.0 является развитие инновационных биотехнологических процессов, которые не использовались в 20 веке, но их внедрение позволяет обрабатывать и получать новые качественные материалы и вещества. Кроме того, инновационные технологии должны соответствовать принципам «зеленой химии».

Одной из таких технологий является сверхкритическая экстракция. Сверхкритическая экстракция является ресурсо- и энергосберегающей технологией, которая позволяет отказаться от дорогостоящих органических растворителей, сократить время процесса за счет ускоренного массопереноса, вести процесс при низких температурах. Экстракты, получаемые с помощью сверхкритической экстракции, обладают антиоксидантными, антисептическими, антибактериальными, противогрибковыми свойствами в большей степени, чем экстракты, полученные традиционными методами [1].

На базе кафедры химического и фармацевтического инжиниринга РХТУ разработана установка и методика проведения экспериментальных исследований сверхкритической экстракции целевых компонентов из женьшеня, аралии и якорцев [2, 3]. В полученных экстрактах содержатся целевые компоненты, при этом их массовый выход увеличился по сравнению с экстрактами, полученными традиционными методами. Сокращение этапов позволило уменьшить энергетические затраты на проведение процесса сверхкритической экстракции и сохранить целостность БАВ.

Применение новых сверхкритических технологий в промышленном масштабе для получения БАВ из растительного сырья является крайне актуальной задачей, которая позволит, во-первых, получить новые соединения для фармацевтики, во-вторых, создать новое оборудование для процесса сверхкритической экстракции.

*Работа выполнена в рамках программы развития РХТУ им. Д.И. Менделеева "Приоритет-2030".*

### Литература

1. Гумеров. Ф.М. Сверхкритические флюидные технологии. Экономическая целесообразность. Монография. Серия "Бутлеровское наследие". – Казань: Издательство ООО "Инновационно-издательский дом "Бутлеровское наследие". – 2019. – 440 с.
2. Артемьев А.И. Сверхкритическая экстракция биологически активных веществ из аралии, женьшеня и мультифитоадаптогена: дисс... канд. тех. наук: 2.6.13 / Артемьев Артем Ильич; науч. Рук. Н.В. Меньшутина; РХТУ. – Москва, 2022. – 123 с.
3. Меньшутина Н.В. Исследование извлечения биологически активных веществ из растительного сырья с помощью сверхкритических технологий / Н.В. Меньшутина, И.В. Казеев, А.И. Артемьев, И.И. Худеев, П.А. Флегонтов // Вестник Тамбовского государственного технического университета. – 2022. – Т. 28. – №. 1. – С. 66–75.

## АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ ИЗ ПРЕСНОВОДНЫХ БИОТОПОВ

Е.Н. Капаруллина, Н.В. Доронина

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Россия

Метанол – естественный метаболит растений, промежуточный продукт окисления метана метанотрофами и деметилирования органических соединений гетеротрофами, а также производится крупнотоннажно и широко используется в промышленности. Испаряясь, метанол поступает в атмосферу и с осадками возвращается в различные биотопы. Метанол служит источником углерода и энергии для облигатных метилотрофных бактерий и факультативных, которые используют различные полиуглеродные субстраты. Метилотрофы играют важную экологическую роль, утилизируя  $C_1$ -субстраты и представляют биотехнологический интерес для целей биосинтеза, биокатализа, биодegradации и биодетекции.

Цель работы – выделение чистых культур метилотрофных бактерий из пресных водоемов и рек различных регионов России и определение их филогенетического положения.

Выделение метилотрофов проводили из образцов воды прудов, скважин и рек. 10 мл образца вносили в 200 мл минеральной среды «К» с 1 % метанола в качестве единственного источника углерода и энергии при 28 °С. Чистые культуры выделяли из единичных колоний с агаризованной среды «К» 1 % метанола. Филогенетическое положение штаммов определяли известными методами [1]. Из пресноводных биотопов выделили 11 штаммов (Таблица 1), которые оказались облигатными метилотрофами и не росли на богатых средах (пептон, сусло-агар, глюкозо-картофельный агар).

Таблица 1. Аэробные метилотрофные бактерии из различных водоемов

Источник выделения	Штамм	Филогенетическое положение на основании секвенирования гена 16S рРНК
Большое Городское озеро (г. Соль-Илецк, Оренбургская область)	1Col	99.7 % <i>Methylophilus quaylei</i> MTT
Пресный водоем г. Гурзуф (Крым)	LTK	100 % <i>Methylophilus aquaticus</i> sp.nov.
Река Пьезуапсе (г. Лазаревское)	2PPO	100 % <i>Methylophilus flavus</i> ShipT
Река Пьезуапсе (г. Лазаревское)	1P	99.3 % <i>Methylophilus methylotrophus</i> NCIMB 10515T
Река Ангара	3Ang	99.3 % <i>Methylophilus methylotrophus</i> NCIMB 10515T
Река Енисей	5En	100 % <i>Methylovorus glucosotrophus</i> DSM 6874T
Река Обь	7Ob	99.9 % <i>Methylovorus glucosotrophus</i> DSM 6874T
Большой пруд, д. Вязицы (близ г. Пушкино)	BPV	99.4 % <i>Methylophilus methylotrophus</i> NCIMB 10515T
Пруд СНТ «Ока» (г. Пушкино)	СНТ-О	99.5 % <i>Methylophilus methylotrophus</i> NCIMB 10515T
Суворовский карьер (Тульская область)	Suv	99.9 % <i>Methylovorus glucosotrophus</i> DSM 6874T
Пруд (г. Пушкино)	3M-1	99.5 % с <i>Methylophilus quaylei</i> MTT

По данным секвенирования гена 16S рРНК штаммы 1Col, LTK, 2PPO, 1P, 3Ang, BPV, СНТ-О и 3M-1 проявили наибольшее сходство (99.3–100 %) с представителями рода *Methylophilus*. Штаммы 5En, 7Ob и Suv оказались наиболее близки (99.5–100 %) с представителем рода *Methylovorus glucosotrophus* DSM 6874<sup>T</sup>. Таким образом, установлено, что в пресноводных биотопах России наиболее распространены представители родов *Methylophilus* и *Methylovorus*. Эти облигатные метилотрофы реализуют экономически наиболее выгодный рибулозомонофосфатный путь  $C_1$ -метаболизма, характеризуются высокой скоростью роста на метаноле и представляют интерес для ряда биотехнологий.

*Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (№ 075–15–2021–1051)*

## Литература

1. Kaparullina EN, Agafonova NV, Trotsenko YA, Doronina NV. *Methylophilus aquaticus* sp. nov., a new aerobic methylotrophic bacterium isolated from a freshwater reservoir. *Microbiology* 2018; **87**:672–680.

УДК 577.1

**КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА ЛОСЯ (ALCES ALCES), ПОЛУЧЕННОГО В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ****Д.В. Балабова<sup>1</sup>, В.Ю. Чиркова<sup>1</sup>, Е.А. Шарлаева<sup>1</sup>, Д.Н. Щербаков<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия<sup>2</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Химозины (ЕС 3.4.23.4) – представители семейства аспарагиновых пепсиноподобных протеаз, способные к специфичному гидролизу каппа-казеина в желудке млекопитающих в период раннего постнатального развития. Натуральный химозин, прежде всего, коровьего происхождения – молокосвертывающий фермент, традиционно используемый в сыроделии. Начиная с 90-х гг. XX века в производстве сыров стали применять генно-инженерный химозин коровы (*Bos taurus*), а позднее рекомбинантный химозин (рХн) одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*). Для каждого нового рекомбинантного фермента важно определить кинетические показатели, которые необходимы для более глубокой биохимической характеристики. Целью данной работы было установить параметры кинетики Михаэлиса-Ментен для рекомбинантного химозина лося (рХн-Alc), полученного в двух системах экспрессии – *Escherichia coli* и *Kluyveromyces lactis*.

Показатели кинетики Михаэлиса-Ментен определяли с помощью планшетного флуориметра-спектрофотометра CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия). Субстратом служил синтетический пептид следующего состава: Dabcyl-НРPHLSF-МАІРК (5-FAM) КК-NH<sub>2</sub> (Dabcyl = 4-(dimethylaminoazo) benzene-4-carboxylic acid, 5-FAM = 5-carboxyfluorescein) («CPC Scientific», США), соответствующий химозин-чувствительному участку к-казеина коровы. В качестве препарата сравнения использовали коммерческий рХн коровы (рХн-Bos) («Chr. Hansen», Дания).

Из данных представленных в таблице 1 видно, что кинетические параметры рХн лося, полученного в бактериальном и дрожжевом продуценте, отличались, как между собой, так и от контрольного препарата рХн.

Таблица 1 Параметры кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантных химозинов

Препарат	K <sub>m</sub> , мкМ	k <sub>cat</sub> , с <sup>-1</sup>	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> , мкМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
рХн-Bos	2,12±0,09	252,24±2,79	119,58±4,74
рХн-Alc (E. coli)	10,00±2,24	6,54±0,53	0,65±0,03
рХн-Alc (K. lactis)	4,69±0,27	98,69±4,55	21,11±0

Константа Михаэлиса (K<sub>m</sub>) рХн лося, полученного в разных системах экспрессии, существенно отличалась. Так рХн-Alc полученный в E. coli связывался с субстратом в 2 раза медленнее, чем рХн-Alc из K. lactis. Аффинность к субстрату этих ферментов уступала по данному показателю для рХн-Bos в 2,1 и 4,7 раза, соответственно.

Значение каталитической константы скорости (k<sub>cat</sub>) рХн лося, полученного в прокариотической системе экспрессии, в 15,1 раза уступало соответствующему показателю для химозина лося, полученного в эукариотической системе. Но данный показатель у рХн коровы оказался существенно выше, что указывает на более быстрое освобождение его от продуктов реакции. Значение каталитической эффективности фермента (k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>) было также выше у химозина лося, полученного в системе K. lactis (в 32,5 раза). Коммерческий химозин коровы по данному показателю превосходил рХн лося.

Таким образом, кинетические параметры рХн-Alc зависят от системы экспрессии, в которой он получен. Как известно, у про- и эукариотов фолдинг и посттрансляционный процессинг синтезируемых de novo рекомбинантных белков протекает по-разному. Именно этим могут быть обусловлены наблюдаемые различия в кинетике между рекомбинантным химозином лося, полученным в эукариотической системе (K. lactis) и ферментом, продуцированным прокариотической системой (E. coli).

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ PAENIBACILLUS POLYMUХА

А.Б. Балханова, С.В. Гомбоева

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия

Силикатные бактерии широко распространены в природе. Это обусловлено тем, что они синтезируют свою биомассу, усваивая углерод и азот из атмосферы, а фосфор и кремний – из соответствующих минералов, т.е. из источников питания, недоступных для других микроорганизмов [1]. *Paenibacillus polymyxa* представляет собой эндоспорообразующие силикатные бактерии, которые распространены в природе, имеют большое значение для сельского хозяйства. [3]

Микроорганизмы чувствительны к составу питательных сред. В процессе роста культуры состав среды меняется, что оказывает влияние на ее развитие и биосинтетическую способность. На сегодняшний день для культивирования силикатных бактерий используется алюмосиликат как источник кремния. Использование альтернативных источников кремния позволит расширить сырье в питательной среде для культивирования силикатных бактерий [2].

В связи с этим, целью исследования является определение влияния источника кремния на рост силикатных бактерий.

В качестве объекта исследования использовали культуры микроорганизмов *P. polymyxa*, штаммы ВСГУТУ 1 (RU 2 784 088 С1) и ВСГУТУ 2 (RU 2 782 953 С1), выделенные на кафедре «Биотехнология» ФГБОУ ВО ВСГУТУ.

Для культивирования *P. polymyxa* использовали селективную жидкую питательную среду Зака, в состав которой входит источник кремния – алюмосиликат, который меняли на жидкое стекло и глину (пересчет рецептуры проводили по количеству кремния). В качестве контроля использовали чистую среду без кремния. Культивирование силикатных бактерий проводилось при температуре  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , при постоянном перемешивании 100 об/мин, продолжительностью 5 суток. Статистическая обработка в программе Microsoft Excel.

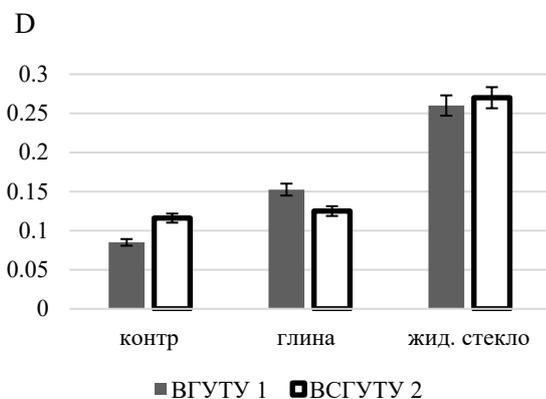


Рис. 1. Показатели роста силикатных бактерий

Результаты исследования показали, что источник кремния влияет на рост силикатных бактерий (рисунок 1). Наибольшее количество клеток было выявлено с жидким стеклом. Можно отметить наибольший показатель роста культуры ВСГУТУ 1 достиг на среде с жидким стеклом, а наименьший на среде без источника кремния. Наибольший показатель роста культура ВСГУТУ 2 достиг на среде с жидким стеклом, а показатели на среде с глиной сравним с контролем.

Выявлен рост силикатных бактерий на питательных средах с разным источником кремния. Наибольшее количество клеток накапливается у силикатных бактерий, культивируемых на питательной среде с жидким стеклом.

## Литература

1. Норбоева Б.Д., Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. Исследование физиолого-биохимических свойств фосфатмобилизирующих и силикатных бактерий // Биотехнология: Сб. науч. трудов. Вып.20. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГУТУ, 2013. – с. 14–19.
2. Микробиология культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студентов биологических специальных вузов / И.И Концевая; Министерство образования РБ, Гомельский государственный университет им Ф. Скорины – Черников: Десна Полиграф, 2017. – 44 с.
3. Padda, K.P., Puri, A., Chanway, C.P. (2017). *Paenibacillus polymyxa*.

УДК 504.72

## РАЗРАБОТКА БИООРГАНИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ГРУНТОВ РАЗЛИЧНОГО ТИПА

М.М. Герцен, Л.В. Переломов

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет им. Л.Н. Толстого», Тула, Россия

Присутствие нефтепродуктов в почвенных экосистемах оказывает значительное отрицательное влияние на состояние почвы и ее биологическое разнообразие. Углеводороды нефти воздействуют на почвенные микроорганизмы, отвечающие за биодоступность питательных веществ для растений, способствуя уменьшению их количества и снижению активности [1].

Цель работы – изучение детоксицирующих свойств гуминовых кислот и бактерий-нефтедеструкторов для разработки биоорганических композиций на их основе для ремедиации нефтезагрязненных грунтов различного типа. Объекты исследования – гуминовые кислоты (ГК) тростникового торфа Рязанской области, выделенные методом водно-щелочной экстракции. Бактерии *Pseudomonas fluorescens* 142NF [2]. Образцы серой лесной почвы и песка были загрязнены сырой нефтью (V уровень загрязнения – очень высокое содержание (9800 мг/кг)). Биодegradация нефтепродуктов изучалась по результатам измерения остаточного содержания нефтепродуктов методом флуориметрии [3]. Длительность ремедиации – 14 суток.

Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Таблица 1. Степень биодegradации нефтепродуктов (V уровень загрязнения (очень высокий))

Вариант опыта	Биодegradация, %					
	Песок			Серая лесная почва		
	5 суток	7 суток	14 суток	5 суток	7 суток	14 суток
Контроль	0	0	0	0	0	0
ГК	15	26	34	28	44	62
Ps.142 NF	10	18	24	21	38	61
«ГК+ Ps.142 NF»	18	30	41	29	48	80

Анализ динамики степени биодegradации показал, что и гуминовые кислоты, и бактерии *Pseudomonas fluorescens* 142NF эффективно деградируют сырую нефть во всех образцах нефтезагрязненных грунтов. Максимальная биодegradация соответствует применению биоорганической композиции и составляет от 38 до 80 % в зависимости от типа грунта. Различия в показателях степени биодegradации связаны с возможностью удерживания растворенных в воде ГК естественным гумусом серой лесной почвы, что ведет к ее постоянному насыщению нефтеразлагающими агентами в отличие от песка, пропускающего большую часть суспензии через весь объем.

### Литература

1. Bachmann R.T., Johnson A.C., Edyvean R.G.J. Biotechnology in the petroleum industry: an overview // International Biodeterioration & Biodegradation. 2014. V. 86. P. 225–237.
2. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Самойленко В.А. и др. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения // Патент России № 2007125403.2009. Бюл. № 13.
3. ПНД Ф 16.1:2.21–98. Количественный химический анализ почв и отходов. Методика измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв и грунтов флуориметрическим методом на анализаторе жидкости; Флюорат-02; М., 2012. 31 с.

**БИОГЕННЫЕ СЕРЕБРО-СОДЕРЖАЩИЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК БИОЦИДНЫЕ АГЕНТЫ  
НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ****О.А. Журавлева<sup>1</sup>, А.Ю. Власова<sup>1,2</sup>, А.И. Килочек<sup>3</sup>, Т.А. Воейкова<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «МИРЭА – РТУ», ИТХТ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Московский политехнический университет, Москва, Россия

Существующая на сегодняшний день проблема распространения мультирезистентных штаммов микроорганизмов диктует необходимость в разработке новых типов препаратов. Активное развитие нанотехнологии позволило получать различные виды серебро-содержащих наночастиц (NPs) с доказанными антимикробными свойствами. Ведутся исследования по подбору оптимальных методов получения NPs, среди которых набирает популярность «зеленый» биосинтез, основанный на использовании микроорганизмов, растений, водорослей, грибов в качестве восстановителей и стабилизаторов наночастиц. Преимуществом данного подхода является отсутствие химических стабилизаторов, роль которых выполняют белки, полисахариды и аминокислоты, выделяемые клетками биосубстратов и адсорбируемые на поверхность наноструктур. Биогенные Ag-содержащие NPs не уступают по характеристикам и биоцидной эффективности химически синтезированным аналогам, но характеризуются биосовместимостью с различными организмами [1].

В настоящей работе предложен эффективный способ получения коллоидной суспензии NPs<sub>Ag</sub> и NPs<sub>Ag<sub>2</sub>S</sub> из водного раствора азотнокислого серебра (AgNO<sub>3</sub>) или двухкомпонентной смеси солей AgNO<sub>3</sub> и тиосульфата натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) в присутствии живых клеток металл-восстанавливающей бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1.

Полученные NPs<sub>Ag</sub> и NPs<sub>Ag<sub>2</sub>S</sub> имели сферическую форму, размеры 15±5 и 7±2 нм, соответственно, кристаллическую структуру с подтвержденным элементным составом. Оба типа NPs имели отрицательный заряд поверхности в близких значениях ζ-потенциала –17...–22 мВ, что характеризует их как метастабильные коллоидные суспензии. На поверхности биогенных NPs идентифицированы белки *S. oneidensis* MR-1 в широком интервале молекулярных масс.

Цель работы – сравнительная оценка уровня антимикробной активности биогенных NPs<sub>Ag</sub> и NPs<sub>Ag<sub>2</sub>S</sub> в отношении тест-культур грам (+) бактерии *Bacillus licheniformis* (B-7360), грам (–) *Escherichia coli* K-12 (B-3345), *S. oneidensis* MR-1 (B-9861) и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Y-3251). Разработка способа получения препаративной формы наноматериала длительного хранения.

Установлено различие в показателе биоцидной активности Ag-содержащих NPs. Так, NPs<sub>Ag</sub> оказались наиболее эффективными ингибиторами роста грам (+) бактерии и дрожжей, тогда как NPs<sub>Ag<sub>2</sub>S</sub> воздействовали только на штамм грам (+) бактерии. Тест-культуры грам (–) бактерий оказались слабо восприимчивыми к действию обоих типов NPs.

Для NPs<sub>Ag</sub>, обладающих большей эффективностью в подавлении роста тест-культур, была успешно апробирована технология лиофилизации для получения новой сухой препаративной формы наноматериала с длительным сроком хранения. Показано сохранение функциональной биоцидной активности NPs<sub>Ag</sub> в лиофилизированной и восстановленной водной формах.

Полученные результаты представляют практический интерес для применения NPs<sub>Ag</sub> и NPs<sub>Ag<sub>2</sub>S</sub> биогенного происхождения как нового класса противомикробных средств направленного действия.

**Исследование проведено при поддержке утвержденного Тематического плана НИЦ КИ № 35.3.1-вн от 07.10.22. Бактериальные штаммы предоставлены БРЦ ВКПМ.**

## Литература

1. Salleh A., Naomi R., Utami N.D. et al. The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action // *Nanomaterials*. 2020. V. 10. № 8. 1566. <https://doi.org/10.3390/nano10081566>

УДК: 57.013: 57.036: 57.043: 635.24

**ДИНАМИКИ ТЕРМОДЕГИДРАТАЦИИ СЕМЯН НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ALLIUM L.****В.Н. Зеленков<sup>1,2</sup>, М.И. Иванова<sup>1</sup>**<sup>1</sup> *Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства, д. Верея, Россия*<sup>2</sup> *Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия*

Актуальность изучения закономерностей взаимосвязи обезвоживания семян различных лекарственных и овощных культур с химическим составом и особенностями морфологии и строения семенной оболочки, их структуры приобретает особое значение в настоящее время в связи с проблемой создания сортов с повышенной устойчивостью семян к термодегидратации. Интересным объектом для исследований в этом направлении являются семена луковых растений. Род *Allium* L. включает свыше 900 видов [1, 2], что делает его одним из крупнейших однодольных родов. Он состоит из 15 монофилетических подродов [3]. Это переменная группа, которая широко распространена по всей Голарктической области от сухих субтропиков до бореальной зоны [4]. Этот род имеет главный центр разнообразия в восточном Средиземноморье, а также Юго-Западной и Центральной Азии [5]. Виды *Allium* во всем мире очень важны как овощные, лекарственные и декоративные растения [6]. Установлен высокий уровень морфологического разнообразия семян в роде *Allium* [7]. Семенная оболочка является основной защитой семян от неблагоприятных условий окружающей среды. Твердый слой семян защищает семена не только от механического воздействия, но и от проникновения микроорганизмов, а также от колебаний температуры и влажности во время хранения. Фенольные соединения в семенной оболочке способствуют твердости семян и подавлению роста микроорганизмов. Во время прорастания оболочка защищает семена от гидратации и утечки электролита [8]. Виды рода *Allium*, выбранные нами в качестве объекта исследований, имеют большое биоресурсное значение (декоративные, пищевые, витаминоносные, лекарственные, медоносные) и испытывают негативное антропогенное воздействие. Для сравнительного изучения термодегидратации семян представляют интерес лук-слизун и лук душистый, с существенными различиями как по морфологии семян так и по содержанию. В них запасных питательных веществ как по количественному, так и по качественному химическому составу.

Лук-слизун (*A. nutans*) – многолетнее короткочерневищное растение. Черневище толстое, горизонтально ползучее. Листья широколинейные, плоские, 10–15 (20) мм шириной, сжатые при основании стебля. Весенне-летне-осенне-зеленый вид. Отрастает в мае. Цветет в конце июля – начале августа. Семена созревают в сентябре. Размножается семенами и вегетативно. Семена округло-трапециевидные, черные, блестящие, размером 2,8x1,8 мм. Масса 1000 семян составляет около 2,5 г. В 1 г 400 семян [9].

Лук душистый (*A. ramosum*) – многолетнее, луковича узколинейная, диаметром 0,8–1,5 см, прикреплена к черневищу. Листья длинные 35–60 см, плоские, мясистые, шириной 0,8–1,2 см, темно-зеленого цвета, со слабым восковым налетом. На одном побеге 6–12 общей массой 35–70 г. Цветет на второй год в июле-августе. Зрелые семена плосковыпуклые, экзотестальные, с хорошо развитым, дифференцированным на органы зародышем, большую часть которого составляет длинная, закрученная в халазальной части семядоля, терминальный конец которой имеет плотный контакт с клетками эндосперма и характеризуется гаусториальной функцией. Большая часть семени заполнена клеточным эндоспермом, клетки которого содержат большое количество запасных питательных веществ. В образовании семенной кожуры принимает участие только наружный интегумент. При этом инициация данного процесса связана с процессом клеткообразования в эндосперме. В клетках его наружной эпидермы начинают утолщаться клеточные стенки за счет отложения веществ, обеспечивающих механическую и защитную функцию [10]. Размер семени 3,66x2,65 мм. Масса 1000 семян до 4,3 г. В 1 г до 230 семян [9].

Данное исследование также является продолжением наших работ в направлении изучения динамики термодегидратации различных вегетативных частей лекарственных, сельскохозяйственных и природных популяций растений и их семян и отработки методологии определения параметров физико-химического и биофизического описания удаления воды из различных вариантов образцов растительного происхождения [11–15].

### Материалы и методы

В тесте обезвоживания исследовали семена лука душистого (*Allium ramosum* L., подрод *Butomissa*, секция *Butomissa*) сорта Джусай и лука-слизуна (*Allium nutans* L., подрод *Rhizirideum*, секция *Rhizirideum*) сорта Грин из биоколлекции Всероссийского научно-исследовательского института овощеводства – филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства». Оба вида являются пищевыми. Исследования проводили в 2019 г. на семенах урожая 2015 г. Динамики обезвоживания семян получали, определяя показатели остаточной влажности цельных семян во времени досушивания при 105°C при непрерывном взвешивании на анализаторе влажности MX-50, A&D Company, Япония. Досушивание до постоянной массы образцов проводили с использованием инфракрасного излучателя. Эксперимент после начала сушки проводили в контролируемом режиме с использованием автоматической записи данных по остаточной влажности образцов (с временным шагом в 10 сек) на компьютере, с последующей их обработкой). В построении графиков использовали данные динамики удаления воды в % относительно массы исходного образца для лука душистого 68 экспериментальных значений, а для лука-слизуна – 93.

### Результаты и их обсуждение

На рис. 1 приведена динамика сушки при 105 °C семян лука душистого сорта Джусай и лука-слизуна сорта Грин. Кривую обезвоживания можно описать логарифмической зависимостью остаточной влажности от времени обезвоживания с аппроксимацией не ниже 0,99.

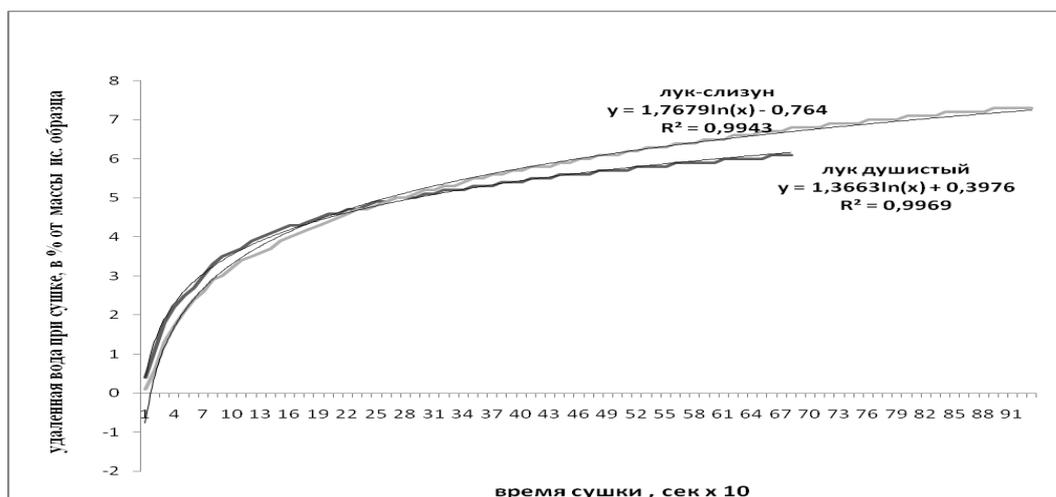


Рисунок 1 – Динамики ИК-сушки при 105 °C для семян лука душистого (*Allium ramosum* L., подрод *Butomissa*, секция *Butomissa*) сорта Джусай и лука-слизуна (*Allium nutans* L., подрод *Rhizirideum*, секция *Rhizirideum*) сорта Грин

Как видно из рис. 1, каждый сорт луковых культур имеет характерную динамику удаления воды при ИК-обезвоживании до постоянной массы образцов при температуре 105 °C. Кривые обезвоживания семян для образцов различных луков при 105 °C с высокой достоверностью (не менее 0,99) описываются логарифмическими уравнениями.

Однако, интерпретация процесса обезвоживания в этом варианте обработки кривых дает только одну информацию о большей скорости удаления воды из семян лука душистого на первом этапе сушки (до пересечения 2-х кривых) по сравнению с луком-слизуном. На втором этапе семена лука душистого быстрее теряют воду по сравнению с семенами лука-слизуна и быстрее выходят на время достижения постоянного веса при заданной температуре обезвоживания.

Другой вариант обработки динамики дегидратации семян луков – графическое представление динамики процесса термодегидратации как совокупность 4-х прямолинейных участков, которые можно описать уравнениями линейной регрессии с коэффициентами корреляции  $R^2 \geq 0.95$ . Иллюстрация этого приведена на рис. 2 для варианта с семенами лука душистого. Аналогично, эта картина наблюдается и для семян лука-слизуна.

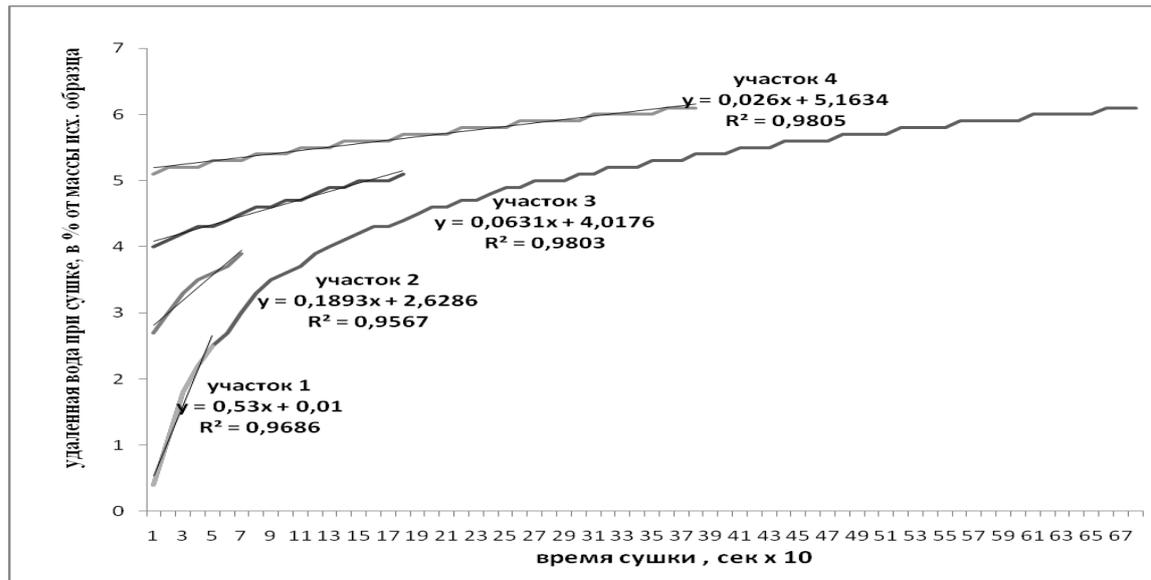


Рисунок 2 – Динамика ИК-сушки при 105 °C для семян лука душистого (*Allium gamosum* L., подрод *Vutomissa*, секция *Vutomissa*) сорта Джусай

Ранее нами было показано, что этот методический прием разбивки кривых динамик термодегидратации на 4-е прямолинейных участка можно применять и для других растительных объектов исследований, таких как зубцы и зелень чеснока, листья и клубни топинамбура, надземной части различных лекарственных растений а также и для их фармакопейных сборов [11–16].

Наклон каждого участка соответствует тангенсу угла наклона участка с временной осью ординат и в уравнении линейной регрессии соответствует коэффициенту  $a$  первого члена уравнения.

Как видно из рисунка 2, наблюдается высокая достоверность аппроксимации результатов обезвоживания 4-мя линейными участками с соответствующими уравнениями линейной регрессии, характеризующими скорости обезвоживания на каждом участке и достоверность этой модели экспериментальным данным.

Анализ кривых сушки по скоростям для каждого линейного участка (расчет скоростей обезвоживания в %/мин) приведен в таблице.

Таким образом, можно предварительно говорить о различиях между семенами лука душистого и лука-слизуна исходя из структуры семенных оболочек и химического состава, что по каждому варианту образцов семян луков характеризуется по 4-м участкам с постоянными скоростями термодегидратации (удаление воды) с различиями между сортами в 33,7; 59,5 и 23,2 %, соответственно по 1,2 и 3-му участкам динамик. По 4-му участку различия для 2-х сортов луковых культур составили 1,2 %, что, по-видимому, связано с сопоставимостью химического состава семян по низкомолекулярным углеводам, имеющих наибольшую энергетическую составляющих взаимодействия с молекулами воды на последнем участке динамики термодегидратации. Для 2-го и 3-го участков динамик существенные различия, вероятнее всего, связаны со специфичностью веществ, составляющих белково-углеводные-жировые компоненты для этих участков термодегидратации. 1-й участок термодегидратации, вероятнее всего, связан с удалением адсорбированной, слабосвязанной воды в структуре семян и его количественные характеристики по влагоудержанию больше всего зависят от фактора структурной организации оболочки семян.

Выделение в динамике обезвоживания вышеприведенных семян 2-х сортов луковых культур 4-х фракций воды на основе анализа 4-х линейных участков динамик, по мнению авторов, позволит в дальнейшем связать эти фракции воды с химическими компонентами, характерными для сорта и специфичностью «влагоудержания» за счет структурно-химических особенностей семян для каждой культуры лука. Одним из путей реализации этого подхода может быть введение в эксперимент химических соединений – маркеров и экспериментальное определение их динамик, а также стандартного образца – маркера по структуре семени для луковых культур.

Таблица 1. Значения скоростей удаления воды (%/мин) по участкам динамик обезвоживания образцов семян лука душистого (*Allium ramosum L.*, подрод *Butomissa*, секция *Butomissa*) сорта Джусай и лука-слизуна (*Allium nutans L.*, подрод *Rhizirideum*, секция *Rhizirideum*) сорта Грин при 105 °С.

	Участок 1 динамики	Участок 2 динамики	Участок 3 динамики	Участок 4 динамики
Семена лука душистого, сорт Джусай	3,180 %/мин	1,136 %/мин	0,379 %/мин	0,156 %/мин
Значение R <sup>2</sup> для семян лука душистого, сорт Джусай	0,97	0,96	0,98	0,98
Семена лука-слизун, сорт Грин	2,378 %/мин	0,712 %/мин	0,307 %/мин	0,154 %/мин
Значение R <sup>2</sup> для семян лука-слизуна сорта Грин	0,97	0,99	0,98	0,98
Соотношение скоростей удаления воды из семян лука душистого к удалению воды из семян лука-слизуна	1,337	1,596	1,234	1,013

### Заключение

В данной работе предложен алгоритм определения динамик термодегидратации для цельных семян луковых культур на примере лука душистого (*Allium ramosum L.*, подрод *Butomissa*, секция *Butomissa*) сорта Джусай и лука-слизуна (*Allium nutans L.*, подрод *Rhizirideum*, секция *Rhizirideum*) сорта Грин с описанием кривой обезвоживания цельных семян 4-мя линейными участками. Предполагается взаимосвязь такой картины динамик термодегидратации со специфичностью химического состава семян и строением их оболочек.

Определены скорости удаления воды для двух сортов луковых культур. Показано, что соотношение скоростей обезвоживания для разных сортов позволяет количественно характеризовать их различия по 4-м линейным участкам динамик удаления воды характеризующих влагоудерживающую способность оболочек и специфичность химического состава семян.

### Литература

1. Fritsch R.M., Abbasi M. (Eds). A taxonomic review of *Allium* subgenus *Melanocrommyum* in Iran. Halberstädter Druckhaus GmbH, Gatersleben, Germany, 2013. 240 pp.
2. Govaerts R., Kington S., Friesen N., Fritsch R., Snijman D.A., Marcucci R., Silverstone-Sopkin P.A., Brullo S. World checklist of Amaryllidaceae. 2013, p. 2005–2014. <http://apps.kew.org/wcsp/>.
3. Huang D.Q. et al. Phylogenetic reappraisal of *Allium* subgenus *Cyathophora* (Amaryllidaceae) and related taxa, with a proposal of two new sections. *Plant Res.* 2014. V. 127. 275–286. doi: 10.1007 / s10265–013–0617–8
4. Keusgen M., Kusterer J., Fritsch R.M. *Allium* species from Middle and Southwest Asia are a rich source for Marasmin. *J. Agr. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 8289–8297. doi: 10.1021 / jf201052u
5. Fritsch R.M., Friesen N. Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabinowitch, H.D. and Currah, L. (Eds). *Allium Crop Science: Recent Advances*. CAB International, Wallingford, UK, 2002. Pp. 5–30.
6. Herden T., Hanelt P., Friesen N. Phylogeny of *Allium L.* subgenus *Anguinum* (G. Don. ex W.D.J. Koch) N. Friesen (Amaryllidaceae). *Mol. Phyl. Evol.* 2016. V. 95. P. 79–93. doi: 10.1016 / j.ympev.2015.11.004
7. Bednorz L., Krzyżmińska A., Czarna A. Seed morphology and testa sculptures of some *Allium L.* species (Alliaceae). *Acta Agrobotanica.* 2011. Vol. 64 (2): 33–38.
8. Mohamed-Yasseen, Y., Barringer, S.A., Splittstoesser, W.E. et al. The role of seed coats in seed viability. *Bot. Rev.* 1994. 60: 426. <https://doi.org/10.1007/BF02857926>
9. Тухватулина Л.А., Абрамова Л.М. Семенная продуктивность некоторых видов рода *Allium L.* при интродукции в Уфе. Бюллетень Главного ботанического сада. 2012. № 3. С. 2–7.
10. Батыгина Т.Б., Виноградова Г.Ю. Феномен полиэмбрионии. Генетическая гетерогенность семян. *Онтогенез.* 2007. Т. 38. № 3. С. 166–191.
11. Зеленков В.Н. Особенности динамики обезвоживания срезов редьки зеленой при инфракрасном облучении. Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сборник научных трудов. Выпуск 22 – М.: РАЕН, 2015. С. 109–115.
12. Зеленков В.Н., Лапин А.А., Поляков А.В. Особенности динамики обезвоживания разных сортов чеснока отечественной и зарубежной селекции при инфракрасной сушке. Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сборник научных трудов. Выпуск 23 – М.: РАЕН, 2016. С. 121–129.
13. Зеленков В.Н., Поляков А.В. Особенности удаления воды из зубцов чеснока разных сортов при инфракрасном облучении при 105 С // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: сборник научных трудов по материалам XIII Международного симпозиума. – Москва: РУДН, 2019. – с. 164–166. DOI: 10.22363/09509–2019–164–166
14. В.Н. Зеленков, А.А. Лапин, Е.В. Ферубко, Т.Д. Даргаева Динамики удаления воды из растительного сбора желчегонного действия при инфракрасном облучении при 1050 С. *Актуальная биотехнология.* № 3 (30), 2019, с. 348–352.
15. В.Н. Зеленков Е.В. и др. Анализ динамик удаления воды из растительного сбора гепатопротективного действия при инфракрасном излучении при досушивании образцов. Сборник трудов II Межд. науч. конф. «Роль метабономики в совершенствовании биотехнологических средств производства». 6–7 июня 2019 г., ФГБНУ ВИЛАР С. 267–273
16. Зеленков В.Н., Павлов М.Н., Усанова З.И. Динамики удаления воды из листьев и клубней топинамбура сорта Интерес при инфракрасном облучении при 105<sup>0</sup> С. // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: сборник науч. трудов по материалам XIII Межд. симпозиума. Москва: РУДН, 2019. – с. 173–175. DOI: 10.22363/09509-2019-173-175.

УДК 633.8

**ПРЕДПОСЕВНАЯ ОБРАБОТКА СЕМЯН НЕКОТОРЫХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР  
ГИДРОТЕРМАЛЬНЫМ НАНОКРЕМНЕЗЕМОМ****В.Н. Зеленков<sup>1,2</sup>, В.В. Латушкин<sup>3</sup>, В.В. Потапов<sup>4</sup>, В.М. Косолапов<sup>5</sup>, Б.И. Сандухадзе<sup>6</sup>**<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства, д. Верей, Россия<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия<sup>3</sup> Институт стратегий развития, Москва, Россия<sup>4</sup> Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН, г. Петропавловск-Камчатский, Россия<sup>5</sup> Федеральный научно-исследовательский центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса, г. Лобня, Россия<sup>6</sup> Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», п. Новоивановское, Московская область, Россия

В последние годы активно развивается направление практического использования нанотехнологий в сельскохозяйственном производстве и изучение механизмов влияния наночастиц на растения. В связи со сложной экологической ситуацией необходим поиск природоподобных, экологически чистых препаратов. Большое значение имеет время обработки растений. В начальный период роста и развития растений (период прорастания семян) еще не сформированы фотосинтезирующие структуры и преобладает гетеротрофное питание. Особенности влияния на семена злаковых культур наночастиц гидротермального кремнезема недостаточно изучены.

Цель работы – изучение особенностей применения гидротермального нанокремнезема для предпосевной обработки семян некоторых злаковых культур.

Водные золи наночастиц гидротермального кремнезема (ГНК) получали методом ультрафильтрации из гидротермальных растворов скважин Мутновской геотермальной электростанции (Россия, Камчатский край). Объектами исследований являлись семена и ростки растений, относящихся к сем. мятликовые (*Poaceae*): пшеница мягкая озимая (*Triticum aestivum* L), сорт Московская 56 селекции ФИЦ «Немчиновка»; полевица гигантская (*Agrostis gigantea* Roth), сорт ВИК-2, овсяница луговая (*Festuca pratensis* Huds.), сорт Кварта и межродовой гибрид Аллегро, относящийся к гибриднему роду фестулолиум (*X Festulolium* F. Aschers. et Graebn.) селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса».

Предпосевная обработка семян четырех культур злаковых гидротермальным нанокремнеземом способствовала повышению энергии прорастания семян от 1 до 5 % по разным культурам, всхожесть – на 1,6–5 %, высоты ростков в конце периода проращивания – на 4.0–22.2 %, наземная сырая биомасса 100 ростков – на 13.1 до 53.6 %. Наблюдался сложный характер взаимодействия наночастиц кремнезема и растений в зависимости от концентрации его золь при обработке семян и генетических особенностей культуры. Так, прирост биомассы по разным культурам составил от 13.1 % (овсяница) до 53.6 % (полевица). Максимальный прирост отмечен для ростков полевицы (53.6 %) в то время, как для остальных изученных культур 13.1 – 16.3 %. Для разных концентраций ГНК (0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,001 %, 0,0005 % и 0,0001 %) установлено, что прирост биомассы ростков по сравнению с контролем изменялся по семенам пшеницы от 7.9 до 16.7 %, овсяницы 1.4–13.1 %, фестулолиума 4.2 – 16.3 %, полевицы 0–53.6 %.

Таким образом, установлено значительное различие ответных реакций семян и ростков злаковых культур на воздействие ГНК в зависимости от вида растения и концентрации золь наночастиц. Это говорит о необходимости разработки дифференцированных (сортовых) технологий предпосевной обработки ГНК. Полученные в эксперименте данные могут быть полезны не только при разработке технологий выращивания сельскохозяйственных культур в открытом и защищенном грунте, но также при разработки получения новых функциональных видов продукции – микрорезлени.

## СУММАРНАЯ АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СОИ ПРИ ТЕМНОВОМ ПРОРАЩИВАНИИ СЕМЯН

**В.Н. Зеленков<sup>1,2</sup>, В.В. Латушкин<sup>3</sup>, В.Т. Синеговская<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства, д. Верей, Россия

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт стратегий развития, Москва, Россия

<sup>4</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сои, г. Благовещенск, Россия

Вопросы биологической трансформации при прорастании семян, в частности, по суммарному содержанию антиоксидантов для белково-масличных культур, таких, как соя (*Glycine max* (L.) Merrill), до настоящего времени остаются недостаточно изученными. При прорастании семян происходит существенная трансформация запасных питательных веществ семени, сопровождающаяся изменением химического состава и биологических свойств исходных семян. Основу для запуска биохимических механизмов прорастания семян сои представляют запасующие белковые и липидные структуры, что приводит к специфичности метаболизма. Высокая пищевая ценность сои обуславливается не только большим содержанием белков и липидом а содержанием в растении в целом и его частях антиоксидантов.

Цель работы – сравнительное определение антиоксидантной активности семян и ростков сои при темновом проращивании.

Объектами исследований являлись семена и ростки сои *Glycine max* (L.) Merrill, сорта Алена селекции Института сои (Россия, г. Благовещенск). Анализы ростков проводили отдельно для семядолей и гипокотила. Методика проращивания семян соответствовала национальному стандарту РФ ГОСТ 12038–84. Проращивание проводили в темноте при температуре 23–24<sup>0</sup> С в течение 7 суток. Суммарную антиоксидантную активность (САОА) определяли кулонометрическим методом на приборе «Эксперт-006» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия) по аттестованной методике в пересчете г рутина на 100 г. образца на сухой (с.о) или абсолютно сухой (а.с.о) образец (Зеленков В.Н., Лапин А.А. МВИ-001–44538054–07. Суммарная антиоксидантная активность. Методика выполнения измерений на кулонометрическом анализаторе. ВНИИовощеводства. Верей, Московской обл., 2013. 19с)

Суммарная антиоксидантная активность разных частей семени различается (табл.). САОА семенной кожуры примерно в 2 раза ниже САОА зародышевых структур. В целом антиоксидантная активность семян сои выше на 12 % по сравнению с ростками.

Таблица 3 – Суммарная антиоксидантная активность различных частей растения сои

часть растения	W (%)	САОА, г Ру на 100 г. с.о.	САОА, г Ру на 100 г. а.с.о.
семенная кожура	10,0	2,647±0,065	2,941±0,072
зародыш	5,58	5,359±0,082	5,676±0,087
семя в целом	5,7 %	4,907±0,080	5,359±0,083
ростки	-	4,342±0,078	-

Разные части семени обладают неодинаковой активностью (у семенной кожуры она в два раза меньше, чем у других частей семени). Полученная в эксперименте информация может быть использована как в практическом плане (при разработке технологий предпосевной подготовки семян, а также при выращивании нового вида функциональной продукции – микрозелени), так и в теоретическом (изучение механизмов трансформации химических веществ семян сои и формировании и их трансформации при проращивании и формировании ростков и листьев растений).

УДК 615.277

**КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ КДНК ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА***А.В. Зубков, А.А. Корноухова, Н.С. Кузьмина, А.В. Сидоров, Л.Г. Бутова, О.А. Свитич**ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия***Введение**

Тиреоглобулин человека (ТГ) – это гликопротеин с молекулярной массой 660 кДа, образующийся в фолликулярных клетках щитовидной железы и секретирующийся в просвет фолликула, где непосредственно участвует в синтезе гормонов щитовидной железы: тетраiodотиронина (Т4) и триiodотиронина (Т3). Синтез гормонов происходит при непосредственном участии пероксидазы щитовидной железы – фермента, расположенного на апикальной части тиреоцита и при непосредственном контакте с тиреоглобулином, формирующей гормоны Т4 и Т3. После отщепления от тиреоглобулина гормонов ЩЖ, гликопротеин подвергается расщеплению и эндоцитозу, однако некоторое количество может поступать в кровоток. Клетки щитовидной железы – единственный источник тиреоглобулина в организме, поэтому определение ТГ в крови пациентов с дифференцированным раком щитовидной железы, после тиреоидэктомии, является прогностическим фактором развития рецидива и метастазов. Основные методы определения концентрации ТГ и антител к нему – различные варианты иммунохимических анализов [1, 2]. До последнего времени для создания диагностических тест-систем, основанных на методе ИФА, как правило, использовался нативный тиреоглобулин, источником которого является ткань щитовидной железы человека, но гетерогенность человеческого ТГ влияет на иммунореактивность белка и, соответственно, на правильность результатов диагностических тестов, основанных на взаимодействии антиген-антитело [3, 4]. Из-за крупных размеров молекулы ТГ и необходимости посттрансляционных модификаций, которые включают в себя гликозилирование и образование дисульфидных связей практически невозможно получить рекомбинантный ТГ в традиционных прокариотических системах. [3]

Альтернативой может стать получение не цельного белка, а фрагментов, характерных для нативного тиреоглобулина. Один из способов получения фрагментов рекомбинантного тиреоглобулина конструирование экспрессирующей системы с помощью трансформации прокариотических клеток экспрессирующим вектором, содержащим фрагмент кДНК гена тиреоглобулина. Для крупных фрагментов ТГ, требующих посттрансляционных модификаций возможно применение эукариотических клеточных линий, трансфицированных экспрессирующим вектором.

Данная работа посвящена одной из ключевых стадий получения вектора для экспрессии фрагмента гена ТГ, включающую в себя амплификацию соответствующей нуклеотидной последовательности методом клонирования в прокариотической системе и установление соответствия клонированного участка гена последовательности, опубликованной в базах данных.

**Актуальность и цель работы:**

По данным онкологической службы России в 2020 году на рак щитовидной железы приходилось 8,3 % случаев онкологических заболеваний у пациентов в возрасте до 30 лет. Также с 2010 года по 2020 год наблюдался значительный прирост заболеваемости, который составил 3,54 %. Смертность в 2020 г. составила 940 человек на 100 000 населения, среди них 281 мужчина и 659 женщин [5]. При этом большинство случаев злокачественных новообразований (более 90 %) представлено дифференцированным раком щитовидной железы (ДРЩЖ), к которому относят папиллярный рак щитовидной железы и фолликулярный рак щитовидной железы. [6] На начальном этапе лечения многие пациентов с данным заболеванием проходят процедуру полной тиреоидэктомии, и измерение уровня тиреоглобулина (ТГ) в крови после операции – это эффективный способ мониторинга наличия или отсутствия рецидива для долгосрочного наблюдения, помогающий выстроить стратегию дальнейшего лечения. Высокий уровень ТГ в крови после операции считается критерием рецидива или неполного удаления ткани щитовидной железы, так как тиреоциты являются единственным источником данного белка в организме, поэтому после полной тиреоидэктомии содержание ТГ в крови должно постепенно снизиться до нулевого значения. Учитывая минимальный предел количественного определения распространенных коммерческих диагностических тестов, считается, что у пациента отсутствует рецидив, если уровень ТГ в крови ниже 1 нг/мл. [6]

Цель работы – клонирование фрагментов гена тиреоглобулина человека в клетках прокариот, получение и анализ генно-инженерных конструкций, содержащих различные участки тиреоглобулина, что позволит получать рекомбинантные белки, содержащие N и C концевые участки тиреоглобулина, что позволит совершенствовать диагностику и расширить понимание патогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы.

В работе были поставлены следующие задачи: выделить тотальную РНК из ткани щитовидной железы и синтезировать двухцепочную кДНК методом обратной транскрипции ОТ-ПЦР на матрице мРНК ТГ; получить фрагменты экспрессирующей последовательности гена ТГ методом ПЦР на матрице кДНК; сконструировать клонирующий вектор, содержащий фрагменты экспрессирующей последовательности гена ТГ; клонировать полученный вектор в клетках *E. coli* штамм XL1-Blue; провести анализ полученной генно-инженерной конструкции.

### **Материалы и методы**

Объект исследования: ткань ЩЖ, полученная от пациента. Выделение мРНК: ткань ЩЖ замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Нуклеиновые кислоты очищали от белков и разделяли методом ультрацентрифугирования при 100 000 g в градиенте цезия хлорида. Для получения кДНК использовали ферментативный синтез двухцепочечной кДНК на poly (A)+ – мРНК.

Для трансформации использовали компетентные клетки *Escherichia coli*, штамм XL1 Blue («Евроген», Россия).

Олигонуклеотидные праймеры были подобраны на основе последовательностей нуклеотидов, собранных в Gen Bank с использованием онлайн-программы Primer Blast. Синтезировали пять пар праймеров на различные участки, соответствующие кДНК гена ТГ: первый участок размером 588 п.н. (7381–7968 п.н.), второй участок размером 770 п.н. (7244–8013 п.н.), третий участок размером 864 п.н. (2297–3160 п.н.), четвертый участок размером 902 п.н. (4629–5530 п.н.), пятый участок размером 833 п.н. (5529–6361 п.н.) Олигонуклеотиды для амплификации участков кДНК гена ТГ были синтезированы компанией «Евроген» (Россия). Дизайн олигонуклеотидов проводили в программе Blast NCBI. В качестве матричной последовательности использовали последовательность мРНК тиреоглобулина NM\_003235.5, опубликованную в базе данных GeneBank.

Методом ПЦР проведена амплификация фрагментов ДНК различной длины, содержащих участки нуклеотидной последовательности кДНК гена ТГ, для последующего клонирования в векторные системы. проводили с помощью ПЦР – амплификатора T-100 (Bio-Rad). Полученные ПЦР-продукты и пробы ДНК (на этапах клонирования) разделяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле. ПЦР – продукты выделяли из геля агарозы с помощью набора реактивов Cleanup Standart по методике, рекомендованной производителем.

Реакцию лигирования проводили с помощью набора Quick-TA kit без предварительной обработки рестриктазами в соответствии с инструкцией к набору. Для клонирования полученных ПЦР – продуктов и контроля экспрессии были использованы векторы: pAL2-T, pVax1.

### **Результаты и обсуждение**

Контроль РНК, выделенной из ткани щитовидной железы, и синтез кДНК гена ТГ.

Выделение тотальной РНК проводили согласно методике, описанной в материалах и методах. Выделенные из ткани щитовидной железы (ЩЖ) семь различных образцов тотальной РНК были разделены методом электрофореза в 1,5 % в геле агарозы при напряжении 75 В. Полученная электрофореграмма образцов РНК представлена на рисунке 1.

На матрице выделенной poly(A) – мРНК провели ферментативный синтез двухцепочечной кДНК, включая синтез первой и второй цепи и расщепление петли, связывающей цепи кДНК, нуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. Синтез первой цепи кДНК проводили с помощью РНК-зависимой ДНК полимеразы, олиго 3'-праймера, содержащего олиго(dT) последовательность и олигонуклеотидного адаптера, содержащего олиго(dG) последовательность на 3'-конце. Для синтез второй цепи кДНК использовали метод ПЦР с ДНК-полимеразой I *E. coli* и праймером M13, соответствующим внешней части олигонуклеотидного адаптера и 3'-праймера. Препарат кДНК хранили при температуре минус 20 °С.

В качестве матрицы для амплификации была использована кДНК из ткани щитовидной железы, синтезированная ранее. С целью оптимизации условий проведения ПЦР для амплификации описанных участков экспрессирующейся последовательности кДНК гена ТГ человека использовали градиент температуры на стадии отжига праймеров (диапазон градиента 58–64 °С). Были получены ПЦР продукты длиной 800–1000 п.н. с использованием пары праймеров 864 п.н. при температуре отжига праймеров 58 и 60 °С и с использованием пары праймеров 833 п.н. при температуре отжига праймеров 62 и 64 °С. Также был получен продукт длиной 770 п.н. с использованием пары праймеров 770 п.н. при температуре отжига праймеров 60 °С. Исходя из приведенных результатов, наиболее оптимальная температура отжига для пары праймеров 864 п.н. составила 58 °С, для пары праймеров 833 п.н. – 62 °С. Для пары праймеров 770 п.н. оптимальная температура отжига составила 60 °С.

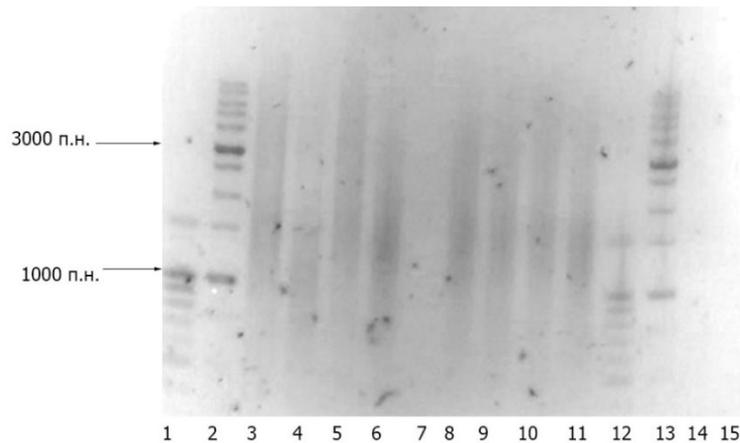


Рисунок 1 – Электрофореграмма образцов РНК в 1,5 % агарозном геле дорожки 1,12 – маркер 100 + bp DNA Ladder; дорожки 2, 13 – маркер 1 kb DNA Ladder; дорожка 3 – РНК образец № 1; дорожка 4 – РНК образец № 2; дорожка 5 – РНК образец № 3; дорожка 6 – РНК образец № 4; дорожки 7, 14, 15 – пустые; дорожка 8 – РНК образец № 5; дорожка 9 – РНК образец № 6; дорожки 10,11 – РНК образец № 7

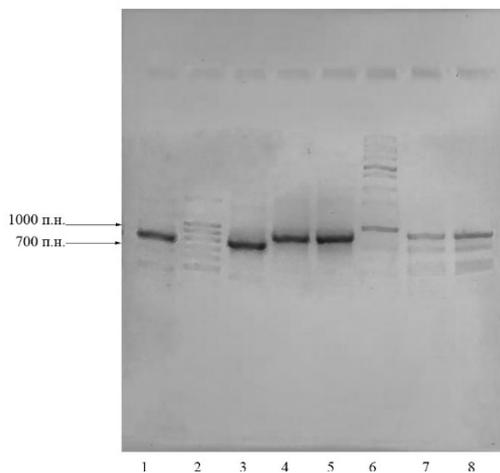


Рисунок 2 – Электрофореграмма ПЦР продуктов (образцы 1–6) в 1,5 % геле агарозы: дорожка 1 – образец 1 (770 п.н.); дорожка 2 – маркер длин 100+bp; дорожка 3 – образец 2 (770 п.н.); дорожка 4 – образец 3 (864 п.н.); дорожка 5 – образец 4 (864 п.н.); дорожка 6 – маркер длин 1kb; дорожка 7 – образец 5 (902 п.н.); дорожка 8 – образец 6 (902 п.н.)

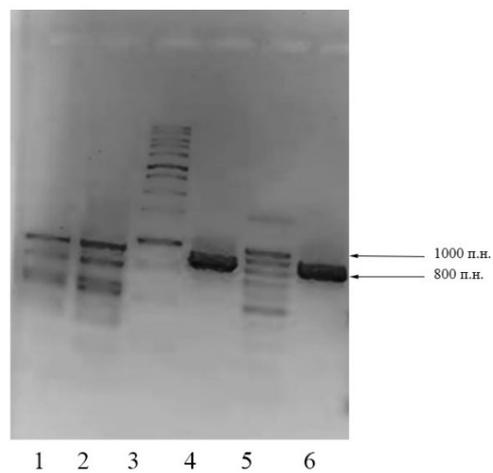


Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР продуктов (образцы 5–8) в 1,5 % геле агарозы: дорожка 1 – образец 5 (902 п.н.); дорожка 2 – образец 6 (902 п.н.); дорожка 3 – маркер длин 1kb; дорожка 4 – образец 7 (833 п.н.); дорожки 5 – маркер длин 100+bp; дорожка 6 – образец 8 (833 п.н.)

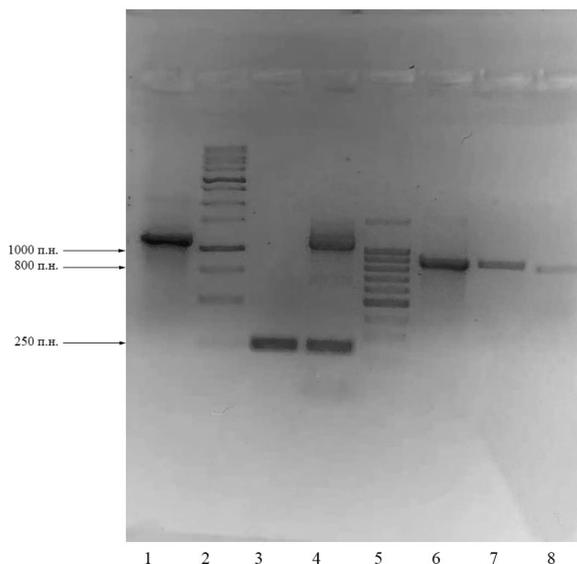


Рисунок 4 – Электрофореграмма ПЦР продуктов, полученных на праймерах M13 и специфических праймерах в 1,5 % геле агарозы: дорожка 1 – образец 7 культура 4/1 (864 п.н.); дорожка 2 – маркер длин 1kb; дорожка 3 – образец 8 культура 4/2 (864 п.н.); дорожка 4 – образец 9 культура 7/1 (833 п.н.); дорожка 5 – маркер длин 100+bp; дорожка 6 – образец 16 культура 4/1 (864 п.н.); дорожка 7 – образец 17 культура 4/2 (864 п.н.); дорожка 8 – образец 18 культура 7/1 (833 п.н.)

Полученные ПЦР продукты длиной 770 п.н. (образцы 1,2), 864 п.н. (образцы 3,4) и 833 п.н. (образцы 7,8) были выделены из геля агарозы и очищены при помощи набора Cleanup Standard согласно инструкции производителя, рисунки 2, 3.

Выделенные ПЦР продукты, содержащие нематричные дезоксиаденозины были встроены в вектор для клонирования под действием T4 ДНК лигазы. Всего было получено 6 образцов лигазной смеси, в которых ампликоны были представленными полученными ранее ПЦР продуктами. Лигирование проводили согласно методике, описанной в материалах и методах.

Компетентные клетки *E. coli* штамм XL1-Blue были трансформированы полученными образцами лигазной смеси согласно стандартному протоколу.

В результате трансформации и проведения бело-голубой селекции было отобрано по 2 белые колонии каждого из 6 вариантов трансформированных клеток. Отобранные колонии затем культивировались в течение ночи в среде LB с ампициллином. В результате проведения ПЦР с праймерами M13 были получены ПЦР продукты длиной 1109 п.н. на матрице плазмидной ДНК, выделенной из рекомбинантных культуры клеток *E. coli* 4/1, и длиной 1015 п.н. на матрице плазмидной ДНК, выделенной из культуры 7/1. Длина продуктов полностью соответствовала длине сайта поликлонирования, содержащего целевую вставку. При проведении ПЦР с праймерами 864 п.н. на матрице плазмидной ДНК, выделенной из рекомбинантных культур 3/1, 3/2, 4/1, 4/2 были получены продукты длиной 864 п.н., длина продукта, полученного с использованием пары праймеров 833 п.н. на матрице плазмидной ДНК культуры 7/1, составила 833 п.н., рисунок 4. В обоих случаях длина амплифицированных фрагментов полностью соответствовала длине вставки. Дальнейший анализ плазмидной ДНК культур 1/1, де 1/ 2, 2/1, 2/2, проведенный с использованием праймеров M13 и праймеров, специфичных для вставки длиной 770 п.н., не показал наличия вставки в составе вектора. Была определена нуклеотидная последовательность полученных векторов, содержащие участки кДНК гена ТГ. Для участков 864 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 2297–3160 п.н.) и 833 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 5529–6361 п.н.) методом секвенирования была подтверждена полная идентичность, опубликованной в Gen Bank последовательности мРНК тиреоглобулина NM 003235.5. Полученные вставки, содержащие фрагменты кДНК гена ТГ были перенесены в экспрессирующий вектор pVAX 1 для дальнейшей трансфекции в клеточную линию СНО.

### Заключение

В нашей работе представлены результаты клонирования двух участков последовательности гена тиреоглобулина человека длиной 864 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 2297–3160 п.н.) и 833 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 5529–6361 п.н.). Для участков 864 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 2297–3160 п.н.) и 833 п.н. (последовательность кДНК гена ТГ 5529–6361 п.н.) методом секвенирования была подтверждена полная идентичность, опубликованной в Gen Bank последовательности мРНК тиреоглобулина NM\_003235.5. Полученные вставки, содержащие фрагменты кДНК гена ТГ были перенесены в экспрессирующий вектор pVAX 1 для дальнейшей трансфекции в клеточную линию СНО. Получение рекомбинантных белков, содержащих отдельные антигенные детерминанты тиреоглобулина человека позволит использовать рекомбинантные белки для совершенствования высокочувствительных иммунохимических тестов нового поколения для определения тиреоглобулина в крови пациентов с дифференцированным раком щитовидной железы, а также для выявления специфических аутоантител в сыворотке крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. Дальнейшие исследования в этом направлении будут направлены на клонирование других участков гена тиреоглобулина, имеющих большое значение для формирования заболеваний щитовидной железы человека, на разных этапах развития заболевания для проведения ранней диагностики и специфического лечения.

### Литература

1. Giovanella, L., Feldt-Rasmussen, U., Verburg F.A., Grebe S.K., Plebani M. and Clark P.M. Thyroglobulin measurement by highly sensitive assays: focus on laboratory challenges // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2015. – Vol. 53. – № 9. – P. 1301–1314
2. Netzel B.C., Grebe S.K., Carranza Leon BG, et al. Thyroglobulin (Tg) Testing Revisited: Tg Assays, TgAb Assays, and Correlation of Results With Clinical Outcomes // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2015. – Vol. 100. – № 8. – P. E1074-E1083
3. Powell R. et al. Recombinant expression of homodimeric 660 kDa human thyroglobulin in soybean seeds: An alternative source of human thyroglobulin // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol. 30. – № 7. – P. 1327–1338.
4. Saboori AM. et al. Iodination of human thyroglobulin (Tg) alters its immunoreactivity. I. Iodination alters multiple epitopes of human Tg // *Clin Exp Immunol.* – 1998. – Vol. 113. – № 2. – P.297–302.
5. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России – 2021. – илл. – 252 с.
6. Haugen B.R, Alexander E.K., Bible K.C., et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer // *Thyroid.* – 2016. – Vol. 26. – № 1. – P. 1–133.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЗЕРНОВОГО ХЛЕБА, ПРИГОТОВЛЕННОГО НА ЗАКВАСКАХ

С.В. Китаевская, О.А. Решетник, Д.Р. Камартинова

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Клинические и эпидемиологические исследования показывают, что потребление цельного зерна и продуктов на его основе связано со снижением риска развития хронических заболеваний. В виду его уникального фитохимического состава [1]. На наш взгляд, перспективным направлением повышения пищевой и биологической ценности хлебобулочных изделий является разработка технологии зерновых сортов хлеба на заквасках молочнокислых бактерий, проявляющих высокую антиоксидантную активность, что позволит обогатить хлебопекарную продукцию дополнительными антиоксидантами.

Цель работы – исследование влияния заквасок молочнокислых бактерий на показатели антиоксидантной активности зернового хлеба. В исследовании применяли новые закваски *L. fermentum* 10 (закваска 1), *L. casei* 32 (закваска 2), *L. plantarum* 24 (закваска 3), обладающие высоким антиоксидантным потенциалом [2]. В работе оценивали антиоксидантную активность образцов зернового хлеба определяли по величине восстанавливающей силы, антирадикальной активности и гидроксил-связывающей способности водного и спиртового экстрактов.

Анализ экспериментальных данных свидетельствует о том, что водные экстракты зернового хлеба обладают большей антиоксидантной емкостью по сравнению со спиртовыми (рис. 1). Так, значения восстанавливающей силы и антирадикальной активности водных экстрактов в 2–2,5 раза выше по сравнению с таковыми у спиртовых, спиртовые экстракты не проявляют гидроксил-связывающую активность. Установлено, что применение процесса ферментации зерновой массы заквасками позволяет увеличить антиоксидантную активность готовых изделий: восстанавливающая сила зернового хлеба увеличивается в среднем на 8,7 %, антирадикальная активность на 25,5 %, гидроксил-связывающая активность на 25,9 % по сравнению с контролем, что объясняется высоким антиоксидантным потенциалом штаммов молочнокислых бактерий, входящих в состав заквасок [2].

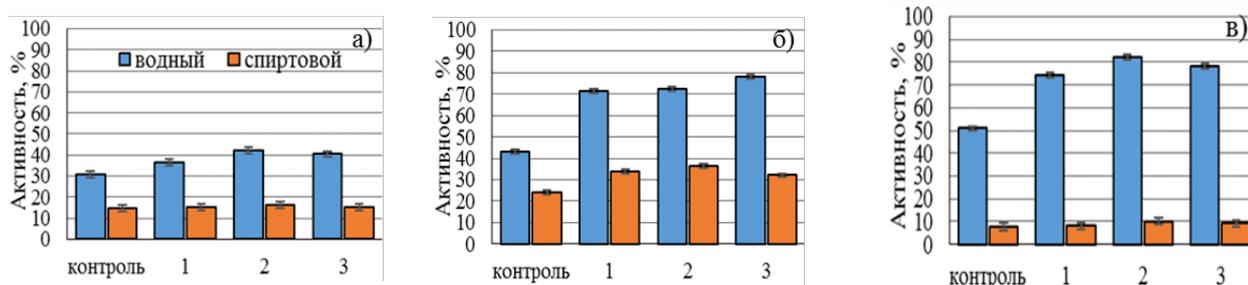


Рисунок 1 – Антиоксидантная активность зернового хлеба на заквасках а) восстанавливающая сила; б) антирадикальная активность; в) гидроксил-связывающая активность

Таким образом, применение заквасок с высоким антиоксидантным потенциалом в технологии зерновых сортов хлеба может стать эффективным инструментом для увеличения антиоксидантной емкости готовой продукции.

### Литература

1. Пономарева, Е.И. Хлеб из биоактивированного зерна пшеницы повышенной пищевой ценности / Е.И. Пономарева, Н.Н. Алехина, И.А. Бакаева // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 2. – С. 116–121.
2. Bagaeva, T.V. The study of antioxidant potential of commercially valuable starter cultures of lactic acid bacteria / T.V. Bagaeva, S.V. Kitaevskaya, O.A. Reshetnik // International Journal of Pharmacy & Technology. – 2016. – № 8. – P. 24366–24372

**ПОЛИМОРФИЗМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГЕНАМИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К *PLASMOPARA VITICOLA* И *ERYSIPHE NECATOR*, В ДИКОРАСТУЩИХ ФОРМАХ ВИНОГРАДА КРЫМА***Г.В. Корнильев, В.И. Рисованная, Я.Ю. Рязанкина**ВНИИ виноградарства и виноделия Магарац, РАН, Ялта, Россия*

Милдью и оидиум – вредоносные заболевания винограда, поражающие клетки фотосинтетических тканей и приводящие к усыханию гроздей, потерям урожая и снижению качества ягод. Возбудители болезней, соответственно, оомицет *Plasmopara viticola* Berl. et De Toni и аскомицет *Erysiphe necator* Schwein. Создание сортов винограда, устойчивых к фитопатогенам, является актуальным. Носителями генов резистентности к милдью и оидиуму являются дикие виды винограда североамериканского (*Vitis aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. riparia* и др.) и азиатского (*V. amurensis*, *V. bashinica*, *V. davidii* и др.) происхождения. Виноград культурный (*Vitis vinifera* ssp. *sativa* D.C.), за исключением межвидовых гибридов, резистентностью к милдью и оидиуму не обладает. При этом среди представителей *V. vinifera* выявлены устойчивые к грибным болезням формы винограда лесного (*Vitis vinifera* ssp. *silvestris* Gmel.). В качестве источников генов резистентности представляют интерес дикорастущие формы винограда, среди которых на территории Крыма могут встречаться как одичавшие экземпляры *V. vinifera* ssp. *sativa*, так и представители *V. vinifera* ssp. *silvestris*. В настоящее время определены и картированы свыше 30 генов резистентности винограда к милдью и 15 – к оидиуму. Маркерная селекция позволяет отбирать генотипы, несущие целевые гены, минуя фенотипическую оценку. SSR-маркеры – микросателлитные тандемные повторы нуклеотидов, ассоциированные с генами резистентности. Нами исследованы SSR-маркеры, ассоциированные с генами резистентности к милдью Rpv6 (маркер VMC8g9) и Rpv13 (маркер VMC1g3.2), а также к оидиуму Run1 (маркеры VMC4f3.1 и VMC8g9), для оценки их использования с целью поиска источников генов резистентности в 45 образцах дикорастущих форм винограда, собранных в горно-лесной зоне Южного берега Крыма. В качестве положительного контроля к милдью использован *Vitis riparia* Michx., к оидиуму – сорт винограда Кишмиш Ваткана, в качестве отрицательного контроля – сорт Шардоне. ДНК выделяли из листьев с использованием ЦТАБ-буфера, амплификация выполнена на приборе «T100 Thermal Cycler» по апробированному нами протоколу. Фрагментный анализ ПЦР-продуктов выполнен на приборе «ABI Prism 3130» с определением размеров аллелей с помощью программы «GeneMapper». Полученные данные статистически обработаны с использованием программы «Popgen 32». Полученные SSR-профили показали полиморфность локусов; количество аллелей составило от 9 (VMC1g3.2) до 12 (VMC8g9). В локусе VMC4f3.1 наиболее часто встречается аллель 182 пн, в VMC1g3.2 – 126 пн, в VMC8g9 – 200 пн. По локусу VMC1g3.2 преобладают гомозиготы, из них 26 – по аллелю 126 пн. По локусам VMC8g9 и VMC4f3.1 преобладают гетерозиготы. По локусу VMC8g9 выявлено 14 гомозигот, из них 4 – по аллелю 200 пн; по VMC4f3.1 – 11 гомозигот, из них 4 – по аллелю 174 пн. В литературе приводятся следующие размеры функциональных аллелей: в локусе VMC1g3.2 – 118, 174 пн; в VMC8g9 – 138, 156, 159, 161 пн; в VMC4f3.1 – 161, 188 и 192 пн. Среди исследуемых выявлен 1 образец с размером аллеля 192 пн в локусе VMC4f3.1, совпадающим с функциональным. В VMC1g3.2 одного образца выявлен аллель 120 пн, близкий к размеру функционального аллеля (118 пн). В VMC8g9 аллели, размеры которых соответствуют целевым или близки к ним, не выявлены. Исследование полиморфизма SSR-локусов, ассоциированных с генами резистентности к милдью и оидиуму, в дикорастущих формах винограда Крыма проведено впервые, полученные результаты требуют дальнейшего изучения.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ *METHYLOPHILUS QUAYLEI* И *METHYLORUBRUM EXTORQUENS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ

Е.Р. Митина, А.Б. Мин, А.Б. Пшеничникова

ФГБОУ ВПО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия

Поли-3-гидроксibuтират (ПГБ) – синтезируемый бактериями биоразлагаемый и биосовместимый пластик, схожий по свойствам с полипропиленом. Применение этого биополимера в промышленности ограничено его стоимостью, определяемой, прежде всего, источником углерода. Одним из доступных углеродных субстратов является метанол. Известно много метилотрофных бактерий, синтезирующих ПГБ, например, *Methylorubrum extorquens* – розовокрашенная факультативная метилотрофная бактерия. С целью увеличения конверсии метанола в продукты в настоящей работе использовали смешанную культуру метилотрофных бактерий *Methylorubrum extorquens* (ВКПМ В-13995), накапливающих ПГБ в биомассе, и *Methylophilus quaylei* (ВКМ В-2338Т), секретирующих высокомолекулярный экзополисахарид (ЭПС).

Бактерии выращивали в минеральной среде с 1 % метанола в конических колбах при 28° С и 170 об/мин в течение 48 ч. Культуры с заданным соотношением штаммов составляли с использованием уравнений зависимости мутности бактериальных суспензий от концентрации клеток, полученных для каждого штамма. Соотношения штаммов в смешанной культуре определяли в момент внесения инокулята (0 ч) и в конце культивирования (48 ч) высевом на плотные питательные среды и рассчитывали как отношение колониеобразующих единиц. Колонии *Methylorubrum extorquens* отличали по розовой окраске. Биомассу от бесклеточной жидкости отделяли центрифугированием. Содержание ПГБ в сухой биомассе контролировали методом Зевенхузена, а концентрацию ЭПС в бесклеточной жидкости определяли антроновым методом.

Выделение продуктов проводили после центрифугирования культуральной жидкости. Биомассу промывали метанолом для отделения липидов, затем хлороформом экстрагировали поли-3-гидроксibuтират. Из хлороформного экстракта ПГБ осаждали пятикратным объемом диэтилового эфира. Структуру ПГБ подтверждали методом<sup>1</sup> Н- и<sup>13</sup> С-ЯМР-спектроскопии. Из бесклеточной жидкости экзополисахарид осаждали двукратным объемом ацетона, фракционный состав ЭПС определяли методом гель-фильтрации на Toyopearl HW-65 Fine.

Начальные соотношения бактерий *Methylorubrum extorquens* и *Methylophilus quaylei* были выбраны равными 9:1 и 6:1 соответственно. Проводили культивирование чистых и смешанных культур выбранных штаммов. Продуктивность чистой культуры *Methylorubrum extorquens* по сухой биомассе составила 1,0±0,3 г/л за 48 часов при содержании ПГБ в биомассе 25 % и концентрации ЭПС в бесклеточной жидкости 0,15±0,01 г./л, для *Methylophilus quaylei* продуктивность по биомассе составила 0,7±0,1 г/л, ПГБ отсутствовал, а содержание ЭПС в культуральной жидкости составило 0,69±0,05 г./л. В смешанных культурах бактерия *Methylophilus quaylei* росла более активно – соотношение штаммов через 48 часов культивирования в культурах с начальным соотношением *Methylorubrum extorquens*: *Methylophilus quaylei* 9:1 и 6:1 составило 1:1 и 1:2 при продуктивности по суммарной биомассе 1,1±0,1 г/л и 1,0±0,3 г/л, по ЭПС – 0,49±0,01 г./л и 0,55±0,01 г./л и с содержанием ПГБ в суммарной биомассе 21 и 12 % соответственно. Структура ПГБ в чистых и смешанных культурах была идентична. Увеличение содержания в смешанной культуре бактерии *Methylorubrum extorquens*, имеющей меньшую скорость роста, позволило повысить продуктивность по ПГБ. ЭПС, выделенный из чистой культуры *Methylophilus quaylei*, был представлен тремя основными фракциями: 4,5–8,4 МДа (36 % от общей массы ЭПС), 1,6–3,7 МДа (45 %) и 0,4–0,6 МДа (19 %), в культуре *Methylorubrum extorquens* обнаружено две фракции ЭПС: 1,1–3,7 МДа (71 %) и 32–60 кДа (29 %). В смешанной культуре обнаружены все фракции ЭПС чистых культур.

Таким образом, продуктивность по поли-3-гидроксibuтирату и экзополисахариду в смешанных культурах падает незначительно по сравнению с чистыми, и смешанная культура метилотрофных бактерий *Methylorubrum extorquens* и *Methylophilus quaylei* может служить продуцентом этих биополимеров.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ПОСТБИОТИКОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

И.С. Полянская<sup>1</sup>, М.В. Корюкина<sup>2</sup>, О.Б. Бадеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Вологодская ГМХА, Вологда, Россия

<sup>2</sup> Вологодский филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Вологда, Россия

Постбиотики, или метабиотики, как микроорганизмы, которые продолжают положительно влиять на здоровье человека, будучи лизированными (после прекращения их жизнеспособности), или посредством питательной среды, на которой они выращивались (после удаления из неё живых клеток) – нельзя называть пробиотиками по определению [1], однако отдельные механизмы их действия, схожие с пробиотиками, позволяют надеяться, что при производстве ферментированных молочных продуктов постбиотики могут применяться вместо пробиотиков, или совместно с ними.

Одним из выявленной ранее областью проявления различных механизмов действия постбиотиков (в контексте данной публикации, принимаемых как синоним, – метабиотиков) – является антимикробная активность их метаболитов, при отсутствии живых бактериальных клеток [2].

Применение метабиотиков с высокой антимикробной активностью вместо пробиотиков позволяет производить ферментированные молочные продукты с длительным сроком хранения, а применение таких метабиотиков совместно с пробиотиками позволяет усиливать «защитные свойства» заквасок за счёт метабиотической составляющей.

В настоящем исследовании сравнили антимикробную активность по отношению к трём штаммам тест-культур стафилококков (*Staphylococcus xylosum*5, *Staphylococcus albus*1, *Staphylococcus aureus*2) трёх вариантов заквасок:

(1) пробиотических заквасок (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 10, *Lactococcus acidophilus* неслиз 20т), в сравнении с

(2) постбиотиками, полученными из этих же вариантов заквасок посредством пастеризации;

(3) культуры пробиотика и метабиотика одновременно, полученный после хранения заквасок (1) в течение 1 месяца, в результате которого произошло снижение титра молочнокислых микроорганизмов с порядков  $10^7$  до  $10^4$ .

Пробиотические закваски готовились идентично на обезжиренном стерильном молоке и в случаях (1) и (2) для определения антибиотической активности использовались суточными.

Одну третью часть заквасок (2) пастеризовали при 70 °С в течение 5 мин на водяной бане, одну третью часть заложили на хранение при 4 °С в течение 30 дней. Повторность опыта трёхкратная.

Антибиотическую активность определяли стандартным методом лунок (рис. 1), с округлением средней зоны задержки роста тест-культур, измеряемую в мм до целых (рис. 2).

Как показали результаты опыта, в результате пастеризации в целом произошло снижение антимикробной активности заквасок, но она не исчезла полностью, и в некоторых случаях усилилась. Остаётся открытым вопрос: снижение антимикробной активности в этом случае произошло в результате гибели живых клеток, или в результате инактивации антимикробных агентов.

После выдержки закваски в условиях, приближенных к хранению продукта с длительным сроком хранения в условиях холодильника, в целом антимикробная активность к стафилококкам усилилась, что требует дальнейшего изучения эффективности практической реализации применения постбиотиков при производстве ферментированных молочных продуктов.

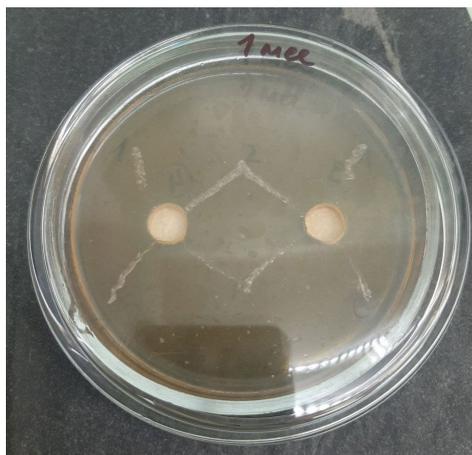


Рис. 1. Определение антибиотической активности методом лунок

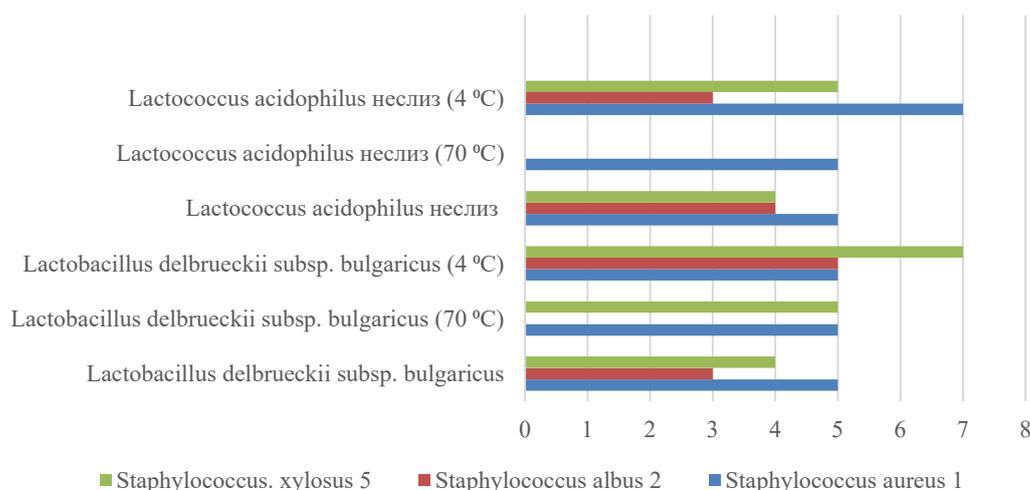


Рис. 2. Зона задержки роста в мм тест культур (*Staphylococcus xylosus* 5, *Staphylococcus albus* 2, *Staphylococcus aureus* 1) живыми пробиотическими культурами, пастеризованными культурами (70 °C) и культурами после хранения в течение 30 дней (4 °C)

### Литература

- ГОСТ Р 56139–2014 Продукты пищевые специализированные и функциональные. Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов.
- Стоянова Л.Г., Дбар С.Д., Полянская И.С. Метабиотические свойства штаммов *Lactobacillus acidophilus*, входящих в комплексные закваски для производства пробиотических молочных продуктов // Биотехнология, 2022. Т. 38. № 1. С. 3–12.

УДК 360

## ВЛИЯНИЕ ИУК И АБК НА АТФ-АЗУ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ПЛАЗМАЛЕММЫ ПРОРАСТАЮЩЕГО МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ

Ю.В. Минкина<sup>1</sup>, А.С. Воронков<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ИАТЭ НИЯУ «МИФИ» Обнинский институт атомной энергетики, Обнинск, Россия

<sup>2</sup> – ИФР РАН «Институт Физиологии растений им. К.А. Тимирязева», Москва, Россия

Способность ИУК модулировать активность ион-транспортирующих систем на мембранный потенциал плазмалеммы (ПМ) мужского гаметофита была показана в опытах, в которых исследовали ее действие на величину мембранного потенциала, отражающего суммарную активность всего комплекса ион-транспортирующих систем, следя за его изменением с помощью катионного потенциал-чувствительного красителя сафранина О. Кинетика изменений абсорбции сафранина О в присутствии АБК, добавленных в концентрации 2.5 мкМ к суспензии пыльцевых зерен, предварительно инкубированных в течение 20–30 мин с красителем в среде измерения, не содержащей ионов калия, была идентичной кинетике для ИУК.

Добавление АБК инициировало гиперполяризацию ПМ пыльцевых зерен. Справедливость этого предположения, основанного на возможном действии гормонов на электрогенную активность Н±АТФазы ПМ была подтверждена тем, что гормон-индуцированный сигнал сафранина полностью блокировался в присутствии ортованадата, верапамилом, блокатором Ca<sup>2+</sup> каналов клеточных мембран и хелатором Ca<sup>2+</sup> – ЭГТА. Ингибирующее действие ЭГТА связано с сильным снижением уровня Ca<sup>2+</sup> во внеклеточной среде и, тем самым, с предотвращением его поступления внутрь пыльцевых трубок через ПМ.

УДК 579.61

**ВЛИЯНИЕ ИНОКУЛЯТА НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ СМЕШАННЫХ БИОПЛЕНОК МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ К ПОЛИМИКСИНУ В****Е.Р. Митина, А.А. Бершадская, А.Б. Пшеничникова***ФГБОУ ВПО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия*

Резистентность бактерий к антибиотикам является глобальной проблемой медицины. Традиционно для лечения инфекционных заболеваний назначают эффективные дозы антибиотиков, к которым возбудитель имеет высокую чувствительность. Чувствительность возбудителя оценивают по величине минимальной ингибирующей (подавляющей) концентрации (МИК). Для назначения индивидуальной антимикробной терапии определение МИК проводится в соответствии с российскими и международными стандартами, предусматривающими использование двух методов определения чувствительности возбудителей к антибиотикам – последовательных разведений и диско-диффузионного. Оба метода разработаны для тестирования моновидовых культур возбудителей в жидкой или агаризованной питательной среде. Однако в организме человека патогенные микроорганизмы обнаруживаются также в смешанных культурах и биопленочной форме, что существенно повышает резистентность к антибиотикам. Хорошо известно влияние размера популяции тестируемого штамма на резистентность к антибиотикам – увеличение посевной дозы повышает резистентность (эффект инокулята). В природных биопленках, представляющих консорциум микроорганизмов, корректное определение МИК требует понимания механизмов взаимодействий компонентов консорциума между собой в присутствии антибиотика.

Цель работы – изучение эффекта инокулята в модельной системе «смешанные биопленки метилотрофных бактерий – антибиотик полимиксин В». Нами был выбран консорциум, состоящий из двух метилотрофных бактерий – факультативной *Methylorubrum extorquens* (ВКПМ В-13995) и облигатной *Methylophilus quaylei* (ВКМ В-2338). Эти бактерии растут в минеральной синтетической среде с 0,5 об.% метанола и различаются ростовыми характеристиками и резистентностью к антибиотикам – удельная скорость роста *Methylophilus quaylei* в 1,5 раз выше, а чувствительность к полимиксину В ниже, чем у *Methylorubrum extorquens* (МИК в жидкой среде в  $10^2$  раз ниже).

Биопленки формировали на полипропиленовых купонах размером  $10 \times 10 \times 0,1$  мм, помещенных в жидкую питательную среду объемом 5 мл, в течение 24 часов в режиме 60 об/мин при  $28^\circ \text{C}$ . Варьировали объем инокулята моновидовых или смешанной культуры от 1 до 5 об.%. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в биопленке определяли, десорбируя клетки в смесителе Vortex и высевая полученную суспензию на агаризованную среду после серии десятикратных разведений. Смешанные культуры *Methylorubrum extorquens* и *Methylophilus quaylei* с соотношением компонентов, равных 0,5, получали с использованием экспериментально полученных для каждого штамма уравнений «оптическая плотность – количество колониеобразующих единиц (КОЕ/мл)».

Было обнаружено, что в отсутствие антибиотика при плотности посева 5 об.% размер биопленки (КОЕ/купон) как в моновидовых, так и в смешанной культуре выше в 1,5–2,4 раза. В присутствии полимиксина В в концентрациях  $1 \times 10^{-4}$  и  $5 \times 10^{-4}$  мг/мл дозозависимо наблюдается эффект инокулята – при повышении плотности посева уменьшается чувствительность обоих штаммов к полимиксину В в моновидовых биопленках (увеличивается КОЕ/мл).

В смешанных биопленках при увеличении концентрации полимиксина В эффект инокулята значительно повышается по сравнению с моновидовой биопленкой для более чувствительной бактерии *Methylophilus quaylei*, тогда как для более резистентной *Methylorubrum extorquens* – уменьшается. При концентрации полимиксина В  $5 \times 10^{-4}$  мг/мл, близкой к МИК для *Methylophilus quaylei*, в смешанной биопленке, полученной с низкой плотностью посева, его содержание составило 3 %, а с более высокой – 27 %, а размер суммарной биопленки увеличивался в 2,4 раза.

Таким образом, с увеличением плотности посева в смешанной биопленке наблюдается снижение эффективности антибиотика полимиксина В даже для чувствительного к нему штамма. Также важным выводом является обнаруженное влияние штаммов друг на друга при совместном культивировании в биопленке, которое трудно прогнозировать при использовании стандартной методики определения МИК.

**РАЗРАБОТКА ПРОБИОТИКА ДЛЯ АКВАКУЛЬТУР НА ОСНОВЕ *BACILLUS TOYONENSIS* B-13249 И *B. PUMILUS* B-13250****И.Ю. Евдокимов, А.Н. Иркитова**

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул, Россия

**Введение**

При промышленном разведении креветок, ракообразных и других представителей аквакультуры фермеры часто встречаются с различными инфекциями объектов производства и, как следствие, массовой смертностью водных животных. К болезнетворным микроорганизмам в водной среде относятся представители р. *Vibrio* [1], *Salmonella*, *Escherichia coli* [2] и многие др. Для предотвращения крупных потерь при выращивании промысловых объектов, долгие годы применялись антибиотики, что со временем приводило к развитию генов резистентности к ним у большинства микроорганизмов. Чтобы устойчивость бактерий к антибиотикам не привела к экологической катастрофе, стоит задача поиска более безопасных способов борьбы с патогенными организмами. В связи с этим производители аквакультуры все чаще используют пробиотики в качестве профилактики и комплексном лечении инфекционных заболеваний [3].

**Цель работы** – разработать пробиотик для аквакультуры на основе штаммов рода *Bacillus*.

**Материалы и методы**

В качестве объекта исследования при разработке пробиотика использовали 2 штамма споровых бактерий из коллекции ИЦ «Промбиотех» АлтГУ: *B. toyonensis* B-13249 выделенный из ризосферы р. *Helianthus*, *B. pumilus* B-13250 – из ризосферы р. *Cichorium*.

Для проведения промышленных испытаний пробиотика использовали цисты жаброногого рачка *A. franciscana* двух партий ООО «Арсал». Испытания по проценту выклева и выходу биомассы артемий проводились на базе лаборатории ООО «Арсал», г. Яровое (Алтайский край, РФ). Еще одним объектом для испытаний были пресноводные креветки Розенберга. Испытания проводили на частной ферме, расположенной в Республике Казахстан. Использовали потомство самки *M. rosenbergii*, разделенное на 2 группы: контрольную и опытную [4].

Для восстановления культур, контроля численности и чистоты использовали следующие среды и реактивы: физиологический раствор, L(Лурия) – среда, жидкий L-бульон, Эндо.

При глубинном культивировании микроорганизмов в ферментерах использовали среды: глюкозо-пептонно-дрожжевая (ГПД [1]), пшеничная (ПС [5]), меласно-кукурузная бедная (МК-БС, собственная разработка), меласно-кукурузная обогащенная (МК-ОС [6], защитная (криопротекторная) на основе желатина и сахарозы [7].

Антагонистическую активность штаммов оценивали методом отсроченного антагонизма перпендикулярных штрихов. В качестве антагонистов использовали исследуемые штаммы *B. toyonensis* и *B. pumilus*, в качестве тест-культур – патогенные и условно-патогенные штаммы из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Антибиотикорезистентность исследуемых штаммов определяли диско-диффузионным методом на твердой L-среде [8].

Условия культивирования в биореакторах. Технологию производства биологического препарата отработывали на производственной площадке ИЦ «Промбиотех» АлтГУ. Промышленное глубинное культивирование производили в ферментерах 15 и 250 л объемом (ООО «Сторге», Россия).

Методы инкубации цист рачков *A. franciscana*. Цисты инкубировали в конусах в течение 48 ч при соответствующих параметрах промышленного разведения артемии. Опыт состоял из 4 вариантов для каждой из партий цист (1 – контроль, 2, 3, 4 – опытные варианты) в 5-и повторностях. Инкубацию науплиусов проводили, используя различные дозы пробиотика (г): 0 (контроль), 0,05, 0,1, 0,2 соответственно, на 2 г сухих цист артемии.

Методика испытания на креветках *M. rosenbergii*. Потомство креветки одной самки *M. rosenbergii* разделили на 2 группы: контрольная (пробиотик не добавлялся) и опытная, в кормлении которой использовали артемию, инкубированную с добавлением пробиотика. Каждая группа состояла из 200 личинок, которых выращивали в одинаковых аквариумных системах по 600 литров каждая. Фиксирование линек креветок осуществляли визуально, чтобы не травмировать животных [4].

## Результаты и обсуждения

Антагонистическая активность. В настоящем исследовании в качестве тест-культур использованы 10 микроорганизмов 3 и 4 групп патогенности: *Staphylococcus aureus*, *St. Epidermidis*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei*. В результате *B. pumilus* проявил антагонизм к 6 из 10 тест-культур, а *B. toyonensis* – к 7 из 10.

Антибиотикорезистентность. Оба исследованных штамма оказались чувствительны к антибиотикам: цефалексин, олеандомицин, энрофлоксацин, бензилпенициллин, моноцин; и не чувствительны к оксациллину.

Разработка технологии производства пробиотика для аквакультуры. Подбор питательных сред. Для выращивания посевного материала проверили две среды: L-бульон и ГПД с добавлением глюкозы, микро- и макроэлементов. Отмечено, что штамм *B. pumilus* на ГПД имел численность КОЕ/мл  $4,72(\pm 0,20) \times 10^8$ , на L-бульоне –  $2,42(\pm 0,12) \times 10^9$ ; штамм *B. toyonensis* на ГПД –  $4,60(\pm 0,15) \times 10^8$ ; на L-среде –  $5,91(\pm 0,25) \times 10^9$ . Таким образом L-среда является наиболее благоприятной для выращивания посевного материала в колбах, так как на ней бактерии достигают более высокого титра.

Исследование параметров глубинного культивирования непосредственно в ферментационном аппарате проводили на трех средах: ПС, МК-ОС, МК-БС. Для штамма *B. pumilus* через 24 часа культивирования наилучшие показатели оптической плотности –  $2,400 (\pm 0,085)$ , количество КОЕ/мл –  $8,30(\pm 0,36) \times 10^{10}$ , КОЕ/г после лиофильной сушки –  $5,80(\pm 0,25) \times 10^{11}$  достигнуты на среде МК-ОС. Для культуры *B. toyonensis* максимальные показатели также достигнуты на среде МК-ОС:  $OD_{490}$  составил  $2,042 (\pm 0,042)$ , КОЕ/мл составило  $2,50(\pm 0,12) \times 10^{10}$ , а после сушки –  $3,60(\pm 0,05) \times 10^{11}$  КОЕ/г.

Подбор дозы инокулята. Исходная доза посевного материала для обоих исследуемых штаммов составила 10 %. Такой дозы оказалось достаточно для достижения заданных технологических параметров: титр КОЕ/г сухого концентрата достигает значения  $1,31(\pm 0,04) \times 10^{12}$  КОЕ/г у штамма *B. pumilus*, и  $3,30(\pm 0,11) \times 10^{11}$  КОЕ/г у штамма *B. toyonensis*. При снижении дозы посевного материала до 5,5 % и даже до 1 % отмечено, что в обоих случаях происходит обильное накопление биомассы. Масса сухого концентрата во всех исследованных вариантах находится в пределах 150 г. Следовательно, экономически эффективнее использовать инокулят дозой в 1 % (Евдокимов, Иркитова, 2022).

Влияние температуры на накопление биомассы. Для определения оптимальной температуры культивирования штаммы *B. pumilus* и *B. toyonensis* выращивали при одинаковых условиях в шейкере-инкубаторе «Innova 44» при температурах – 15, 25, 30, 37, 42 °С, скорость перемешивания – 250 об/мин, время – 24 ч. Культивирование проводилось в колбах Эрленмейера объемом 500 мл, с заполнением 200 мл культуральной жидкости. Максимальный титр штамм *B. pumilus* достигал при температуре 37 °С –  $4,60 (\pm 0,20) \times 10^9$  КОЕ/мл при оптической плотности –  $0,574 (\pm 0,017)$ . Наименьшие показатели наблюдались при 15 °С и 42 °С культивирования (КОЕ/мл:  $3,40 (\pm 0,11) \times 10^8$  при 15,  $1,00 (\pm 0,03) \times 10^9$  при 42, соответственно;  $OP_{490}$ :  $0,089 (\pm 0,004)$  также при 15,  $0,311 (\pm 0,015)$  – 42). Штамм *B. toyonensis* наибольшую численность также при температуре 37 °С –  $4,35(\pm 0,19) \times 10^9$  КОЕ/мл, при оптической плотности –  $0,995 (\pm 0,012)$ . Наименьшие показатели при 15 и 42 °С (КОЕ/мл:  $1,05(\pm 0,04) \times 10^8$  при 15,  $3,95(\pm 0,15) \times 10^7$  при 42, соответственно;  $OP_{490}$ :  $0,513 (\pm 0,022)$  при 15, при 42 –  $0,370 (\pm 0,013)$ ).

Влияние активной кислотности среды на накопление биомассы. Исследуемые заданные значения среды pH: 5,6, 6,2, 6,8, 7,4. На 24 ч роста значение активной кислотности стремится к нейтральному положению, и в вариантах 5,6, 6,2, 6,8 значение pH в обоих исследуемых штаммах переросло изначально заданный уровень. При установке же 7,4 лишь в некоторых повторностях у *B. toyonensis* значение, незначительно (на 0,01), превышало задаваемый параметр. В исследованиях *B. pumilus* значение в 7,4 не достигалось ни разу. Наибольшее количество живых клеток обнаружено при культивировании штаммов на среде с pH=6,8: *B. pumilus* –  $3,65(\pm 0,18) \times 10^9$ , *B. toyonensis* –  $1,25(\pm 0,05) \times 10^9$ . При этом, наименьшие значения у штамма *B. pumilus* –  $2,15(\pm 0,10) \times 10^9$  наблюдались при pH среды 5,6, а у *B. toyonensis* –  $5,40(\pm 0,13) \times 10^8$  при pH среды 7,4.

Определение времени культивирования. В данном эксперименте каждый исследуемый штамм культивировали в течение 72 часов. К 24 часам роста, количество бактерий набирало наибольшее количество  $8,20(\pm 0,40) \times 10^{10}$  КОЕ/мл у штамма *B. pumilus* и  $3,05(\pm 0,15) \times 10^{11}$  КОЕ/мл у штамма *B. toyonensis*. Экспоненциальная фаза была зафиксирована для обоих штаммов в период от 2 до 18–20 ч.

Начиная с 20–24 часов культивирования наступала стационарная фаза, что способствует окончанию цикла ферментации и началу последующих производственных этапов. Через 48 часов инкубации титр незначительно снижался, в пределах одного порядка: у штамма *B. pumilus* –  $6,30(\pm 0,21) \times 10^{10}$  КОЕ/мл, у штамма *B. toyonensis* –  $4,15(\pm 0,15) \times 10^{11}$  КОЕ/мл, и дальнейшая тенденция к снижению продолжилась и на 72 часа культивирования.

Концентрирование культуральной жидкости. Для разработки метода выделения бактериальных клеток использовали высокоскоростную проточную центрифугу GTGQ-1251. Экспериментальным путем установлено, что оптимальной скоростью потока для данных культур является – от 100 л/час до 130 л/час.

Сушка биомассы. Выявлено, что в камере сублиматора концентрат бацилл необходимо замораживать в течение 8 часов при температуре минус 35 °С, либо заморозка производится в морозильной камере не менее 12 часов при температуре минус 20–25 °С. После завершения сушки из лотков вынимали сухой концентрат массы микробов, которые в дальнейшем проверяли на количество КОЕ/г и отправлялись на этап стандартизации готового продукта.

Стандартизация препарата. Стандартизацию пробиотика проводили в смесителе СМУ-ПБ-200. При фиксировании времени смешивания, обнаружено что при перемешивании в течение 60 мин концентратов бактерий с наполнителем – мальтодекстрином, однородность продукта обеспечивалась на 98 % во всех случаях, поэтому это считается оптимальным временем.

Масштабирование технологии производства пробиотика обеспечило получение опытной партии биопрепарата для проведения промышленных испытаний. Титр бацилл в готовом препарате составил  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г.

Испытание препарата на рачках артемии. Пробиотик оказал положительный эффект на процент выклева цист и выход биомассы *A. franciscana*. Установлена рекомендуемая доза препарата – 0,1 г / на 2 г цист. Увеличение процента выклева при добавлении пробиотика в данной концентрации к партии Z29.04 составило 1,4 %, а при добавлении биопрепарата к партии С9 – 10 %. Выход биомассы в контрольных конусах для партий Z29.04 и С9 составлял 5,30 ( $\pm 0,60$ ) г и 4,60 ( $\pm 0,50$ ) г, соответственно. При добавлении пробиотика к данным партиям в концентрации 0,1 г выход биомассы составлял 7,40 ( $\pm 0,69$ ) г и 6,80 ( $\pm 0,43$ ) г соответственно.

Испытания на креветках Розенберга. Согласно полученным данным, в опытной группе наблюдался более ранний выход *M. rosenbergii* из личиночной стадии – на 18 день, в контрольной группе – на 28 день. Выживаемость в обеих группах существенно не различалась и была более 90 %.

### Заключение

Оба исследованных штамма обладают высокой антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре: *B. pumilus* проявил антагонизм к 6 из 10 тест-культур, а *B. toyonensis* – к 7 из 10.

Оба исследованных штамма не чувствительны к оксациллину.

Разработана технология и оптимальные условия производства пробиотика: посевная среда – L-бульон, основная ферментационная – МК-ОС; доза посевного материала – 1 %; температура выращивания обоих штаммов – 37 °С; рН = 6,8; время культивирования каждого штамма 24 ч; режим центрифугирования – 100 л/ч – 130 л/ч при 15000 об./мин; время лиофильной сушки 40 ч; время заморозки в камере сублиматора 8 ч при температуре –35 °С, в морозильной камере – не менее 12 ч при температуре –20–25 °С; для стандартизации оптимально 60 мин перемешивания для однородности продукта 98 %.

Готовый препарат обладает следующими свойствами: светло-кремовый порошок с запахом, характерным для мальтодекстрина, численность бацилл не менее  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г сохраняется на протяжении 12 месяцев.

Пробиотик оказал положительный эффект на процент выклева цист и выход биомассы *A. franciscana*. Рекомендуемая доза – 0,1 г биопрепарата на 2 г цист. Увеличение процента выклева при добавлении пробиотика в данной концентрации к партии Z29.04 составило 1,4 %, при добавлении биопрепарата к партии С9 – 10 %. При добавлении пробиотика к промышленным партиям (Z29.04 и С9) выход биомассы увеличился на 39,6 % и 47,8 %, соответственно.

Новый пробиотик способствует более раннему выходу из личиночной стадии *M. rosenbergii* по сравнению с контрольной группой (18 и 28 дней соответственно).

## Литература

1. Малкова А.В., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е. Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* B-13249 и *Bacillus pumilus* B-13250. Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021; 11(3):393–402. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-3-393-402>.
2. Faridullah M., Roy V.C., Lithi U.J. Prevalence of Salmonella and Escherichia coli contamination in shrimp (*Penaeus monodon*) farms, depots and processing plants in different areas of Bangladesh // Asian Journal of Medical and Biological Research. – 2016. – V. 2. – №. 2. – P. 171–176.
3. Goh Jo. X.H., Tan L.T. – H., Law J.W. – F., Khaw K. – Ye., Zengin G., Chan K. – G., Letchumanan V., Lee L. – H., Goh B. – H. Probiotics: Comprehensive Exploration of the Growth Promotion Mechanisms in Shrimps // Progress in Microbes and Molecular Biology. – 2023. – V. 6. – №. 1. a0000324.
4. Malkova A, Evdokimov I, Shirmanov M, Irkitova A, Dementyev D. New bacilli-based probiotic for aquaculture: efficacy study on *Macrobrachium rosenbergii* // BIO Web of Conferences. – 2022. – V. 42. e01011.
5. Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Ильинская О.Н. Технология получения и оценка стабильности при хранении жидкой препаративной формы биофунгицида Бацизулин // Ученые записки казанского университета. Естественные науки. – 2010. – Т. 152. – №. 4. – С. 169–178.
6. Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Воинова Т.М., Карташов М.И., Овчинников А.И. Патент РФ, № 2675934, 2018. Комбинированный пробиотический препарат на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* (варианты) для использования в животноводстве, способ его производства (варианты) и штамм *Bacillus subtilis* (natto), используемый в качестве добавки к препарату.
7. Грачева И.В., Осин А.В., Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – №. 3. – С. 5–12.
8. Орлова Т.Н., Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В., Дудник Д.Е. изучение антибиотикочувствительности нового ризосферного штамма *Bacillus pumilus* B-13250 для возможности использования его в составе пробиотических препаратов для животноводства // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2020. – Т. 183. – №. 1. – С. 111–115.
9. Евдокимов И.Ю., Иркитова А.Н. Определение доли инокулята культур *Bacillus pumilus* B-13250, *B. toyonensis* B-13249 при глубинном культивировании в ферментационных установках. Актуальная биотехнология. 2022. № 1. С. 232–235.

## КОМПЛЕКСНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ЭНДО- И ЭКЗОПЕПТИДАЗ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ

Н.В. Цурикова, Е.И. Курбатова, Е.В. Костылева, А.С. Середа, Е.А. Фурсова

ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия

Для увеличения степени гидролиза, улучшения физико-химических и органолептических свойств белковых гидролизатов часто используют ферментные препараты (ФП), содержащие экзопептидазы, способные гидролизовать белки и пептиды с образованием свободных аминокислот. Наиболее широко в пищевой промышленности используют препарат Флавозим (Novozymes A/S), получаемый на основе мицелиального гриба *A. oryzae* и содержащий в качестве основного компонента лейцинаминопептидазу (LAP). В составе препарата также присутствуют сериновая протеаза оризин, нейтральные эндопептидазы и несколько дипептидаз [1]. В большинстве технологических процессов получения белковых гидролизатов из широкого спектра белоксодержащего сырья успешно используют совместное действие ФП бактериальной сериновой протеазы Алкалаза (Novozymes A/S), обеспечивающей интенсивный гидролиз белковых молекул до пептидов, и Флавозима.

За счет методов селекции на агаризованных средах с индукторами протеаз и оптимизации условий глубинного культивирования на основе штамма *A. oryzae* 107 ВКПМ F-929 (патент РФ 2 315 098 С1) – продуцента кислых и слабокислых протеаз, был получен комплексный ферментный препарат Протооризин LAP, содержащий в качестве основных компонентов LAP, сериновую протеазу оризин и кислую эндопептидазу аспергиллопепсин. По активности LAP новый комплексный препарат был сравним ФП Флавозим, а достаточно высокая активность сериновой и кислой эндопептидаз способствовала повышению эффективности действия Протооризина LAP на такие белковые субстраты, как казеин, изолят соевого белка, свиной коллаген, пшеничный глютен (рис. 1). Ферментативную обработку вышеперечисленных видов сырья проводили в течение 3 часов при 50 °С при естественном рН 6,0–6,7, концентрации субстратов 100 г/л. Алкалазу вносили в дозировке 1,5 % к массе сырья, Флавозим с активностью 1000 ± 50 единиц LAP/г – в дозировке 2 %, что соответствовало 20 LAPU/г субстрата. Протооризин LAP использовали в дозировке 2,5 %, что соответствовало 20 LAPU/г субстрата. Из полученных данных (рис. 1) очевидно, что при гидролизе основных видов сырья, используемых для получения белковых гидролизатов, за счет активности сопутствующих эндопептидаз Протооризин LAP успешно заменяет совместное действие Алкалазы и Флавозима без увеличения расхода ФП.

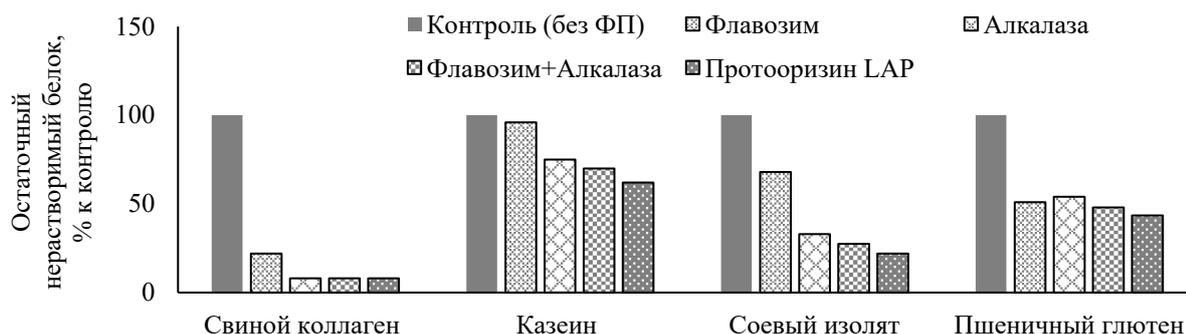


Рисунок 1. Содержание остаточного нерастворимого белка после 3 ч гидролиза различных белковых субстратов протеолитическими ФП

Научно-исследовательская работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2022–2024 гг. (тема FGMP-2022–0006)

### Литература

1. Merz M., Eisele T., Berends P., Appel D., Rabe S., Blank I., et al. Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. *J Agric Food Chem.* 2015; 63 (23): 5682–93.

УДК 577.152.1

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ ОКСИДОРЕДУКТАЗ НА МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ХИТОЗАНОМ И ТРИПОЛИФОСФАТОМ НАТРИЯ****Б.Б. Тихонов<sup>1</sup>, Д.Р. Лисичкин<sup>1</sup>, В.Г. Матвеева<sup>1</sup>, М.Г. Сульман<sup>1</sup>, А. Sh. Desai<sup>2</sup>, J.C.S. dos Santos<sup>3</sup>***ФГБОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия**Аграрный университет им. доктора Баласахей Савант Конкан Криши Видьяпит (DBSKKV), Дапולי, штат Махараштра, Индия**Университет международной интеграции афро-бразильской лузофонии (UNILAB), Бразилия*

Глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4) – фермент класса оксидоредуктаз, димерный флавопротеин, который катализирует окисление β-D-глюкозы до D-глюконо-δ-лактона и пероксида водорода с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [1]. Данный фермент успешно используется в широком диапазоне процессов химической технологии и аналитической химии. Однако применение свободной формы фермента чаще всего нецелесообразно и экономически невыгодно вследствие ингибирующих воздействий на активный центр фермента и невозможности его многократного использования.

Иммобилизация глюкозооксидазы на твердых носителях увеличивает устойчивость фермента к ингибирующим воздействиям, укрепляет его конформацию, а также дает возможность многократно использовать, легко отделяя его от реакционной среды. В настоящее время среди наиболее перспективных носителей для иммобилизации ферментов выделяют носители, обладающие магнитными свойствами, которые отделяются практически без потерь от реакционной среды с помощью постоянного магнита.

В данном исследовании был синтезирован биокатализатор на основе глюкозооксидазы и магнитных наночастиц  $F_3O_4$ , модифицированных хитозаном и триполифосфатом натрия и изучены его каталитические свойства.

Для синтеза наночастиц смешивали 15 мл раствора  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (2,162 г. в 15 мл дистиллированной воды) и 15 мл раствора  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  (0,792 г. в 15 мл дистиллированной воды) в стеклянном реакторе объемом с рубашкой, оборудованном обратным холодильником, входом для подачи аммиака водного и магнитной мешалкой. Смесь перемешивали 15 минут со скоростью 400 мин<sup>-1</sup>, после чего температуру в реакторе повышали до 65 °С, перемешивали ее еще 15 минут, после чего добавляли по каплям со скоростью 2 мл/мин 10 мл раствора аммиака водного. После окончания дозирования реакцию проводили в течение еще 15 мин. Далее в смесь добавляли 10 мл раствора хитозана (0,01–0,2 г в 10 мл 2Н уксусной кислоты) и перемешивали ее в течение 15 минут. По окончании реакции частицы извлекали с использованием постоянного магнита и несколько раз промывали дистиллированной водой. Для сшивки хитозана на поверхности магнитных частиц их выдерживали в течение 1 часа в растворе триполифосфата натрия (0,05 г. в 50 мл дистиллированной воды), после чего частицы снова несколько раз промывали дистиллированной водой, извлекали с использованием постоянного магнита и высушивали на воздухе.

Для иммобилизации глюкозооксидазы на синтезированных магнитных частицах 0,25 г. высушенных до постоянной массы частиц выдерживали в течение 12 часов в смеси, содержащей 0,1 г карбодиимида, 0,04 г. N-гидроксисукцинимиды и 10 мг глюкозооксидазы. Синтезированный биокатализатор несколько раз промывали дистиллированной водой, извлекали с использованием постоянного магнита и высушивали на воздухе.

Активность и стабильность синтезированного биокатализатора исследовалась в реакции окисления D-глюкозы до D-глюконолактона в термостатируемом стеклянном реакторе при постоянном перемешивании (300 мин<sup>-1</sup>) при температуре 25 °С в течение 60 минут с периодическим отбором пробы из реакционной смеси. Показателем активности глюкозооксидазы является количество образующегося пероксида водорода (эквивалентно прореагировавшей D-глюкозы) в реакционной смеси. Содержание пероксида водорода определялось иодометрически по фотометрированию образующегося синего комплекса йод-крахмал [2].

Были проведены эксперименты по варьированию начальной концентрации D-глюкозы от 2,2 до 22 ммоль/л. Ход реакции в виде зависимости концентрации пероксида водорода от времени для свободной и иммобилизованной форм глюкозооксидазы представлен на Рис. 1 и 2, соответственно.

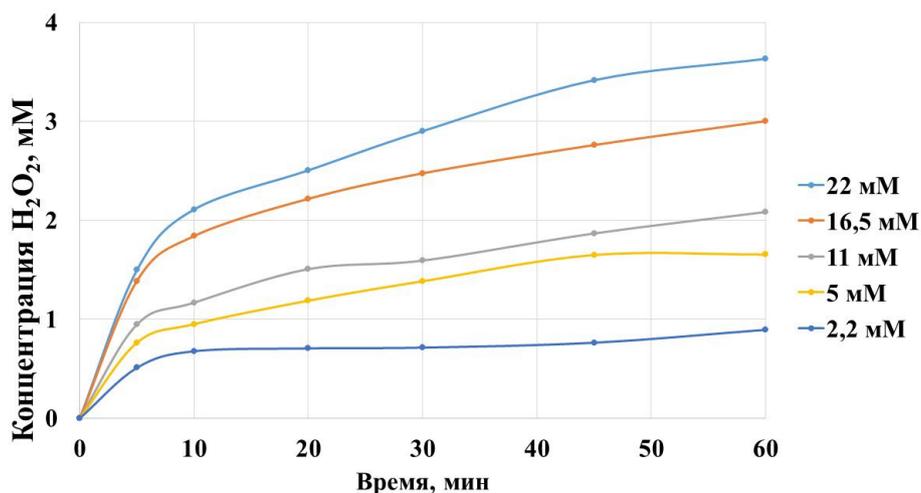


Рисунок 1 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различных начальных концентрациях D-глюкозы для свободной формы глюкозооксидазы

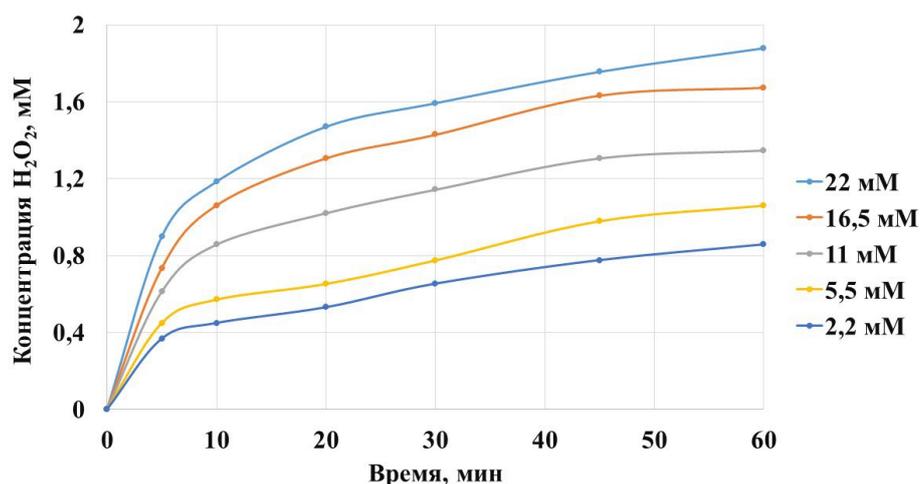


Рисунок 2 – Изменение концентрации пероксида водорода в реакционной смеси при различных начальных концентрациях D-глюкозы для иммобилизованной формы глюкозооксидазы

Из рисунков 1 и 2 видно, что глюкозооксидаза, иммобилизованная на магнитных частицах, обладает немного 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 многократно, что компенсирует потерю активности при однократном использовании.

По результатам исследований были рассчитаны кинетические параметры биокатализатора: активность  $A - 0,25$  ед. ак./мг (48,3 % от активности свободной формы), предельная скорость реакции  $V_m - 0,77$  ммоль/л·с (51,9 %); константа Михаэлиса  $K_M - 2,34$  ммоль/л (123 %).

Синтезированный биокатализатор может быть использован для промышленного получения D-глюконовой кислоты и аналитического определения концентрации D-глюкозы в биологических жидкостях.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект № 075–15–2022–1232).*

### Литература

1. Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L. // *Biotech. Adv.* 2009. Vol. 27. P. 489–501.
2. Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сидоров А.И., Сульман М.Г. // *Вестник Тверского государственного университета. Серия «Химия»*. 2021. № 2(44). С. 18–25.

УДК 573.6.086.83:577.114.4

**БИОТЕХНОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ЕЕ КОМПОЗИТОВ:  
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
И БИОМЕДИЦИНЕ****Т.И. Громовых<sup>1</sup>, М.А. Алехина<sup>1</sup>, И.И. Гайдашева<sup>1</sup>, П.С. Громовых<sup>1</sup>, В.С. Садыкова<sup>2</sup>***ФГАОУ ВО Московский политехнический университет, Москва, Россия  
ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия*

Целлюлоза бактериального происхождения выгодно отличается от других полимеров рядом свойств. Она способна удерживать влагу в соотношении 309 г. воды на грамм сухого веса, выдерживает температуры до 150 °С, а подвергнутая химической обработке – до 275 °С, что позволяет высушивать ее без повреждения структуры. Несмотря на такие механические характеристики, бактериальная целлюлоза в то же время обладает хорошей упругостью, эластичностью, пластичностью. Для метаболизма человека она инертна, а чистота и отсутствие примесей в виде лигнина, пектина и гемицеллюлоз делают ее нетоксичной и потому подходящей для медицинских целей [1]. Физико-химические и механические свойства целлюлозы и ее поведение в различных средах определяются ее структурой, прежде всего степенью кристалличности, кристаллической модификацией и распределением кристаллитов по размеру. Для БЦ характерны малые размеры кристаллитов и высокая степень кристалличности [2]. Волокнистая структура бактериальной целлюлозы обладает высокой пористостью, что, наряду с сетчатым строением, определяет ее чрезвычайно большую водоудерживающую способность. В нативном состоянии бактериальная целлюлоза представляет собой гидрогель – содержание целлюлозы в исходных пленках не превышает 1 %. Пленки способны удерживать воду в течение длительного времени. Водоудерживающая способность бактериальной целлюлозы гораздо выше, чем у целлофана и фильтровальной бумаги (содержание воды в этих материалах не превышает 70 %) [3].

В настоящее время известно много представителей грамтрицательных бактерий, способных синтезировать целлюлозу, принадлежащих к родам: *Gluconacetobacter* (панее *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* [27]. Целлюлоза также синтезируется штаммами грамположительных бактерий вида *Sarcina ventriculii*, сконструированных с помощью методов геной инженерии и штаммами видов *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Наиболее эффективными продуцентами для биосинтеза бактериальной целлюлозы являются продуценты видов: *Gluconacetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter hansenii* и *Gluconacetobacter pasteurianus* [4].

Растущий интерес к данному полимеру приводит к необходимости синтезировать его в больших количествах и, как следствие, искать более продуктивные штаммы и разрабатывать способы удешевления и оптимизации питательных сред [2]. Существуют различные способы культивирования бактериальной целлюлозы вышеописанными продуцентами: в стационарных условиях и в условиях перемешивания на шейкер-инкубаторах или в биореакторах. Метод стационарного культивирования является относительно простым, поэтому наиболее часто используется при лабораторных исследованиях. А способ культивирования в условиях перемешивания чаще применяются при биосинтезе бактериальной целлюлозы в промышленных масштабах [4]. Следует отметить, что способ культивирования бактериальной целлюлозы влияет на форму продуцируемого полимера. Как было указано выше, в стационарных условиях образуются пленки бактериальной целлюлозы, а в условиях перемешивания бактериальная целлюлоза синтезируется в форме неправильных или сферических агрегатов [5]. Биополимер бактериальная целлюлоза уже широко используется в мире в различных направлениях: пищевой промышленности, медицине, энергетике, экологии, текстиле, бумажной промышленности.

Не смотря на то, что в России активно проводятся исследования по выделению продуцентов и разработке биотехнологии бактериальной целлюлозы, до сих пор нет промышленного производства этого полимера. Одной из причин такого положения является отсутствие разработок по использованию дешевых субстратов для промышленного производства. В связи с этим, целью настоящей работы было оценить возможность получения бактериальной целлюлозы на более дешевых субстратах. В качестве альтернативы представляло интерес оценить возможность использования продукта производства кормовой патоки «БиоАксель» как источника углерода и азота для биосинтеза бактериальной целлюлозы продуцентом *Gluconacetobacter hansenii*.

Выделенный нами в 2008 году и депонированный в качестве первого продуцента бактериальной целлюлозы в России штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547), был рекомендован как промышленный продуцент бактериальной целлюлозы. Штамм *Gluconacetobacter hansenii* – облигатный аэроб, имеет клетки цилиндрические, подвижные размерами 0,6–1,2×1–3 мкм, расположенные поодиночке, в парах, в коротких цепочках или в небольших кластерах. Как правило, при культивировании в стационарных условиях образует пленки, на которых клетки иммобилизуются в больших количествах.

Исследуемый штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 растет на питательных средах, содержащих различные моно- и дисахариды в качестве источников углерода, более продуктивно синтезирует экзополимер бактериальную целлюлозу на среде, содержащей сахарозу, чем на среде, содержащей глюкозу. Однако штамм *G. hansenii* GH-1/2008 не растет на среде с добавлением больших концентраций этанола и в присутствии 4–8 % уксусной кислоты. Этанол является стимулятором синтеза целлюлозы при концентрации 0,3–1,5 %, но при более высоких концентрациях ингибирует процесс биосинтеза целлюлозы [6].

В 2013 году были проведены первые испытания использования полимера бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 на среде с сахарозой, в качестве пищевой добавки при изготовлении пищевого продукта вареной колбасы [7].

Известно, что моно- и дисахариды и пептон являются наиболее дорогостоящими компонентами питательных сред для культивирования продуцентов бактериальной целлюлозы, в связи с чем российской компанией «Партнер-М» было предложено использование кормовой патоки «БиоАксель» как основного компонента питательной среды для продуцента *G. hansenii* GH-1/2008. Продукт «БиоАксель» получают путем глубокой переработки сои, и он может служить в качестве альтернативного источника углеродного и азотного питания для культивирования различных продуцентов, в том числе и продуцентов бактериальной целлюлозы. Характеристика «БиоАкселя» представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика и состав кормовой патоки «БиоАксель» [8]

Показатель	«БиоАксель»
Внешний вид	Вязкая паста при содержании сухих веществ 50–55 %, коричневого цвета
Запах	Присутствие растительной ноты
Вкус	Сладковатой мелассы
Белок, % асв	12–15
Сахара, % асв, включая:	42–47
глюкоза	2–3
фруктоза	2–3
галактоза	2–3
сахароза	21–23
раффиноза	3–4
стахиоза	10–12
Полисахариды, % асв	12–15
Минеральные вещества, % асв	4–16

компонентами среды являлись «БиоАксель», глюкоза, дрожжевой экстракт, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, моногидрат лимонной кислоты и этиловый спирт. Варьируемым параметром была концентрация «БиоАкселя» в питательной среде, и в зависимости от ее величины, изменяли концентрации глюкозы и дрожжевого экстракта, так как «БиоАксель» содержит в своем составе 42–47 г./л сахаров и 12–15 г./л протеина. Концентрацию «БиоАкселя» в среде изучали на пяти уровнях с шагом 40 г./л. Эксперимент проводили в трех повторностях. План эксперимента представлен в таблице 2. Для удобства обозначения питательные среды с различными концентрациями (от нулевой контрольной не содержащей «БиоАкселя», до максимальной, без глюкозы) названы цифрами от I до V.

## Методы исследований

Культивирование штамма *G. hansenii* GH 1/2008 проводили на модифицированных средах, содержащих в качестве источников углерода глюкозу и «БиоАксель». Для изучения возможности замены глюкозы на «БиоАксель» в питательной среде для культивирования штамма-продуцента бактериальной целлюлозы был спланирован однофакторный эксперимент по методу Гаусса–Зайделя. В результате эксперимента оценивали продуктивность бактериальной целлюлозы штаммом *G. hansenii* GH 1/2008 на единицу объема питательной среды, содержащей «БиоАксель и глюкозу (г/л). Исходными

Таблица 2 – План эксперимента для подбора состава питательных сред с «БиоАкселем» для биосинтеза бактериальной целлюлозы штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008

Компонент среды	Питательная среда				
	I	II	III	IV	V
«БиоАксель»	0	40 г./л	80 г./л	120 г./л	160 г./л
Глюкоза	20 г./л	15 г./л	10 г./л	5 г./л	0
Дрожжевой экстракт	8 г./л	6 г./л	4 г./л	2 г./л	0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,7 г./л	2,7 г./л	2,7 г./л	2,7 г./л	2,7 г./л
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 г./л	2 г./л	2 г./л	2 г./л	2 г./л
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 г./л	3 г./л	3 г./л	3 г./л	3 г./л
Моногидрат лимонной кислоты	1,15 г./л	1,15 г./л	1,15 г./л	1,15 г./л	1,15 г./л
Спирт этиловый	5 мл	5 мл	5 мл	10 мл	10 мл
Вода дистиллированная	1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл

Культивирование штамма *G. hansenii* GH 1/2008 на питательных средах с различными концентрациями «БиоАкселя» и глюкозы проводили стационарно при температуре 20 °С в течение 10 суток. Синтезированные пленки отделяли от питательной среды и отмывали в растворе буфера RIPA следующего состава: 25 мМ Трис-НСl, рН 7–8, 150 мМ NaCl, 0,5 % дезоксихолат натрия, 1 % Тритон X-100, 0,1 % SDS в течение суток. Затем пленки промывали дистиллированной водой в течение 5–7 суток, меняя воду каждые 24 ч.

Высушивание пленок бактериальной целлюлозы производили двумя способами: на воздухе до абсолютного сухого веса с контролем остаточной влажности с использованием влагомера (AND, Япония); на лиофильной установке (КС30, Чехословакия).

После высушивания и измерения веса сухих пленок проводили оценку их влагоудерживающей способности. Выход бактериальной целлюлозы выражали в виде абсолютно сухой массы (а.с.м.) на единицу объема культуральной среды. Продуктивность штамма на средах рассчитывали по формуле (1).

$$P = m/V \times 1000, \quad (1)$$

где  $m$  – средняя масса полученных абсолютно сухих пленок, г;  $V$  – объем среды в одной повторности, мл.

Получение нанокompозита на основе бактериальной целлюлозы и антимикробного пептида и оценка х антибиотической активности

Бактериальная целлюлоза – полимер, не обладающий антимикробной активностью, поэтому при рекомендации использования пленок необходимо насыщение её антимикробными препаратами. Одним из наиболее эффективных и широко используемых пептидных антибиотиков местного применения является Грамицидин С. Композиты бактериальной целлюлозы и антибиотиков пептидной природы были получены методом импрегнации. Из пленок бактериальной целлюлозы, высушенных на воздухе, вырезали диски диаметром 6 мм, на одни диски наносили по 100 мкл раствора Грамицидина С с концентрацией 100 мкг/мл. В качестве контрольного образца использовали диски бактериальной целлюлозы без нанесения антибиотика. Оценка антимикробных свойств композитов проводили методом дисков на тест-культурах штаммов патогенных мицелиальных и дрожжевых микроскопических грибов *Aspergillus niger* INA 00760, *Candida albicans* ATCC 2091, тест-культурах грамположительных штаммов бактерий – *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NCTC 8340 и штаммов грамотрицательных бактерий – *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### Результаты и обсуждение

Исследования показали, что продуцент *G. hansenii* GH 1/2008 одинаково хорошо растет на средах с различными концентрациями «БиоАкселя» и образует пленки, которые хорошо отбеливаются при вымывании детергентами. Оценка продуктивности бактериальной целлюлозы штаммом *G. hansenii* GH 1/2008 на средах с различными концентрациями «БиоАкселя» показала, что выход бактериальной целлюлозы на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода «БиоАксель» в различных концентрациях, достоверно не отличается в сравнении с выходом полимера на среде с глюкозой (таблица 3).

Таблица 3 – Масса синтезируемой бактериальной целлюлозы на 10 сутки культивирования штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на средах с различными концентрациями «БиоАкселя», г/л

Выход бактериальной целлюлозы (а. с. в., г/л) на средах с различными концентрациями «БиоАкселя»				
(0:20)	(5:15)	(10:10)	(15:5)	(20:0)
3,09±0,04	3,02±0,05	3,09±0,021	3,09±0,13	3,08±0,04

При оценке наноструктуры пленок бактериальной целлюлозы было показано, что плотность фибрилл бактериальной целлюлозы в пленках, синтезированных на питательных средах с высокими концентрациями «БиоАкселя», достоверно не отличается на среде с глюкозой (Рисунок 1).

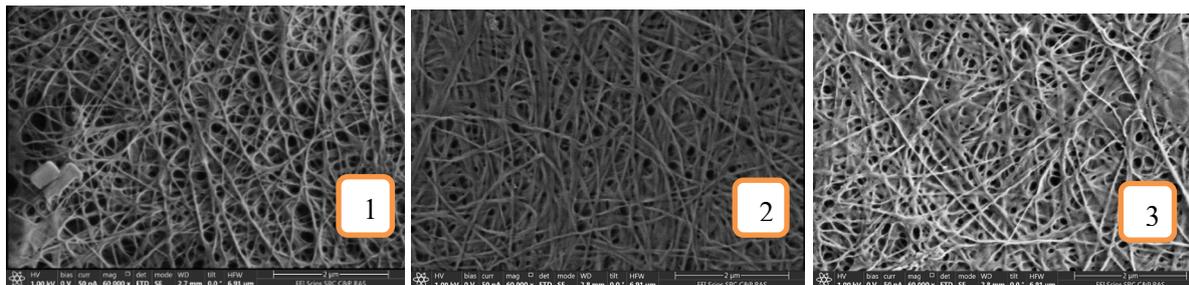


Рисунок 1. Наноструктура пленок бактериальной целлюлозы, синтезированных на среде с глюкозой и на средах с различной концентрацией «БиоАкселя» (сканерная микроскопия): 1 – 20 г./л глюкозы; 2 – 80 г./л «БиоАкселя»; 3 – 120 г./л «БиоАкселя»

Из синтезированных продуцентом пленок после измельчения в гомогенизаторе были получены гели, которые после высушивания можно использовать в качестве материала для получения порошка микрокристаллической целлюлозы.

По результатам исследований антибиотической активности полученных композитов установлено, что бактериальная целлюлоза без внесения грамицидина С не обладает антимикробной активностью, а с внесением Грамицидина С проявляет биоцидное действие против *B. subtilis*, *C. albicans*, *S. aureus*, *M. luteus* и *P. aeruginosa*. Таким образом, метод создания композитных материалов на основе бактериальной целлюлозы с Грамицидином С эффективный для придания новых функциональных возможностей материалам на основе бактериальной целлюлозы, который имеет большой потенциал в области биотехнологии и биомедицины. Результаты оценки антибиотической активности представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Оценка антибиотической активности композитов бактериальной целлюлозы и Грамицидина С

Вариант синтезированной плёнки на среде	Образец	Зона, мм						
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC	<i>A. niger</i> INA 00760	<i>C. albicans</i> ATCC	<i>S. aureus</i> 209P	<i>M. luteus</i> NCTC	<i>P. aeruginosa</i> ATCC
0:20 Глюкоза	Целлюлоза+грамицидин С	11	0	0	8	11	10	11
	Контроль: целлюлоза	0	0	0	0	0	0	0
10:10 БиоАксель: Глюкоза	Целлюлоза+грамицидин С	8	0	0	8	17	0	0
	Контроль: Глюкоза	0	0	0	0	0	0	0
20:0 БиоАксель	Целлюлоза+грамицидин С	11	0	0	9	0	10	10
	Контроль: целлюлоза	0	0	0	0	0	0	0
-	Контроль: р-р Грамицидина С	-	-	-	-	25	16	15

Примечание: «-» исследования не проводили

Все проведенные исследования показали, что «БиоАксель» целесообразно рекомендовать как компонента питательной среды для биосинтеза бактериальной целлюлозы штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008.

### Литература

1. Andriani D., Apriyana A.Y. and Karina M. The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review // *Cellulose*. – 2020. – № 27. – P. 6747–6766. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03273-9>
2. Sulaeva, I. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. / I. Sulaeva, U. Henniges., T. Rosenau, et al. // *Biotechnology Advances*. – 2015. – № 33 (8). – P. 1547–1571.
3. Скворцова, З.Н. Физико-химическая механика бактериальной целлюлозы / З.Н. Скворцова, Т.И. Громовых, В.С. Грачев [и др.] – *Коллоидный журнал*. – 2019. – Т.81, № 4. – С. 441–452.
4. Lahiri D. Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent / D. Lahiri, M. Nag, B. Dutta et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – № 20 (21). – P. 1–18.
5. Gromovykh, T.I., Pigaleva, M.A., Gallyamov, M.O., Ivanenko, I.P., Ozerova, K.E., Kharitonova, E.P., Bahman, M., Feldman, N.B., Lutsenko, S.V., & Kiselyova, O.I. Structural organization of bacterial cellulose: The origin of anisotropy and layered structures // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – 237. – 116140. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116140>
6. Патент РФ 2464307С1. Штамм бактерии *Glucanacetobacter hansenii* GH-1/2008 – продуцент бактериальной целлюлозы / Громовых Т.И., Фан М.Х. – Оpubл. 20.10.2012.
7. Громовых Т.И. Перспективы применения бактериальной целлюлозы в мясопродуктах / Т.И. Громовых, Фан Ми Хань, Е.Г. Бирюков, Т.Н. Данильчук, Г.Г. Абдрашитова // *Мясная Индустрия*, 2013, № 4. – с. 32 -35.
8. Кормовая патока БиоАксель [Электронный ресурс]: Партнер-М URL: <https://partnermk.ru/product/bioaksel/> (дата обращения: 29.07.2023).

**ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ GALLERIA MELLONELLA В БИОТЕХНОЛОГИИ****Е.А. Прутенская, А. Айт Балахсен, В.А. Базулева**

ФГБОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

В последнее время насекомые стали активно использоваться в биотехнологии не только как источник клеточных линий, но и как продуценты биологически активных веществ. Чаще всего проводятся исследования с личинками зеленой мухи, мучного хряща, зофобаса [1–4], а также личинками восковой моли [5]. Для промышленного культивирования считаются пригодными саранча, муха черная львинка, мраморный таракан и другие. К преимуществам использования насекомых в биотехнологических процессах относят [6, 7]: легкость выращивания объекта, низкая себестоимость субстратов, не длительный жизненный цикл, быстрое наращивание биомассы. Все это позволяет создать конкурентоспособное производство.

Считается, что к 2030 году сильно увеличится количество площадей по выращиванию биомассы личинок для получения белка и жира [4]. Это связано с тем, что белковая продукция, полученная из насекомых, пользуется большим спросом в животноводческом комплексе, зоопарках, рыбных хозяйствах. Личинки используют в качестве корма в культуре земноводных, например для наращивания биомассы молодых жаб [1]. Кроме этого, из насекомых получают карминовую кислоту, хитин, меланин, хитозан и т. д. [8, 9].

Широкое применение в настоящее время находят и личинки *Galleria mellonella*. Большое количество исследований направлено на изучение веществ белковой природы в иммунном ответе. Пчелиную моль используют в качестве экспериментальной модели при изучении ответной реакции на заражение патогенной микрофлоры: микроскопическими грибами, золотистым стафилококком и т. д. Эта модель дает полезную информацию о механизмах вирулентности, патогенеза и противомикробной эффективности. В последние несколько десятилетий исследования показали положительную корреляцию между результатами получено на моделях *G. mellonella* и млекопитающих [7, 10]. Отсутствие биоэтических ограничений и возможность выборки позволяет использовать *Galleria mellonella* в качестве тест-системы при определении LD50 лекарственных и токсичных веществ.

В исследованиях Осокиной А.С. [11] описано, что продукты жизнедеятельности личинок *G. mellonella* ослабляют антибиотикорезистентность *E. coli* и усиливают действие ряда антибиотиков (левомицитин, энрофлоксацин, гентомицин, доклицитин).

На кафедре Биотехнологии, химии и стандартизации ТвГТУ проводятся исследования по выделению белковых веществ из гусениц пчелиной моли и определению их функциональной активности.

Пчелиную моль выращивали в стеклянном реакторе, на старых сотах без добавления воды и других субстратов. Температура поддерживалась в диапазоне 25<sup>0</sup>С. Субстрат докладывали дважды для увеличения массы гусениц. По окончании процесса выбирали гусениц и замораживали. Затем осуществляли химические и биохимические анализы.

В соответствии с ГОСТ 13496.4–93 было определено общее содержание белка в гусеница, массовая доля составила 43,68. В связи с тем, что в гусеницах было обнаружено большое количество белка был изучен его аминокислотный состав. Были обнаружены следующие аминокислоты: лизин – 1,33 %, аргинин – 1,96 %, глицин – 1,96 %, тирозин – 1,27 %.

В соответствии с полученными и литературными данными гусеницы пчелиной моли, выращенные на сотах, могут быть использованы в качестве кормовой добавки.

Следующим этапом работы стало фракционирование белков и изучение их функциональной активности. Извлечение белков из гомогенизата гусениц осуществляли фосфатными буферами. Осаждение белковой фракции осуществляли сульфатом аммония. Полученные белковые вещества использовали в опытах в качестве реактивов. Ферментативные реакции проводили с использованием двух субстратов: растительного масла и тирозина. Белковые вещества, выделенные фосфатными буферами в диапазоне рН от 6 до 8, оказались активными в отношении растительного масла, следовательно в составе белковой фракции имеются липазы. Белковые фракции, выделенные фосфатными буферами с рН 7–9, трансформировали тирозин в темноокрашенные соединения (рисунок 1).



Рис. 1– Изучение тирозиназной активности белковых веществ, выделенных из гусениц пчелиной моли

В соответствии с полученными результатами можно сказать, что в белковых фракциях находится тирозиназа.

Тирозиназа – фермент, катализирующий синтез меланина из тирозина. Следовательно, темноокрашенные соединения, полученные в результате биохимических реакций – меланин. Для интенсификации синтеза меланина было изучено влияние pH среды на активность тирозиназы (таблица 1). Наибольшее количество меланина было образовано при pH 9,18.

Таблица 1 – Влияние pH среды на активность тирозиназы

pH	5,91	6,98	8,04	9,18
Оптическая плотность	0,497	0,682	0,770	0,803

Получение меланина с использованием ферментов гусениц *Galleria mellonella* является перспективным направлением исследований. Меланин имеет широкий спектр применений, включая косметическую, фармацевтическую и радиоэлектронную отрасли. При использовании ферментов из гусениц возможно получение меланина с более высокой степенью чистоты и биологической активности.

Итак, на основании полученных результатов исследования можно сказать, что гусеницы *Galleria mellonella* представляют потенциальный источник белковых веществ, в том числе ферментов для синтеза меланина. При этом процесс получения меланина с использованием этих ферментов имеет перспективы для промышленного применения. Дальнейшие исследования в этой области могут привести к разработке новых методов и технологий получения меланина с помощью ферментов гусениц и расширению его применения в различных отраслях.

### Литература

1. Дроздова Л.С. и др. Переваримость питательных веществ некоторых живых кормов у жабы Латаста, BUFOTES LATASTII (AMPHIBIA, ANURA, BUFONIDAE) после метаморфоза // Естественные и технические науки. 2020. № 3 С. 88–94.
2. Зименс Ю.Н. Альтернативные источники белка и их использование в рыбоводстве / Зименс Ю.Н., Орленко Е.В., Витулис О.Е. // В сборнике: Состояние и пути развития аквакультуры в Российской Федерации. Материалы VII национальной научно-практической конференции. – Саратов. – 2022. – С. 45–49.
3. Данильченко С. и др. Насекомые как альтернативный источник белка // Агрокрым. – 2021.– № 16(212). – С. 6.
4. Карабут Т. Протени XXI века: сверчки, тараканы и личинки мух/ Карабут Т. // Агроинвестор. – 2019.– № 6.-с. 44–51.
5. Пономарев В.Л. Феромоны большой вощинной огневки (GALLERIA MELLONELLA) и соснового коконопряда (*Dendrolimus PIN L.*)/ Пономарев В.Л. автореферат канд диссертации на к.б.н. г. Москва 2007. – 16 с.
6. Гайдай Д.С. Личинки большой восковой моли как модельный объект для исследования новых лекарственных средств / Гайдай Д.С., Гайдай Е.А., Макарова М.Н. // Международный вестник ветеринарии. – 2017.– № 2. – с. 82–90.
7. Jotj-aoa A.L. et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies//Virulence. – 2018. – V. 9.– № 1. – P. 383–389; doi.org/10.1080/21505594.2017.1397871
8. Пастернак Н.А. и др. История применения карминового красителя // Сборник по материалам Всероссийской научно-практической конференции Дизайн и искусство – стратегия проектной культуры XXI века. – 2019. – с. 76–79.
9. Останина Е.С. Получение хитина и хитозана из восковой моли *Galleria mellonella*/ Останина Е.С., Лопатин С.А., В.П. Варламов // Биотехнология. – 2007. – № 3.-с. 38–45.
10. Borman A.M. Of mice and men and larvae: *Galleria mellonella* to model the early host-pathogen interactions after fungal infection/ Borman A.M. // Virulence. – 2018. – V. 9.– № 1. – P. 9–12;doi.org/10.1080/21505594.2017.1382799
11. Осокина А.С. Определение микробной чувствительности к экстрактам из личинок большой восковой моли и их продуктов жизнедеятельности (GALLERIA MELLONELLA L.) / Осокина А.А., Масленников И.В. // Вестник КрасГАУ. – 2021.– № 7. – С. 100–107. DOI: 10.36718/1819-4036-2021-7-100-107

## **ФЕРМЕНТАТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ИЗОЛЯТА БЕЛКА АМАРАНТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПИЩЕВЫХ ЦЕЛЯХ**

*О.Л. Мещерякова, Л.И. Василенко, О.С. Корнеева*

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия*

В современном мире постоянно растет потребность в белках и продуктах на их основе. Особую значимость приобретают вопросы обеспечения населения белковыми компонентами питания, а также повышается приоритет исследований в этом направлении, подтверждаемый разработкой и осуществлением специальных программ в промышленно-развитых странах мира [1]. Растительное сырье для производства белков значительно дешевле, чем сырье животного происхождения, более доступно и требует меньших затрат для хранения и транспортировки. Это очень важно для стран с ограниченными экономическими ресурсами [2]. При этом качество пищевого белка характеризуется, прежде всего, его биологической ценностью, аминокислотным составом, коэффициентом переваримости. Большинство растительных белков лимитированы по одной или нескольким незаменимым аминокислотам. Белки злаковых культур лимитированы по лизину и треонину, бобовых культур – по метионину и цистеину. серосодержащих аминокислот. Для использования в пищевой промышленности выбранные белки должны обладать широким спектром функциональных свойств, тесно связанных с их структурой.

Белки амаранта представляют собой альтернативу или дополнение для обеспечения пищевой промышленности белками благодаря сбалансированному составу незаменимых аминокислот и достаточному содержанию серосодержащих аминокислот. Основные белковые фракции семян амаранта (альбумины, глобулины, глютелины, проламины) обладают различными функциональными свойствами благодаря разнообразию их структурных и физико-химических свойств.

Одним из способов концентрирования белков является получение изолята, белкового продукта, очищенного от жира, углеводов и клетчатки, с содержанием белка не менее 85 % [3]. Белковые изоляты могут проявлять функциональную универсальность из-за структурного разнообразия их фракционного состава. Однако в процессе выделения белков из сырья может происходить изменения структуры белка за счет влияния жестких условий выделения, что приводит к снижению растворимости в водных растворах и изменению технологических свойств, и ограничивает их использование в пищевой промышленности. Из известных способов модификации функциональных свойств белковых изолятов распространена ферментативная модификация путем обработки изолятов белков препаратами с протеолитической активностью для улучшения их функционально-технологических свойств.

Изолят белка амаранта получали ферментативным гидролизом ферментными препаратами амилитического действия с последующей солевой и щелочной экстракцией белков и осаждением ледяной уксусной кислотой в изоэлектрической точке. Гидролиз изолята белка осуществляли в течение 6 ч при внесении папаина в реакционную смесь 0,019 едА/мг белка и температуре 40° С.

Изолят белка амаранта представлен в основном альбуминами, 11S-глобулинами и глобулинами-Р, которые являются легуминподобными белками, состоящих из единичных молекул, подобных 11S-гексамерам и крупных полимеров [3]. Начальный этап протеолиза изолята белка амаранта – модификация 11S-глобулина – происходит в течение 4 ч, в ходе которого белок расщепляется на субъединицы с молекулярной массой сначала 30–50, а затем 22–30 кДа. В результате протеолиза папаином в течение 4 ч установлено отсутствие в полученных фракциях глобулина-Р, что позволяет предположить расщепление данного белка на полипептиды, участвующих в полимеризации глобулина и, как следствие, увеличение растворимости белка амаранта в воде. Под влиянием протеолиза переходят в раствор гидрофильные полипептидные  $\alpha$ -цепи, расположенные на поверхности олигомерного белка. Это снижает гидрофильные свойства белковой молекулы, так как в олигомерной молекуле выходят на поверхность и выявляются гидрофобные полипептидные  $\beta$ -цепи. Олигомерный белок приобретает гидрофобные свойства. Модифицированный протеолизом белок приобретает выраженные эмульгирующие, пенообразующие и другие поверхностно-активные свойства из-за гидрофобизации его поверхности. Дальнейшее углубление гидролиза белка приводит к снижению его поверхностно-активных свойств, начинается потеря гидрофобных  $\beta$ -цепей и гидрофильные свойства белка растут. Таким образом более длительный протеолиз способствовал росту гидрофильных свойств при сохранении белками пенообразующей способности (ПОС) и высокой стойкости пены (СП) на прежнем уровне.

Установлено модифицирующее ферментативное воздействие на белок изолята, которое приводит к разрушению структуры олигомерных белков и выявлению поверхностей с новыми характеристиками, изменяющими функциональные свойства белка амаранта. Выявленное изменение функциональных свойств белка амаранта, модифицированного частичным протеолизом по сравнению с исходным изолятом белка амаранта, обусловлено гидролитическим действием папаина. Также показано увеличение растворимости ферментированного папаином белка амаранта в водном растворе за счет расщепления глобулина-Р в гидролизованном белковом препарате. Полученные данные позволяют рекомендовать модифицированный белок амаранта в пищевых целях.

*Работа проводилась при финансовой поддержке РНФ в рамках проекта № 22-26-00277*

### Литература

1. Воронова, Н.С. Исследование белков семян льна как полноценных и необходимых для здоровья человека / Н.С. Воронова, Л.С. Береди́на // Молодой ученый. – 2015. – № 14. – С. 144–147.
2. Ку́динов, П.И. Современное состояние и структура мировых ресурсов растительного белка / П.И. Ку́динов, Т.В. Щеколдина, А.С. Сли́зкая // Известия вузов. Пищевая технология. – 2012. – № 4. – С. 124–130.
3. Компанцев, Д.В. Белковые изоляты из растительного сырья: обзор современного состояния и анализ перспектив развития технологии получения белковых изолятов из растительного сырья / Д.В. Компанцев, А.В. Попов, И.М. Привалов, Э.Ф. Степанов // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 1.
4. Martí'nez, E.N., & An'ó'n, M.C. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44, 2523–2530.

УДК (637.1)

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2023-4-47-48>

## БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ

*Г.П. Шуваева, Т.В. Свиридова, О.В. Лепехина, А.Р. Арзуманова*

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия*

На сегодняшний день люди стремятся не просто удовлетворить свои пищевые потребности, а задумываются о том, как обеспечить организму здоровый и сбалансированный рацион, чтобы улучшить и сохранить здоровье. Один из путей реализации этой задачи – употребление продуктов, содержащих пробиотики, определяющие состав и свойства микробиоценоза желудочно-кишечного тракта. Производители уделяют большое внимание разработке такой продукции, поскольку она становится все более популярной и пользуется повышенным спросом. Значительно выросло число потребителей, предпочитающих пищевые продукты и пищевые добавки, не являющиеся лекарственными средствами, но существенно улучшающие состояние здоровья. Мировой рынок пробиотических пищевых добавок, предположительно, будет расти в среднем на 10,58 % в период с 2020 г. по 2025 г. Однако, российский рынок по-прежнему не достаточен и требует расширения ассортимента, что особенно остро ощущается в связи с санкциями, наложенными на Российскую Федерацию рядом западных стран, и уходом некоторых иностранных компаний.

Анализ информации, содержащейся в доступных источниках научной и научно-технической литературы, показал, что в качестве пробиотиков преимущественно используются бактериальные штаммы, особенно молочнокислые бактерии. Для производства пробиотических добавок на основе лактобактерий необходимо первоначально удостовериться в целесообразности использования конкретного микроорганизма и решить проблему его культивирования.

Основными критериями для скрининга характеристик потенциальных пробиотических штаммов являются: устойчивость к кислотности желудочного сока; активность гидролазы солей желчных кислот, устойчивость к желчи; адгезия к слизи и / или эпителиальным клеткам; антимикробная и антагонистическая активности в отношении потенциально патогенных бактерий. Для разработки пробиотической пищевой добавки был отобран штамм *Lactobacillus paracasei*, отвечающий всем этим требованиям.

Как показал эксперимент, в условиях, имитирующих среду желудочно-кишечного тракта, *Lactobacillus paracasei* характеризуется высокой устойчивостью к желчи и фенолу, проявляя способность к росту в широком диапазоне pH.

Антагонистическую активность устанавливали в отношении тест-культуры *E. coli*, определяя этот показатель при использовании отсроченного антагонизма методом перпендикулярных штрихов. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Антагонистическая активность культуры *Lactobacillus paracasei*

Температура культивирования, °С		Размер зоны задержки роста тест-культуры <i>E.coli</i> , мм
Основного штриха	Тест-культуры <i>E.coli</i>	
30	30	27
37	37	21
30	37	24
37	30	24

Определение чувствительности к антибиотикам показало, что *L.paracasei* проявляет чувствительность (S) к ампициллину, цефалотину и резистентность (R) к гентамицину, канамицину и азитромицину (табл. 2).

Таблица 2 – Устойчивость *Lactobacillus paracasei* к антимикробным препаратам

Препарат	Диаметр зоны ингибирования роста, мм	Оценка чувствительности лактобактерий
Группа аминогликозидов		
1. Гентамицин	11,0	R
2. Канамицин	7,0	R
Группа пенициллинов		
3. Ампициллин	26	S
Группа макролидов		
4. Азитромицин	8–10	R
Группа цефалоспоринов		
5. Цефалотин	30	S

В результате проведенных исследований установлено, что пробиотические свойства культуры *Lactobacillus paracasei*, позволяют рекомендовать ее для получения пробиотической пищевой добавки.

Для выращивания молочнокислых бактерий в промышленных масштабах необходимо создавать питательные среды, учитывая особенности их питания и роста. В основе таких сред часто лежат вторичные продукты переработки животного сырья, такие как молочная сыворотка и гидролизированный казеин, которые помогают обеспечить необходимые условия для развития бактерий и получения высокого качества продукции.

В качестве оптимальной питательной среды для производства пробиотической добавки на основе культуры *Lactobacillus paracasei* была подобрана среда с творожной сывороткой, обеспечивающая необходимый выход биомассы, характеризующейся высокой концентрацией клеток пробиотика. Разработанная технология включает приготовление питательной среды, выращивание посевного материала в лаборатории и посевном аппарате, глубинное культивирование в ферментере, отделение биомассы от жидкой фазы культуральной жидкости на сепараторах и лиофильное высушивание, обеспечивающее стабильность пробиотической культуры и более длительный период хранения. Преимущество технологии состоит в использовании дешевого сырья – творожной сыворотки, являющейся отходом молочной промышленности и увеличении выхода биомассы с высокой плотностью популяции.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ КАРОТИНОИДОВ

*Г.П. Шуваева, Т.В. Свиридова, А.Р. Арзуманова, О.В. Лепехина*

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия*

На сегодняшний день неблагоприятным фактором для развития отечественного животноводства является ненадлежащее качество кормов и их плохая сбалансированность по белку и витаминам, в особенности, витамину А и каротиноидам. При недостатке последних у всех видов сельскохозяйственных животных и домашних птиц наблюдаются множественные проблемы со здоровьем, задержка роста и развития, снижение иммунитета. Ассортимент каротиноидных кормовых добавок, представленных на рынке, не покрывает растущие потребности животноводства, в связи с чем остро стоит необходимость в создании новых кормовых добавок с повышенным содержанием каротиноидов.

При разработке технологии получения кормовой добавки целесообразно применение микробиологического синтеза, так как производство такого рода препаратов обеспечивает целесообразное, экономичное и экологичное потребление сырья и ресурсов с большим выходом целевого продукта по сравнению с традиционными технологиями. Микробиологические препараты также выгодно отличаются обилием биологически активных веществ и широтой применения. Каротиноиды, синтезируемые микроорганизмами, характеризуются высокой биологической активностью. Способность к каротиногенезу проявляют различные представители микромира: бактерии, грибы, водоросли, дрожжи. Последние особенно привлекательны в качестве продуцентов для производства кормовой добавки, так как их биомасса богата большим количеством белка, липидов, витаминов и ферментов, оказывающих дополнительный положительный эффект на экономически значимые характеристики сельскохозяйственных животных. Среди каротинсинтезирующих культур дрожжей особо можно выделить представителей рода *Rhodotorula*. Дрожжи этого рода помимо высокой биосинтетической активности выгодно отличаются от других продуцентов высокой скоростью роста и способностью расти на дешевых питательных субстратах и отходах растениеводства (свекловичная меласса, жом, отходы переработки сои, картофеля и т. п.).

В целях разработки технологии по получению кормовой добавки с повышенным содержанием каротиноидов был проведен эксперимент по подбору доступного недорогого субстрата, обеспечивающего полноценное питание продуценту *Rhodotorula* sp., и определению рациональных условий его культивирования. В выбранной в качестве исходной (контрольной) питательной среде MZ-30 были заменены источники углерода и азота, определено оптимальное значение pH питательной среды, продолжительность и температура культивирования. Разработанная питательная среда имеет следующий состав (на 1 л): свекловичная меласса – 35 г., кукурузный экстракт – 5 г, NaCl – 0,5 г, KН<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> – 1,0 г, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub> O – 0,5 г, CaCl<sub>2</sub> – 1 г, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub> O – 0,00003 г. При выращивании продуцента на модифицированной среде в течение 96 ч при 30 °С и значении pH питательной среды 5,5 удалось увеличить выход биомассы на 59 %, белка на 4,7 %, каротиноидов на 30 % (табл. 1)

Таблица 1 – Качественная характеристика кормовой добавки на основе дрожжей *Rhodotorula* sp.

Показатель	Исходная среда (MZ-30)	Модифицированная среда
Выход биомассы, г/л	7,65	11,83
Содержание протеина в пересчете на а.с.в., %	50,6	53
Содержание каротиноидов, мкг/г	490	640

Кормовая добавка, представляющая собой высушенную инактивированную биомассу продуцента, выращенного в экспериментально разработанных оптимальных для роста и развития условиях, превосходит по всем показателям продукт, полученный на исходной среде.

## ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ САХАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА

*М.Ю. Шурбина, Р.Т. Валеева, Д.В. Тунцев*

*ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Казань, Россия*

В мире с каждым годом увеличивается ежегодное производство отходов растительного сырья и только 2–3 % используется в промышленности, миллионы тонн сельскохозяйственных отходов ежегодно остаются неиспользуемыми. Использование такого большого потенциала может не только удовлетворить спрос на лигноцеллюлозное сырье для производства биотехнологических продуктов, но и снизить нагрузку на природную среду, возникающая в результате традиционных форм утилизации: сжигание, оставление гнить в полевых условиях [1].

Одним из наиболее часто культивируемых растений, используемых в сахарной промышленности, является сахарная свекла [1]. Сахарная свекла является экономической культурой во всем мире для производства сахара. Производство сахара из сахарной свеклы является вторым по величине в мире после производства сахара из сахарного тростника, 30 % мирового производства сахара производится из сахарной свеклы [2].

Побочным продуктом при производстве сахара из сахарной свеклы является свекловичный жом, который образуется после экстракции свекольной стружки. Только в Европе ежегодно производится около 13–14 миллионов тонн (в пересчете на сухое вещество) [1], а в Российской Федерации образуется около 21–22 миллионов тонн свекловичного жома. Свекловичный жом состоит в основном из смесей полисахаридов, примерно в равных пропорциях [3].

В КНИТУ г. Казань ведутся исследовательские работы по переработке отходов сахарного производства – свекловичного жома. Исследования ведутся в несколько этапов по:

- подготовке сырья – измельчение сырья и определение оптимальных размеров сырья;
- подбору гидролизующих агентов и концентрации гидролизующих агентов для процессов гидролиза;
- поиску оптимальных технологических параметров процессов гидролиза: температуры, гидромодуля, продолжительности процесса гидролиза;
- подбору ферментов и ферментативных комплексов и их концентрации для процессов ферментативного гидролиза;
- поиску оптимальных параметров процессов ферментативного гидролиза: температуры, продолжительности процесса гидролиза;

Процессы ферментативного гидролиза свекловичного жома проводятся с использованием ферментов: целлюлазы, гемицеллюлазы глюкозидазы, ксиланазы и сочетание ферментов. Процессы ферментативного гидролиза и оценка биологической доброкачественности полученных гидролизатов и ферментализатов проводятся в шейкере-инкубаторе Kuhner ISF1-X при оборотах вращения 100 об/мин в течение 24 или 72 часов.

Рост оптической плотности от момента засева и до завершения процессов выращивания дрожжей на фильтрованных средах с гидролизатами и ферментализатами свекловичного жома составляет более 1,2 ед. экстинкции при длине волны 590 нм и толщине кюветы 5,07 мм. Полученные данные проведенных экспериментальных работ свидетельствуют о возможности использования вторичных сырьевых ресурсов как свекловичный жом в качестве углеводного питания в процессах выращивания биопродуктов.

### Литература

1. Borysiuk P. Sugar beet pulp as raw material for particleboard production / P. Borysiuk [et al] // *Industrial Crops & Products*. – 2019. – V. 141. – P. 1–5.
2. Переработка сахарной свеклы и ее отходов / Э.И. Нуретдинова, М.Ю. Шурбина, А.Н. Садреева, Р.Т. Валеева // *Пищевые технологии будущего: инновации в производстве и переработке сельскохозяйственной продукции: сборник статей II Международной научно-практической конференции*. – Саратов: ООО «Центр социальных агроинноваций СГАУ», 2021. – С. 113–116.
3. Характеристики процессов гидролиза свекловичного жома фосфорной кислотой с целью получения гидролизатов – компонентов питательных сред для микробиологического синтеза / М.Ю. Шурбина, Р.Т. Валеева, Э.И. Нуретдинова, Д.В. Тунцев // *Бутлеровские сообщения*. – 2022. – Т. 71. № 9. – С. 89–95.

**РАЗНООБРАЗИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕАКЦИИ МУЛЬТИГЕННОГО СЕМЕЙСТВА *TRIM* НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ ИНФЕКЦИЮ*****Е.А. Степаненко, В.В. Ненашева, В.З. Тарантул****НИИ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

Врожденная иммунная система служит передовой линией хозяина для устранения вторгшихся патогенных микроорганизмов. В последние годы получены многочисленные данные о молекулярных механизмах антивирусного действия этой системы. Более сложным остается вопрос об участии врожденного иммунитета при взаимодействии с бактериями. В этом вопросе нет однозначности. При этом бактерии, наряду с вирусами, являются одной из главных причин инфекционных заболеваний и смертности во всем мире. Несмотря на разработку новых антибиотиков, бактериальные инфекции остаются серьезной проблемой здравоохранения, так как патогены постоянно адаптируются и вырабатывают новые механизмы резистентности к существующим противомикробным препаратам. Поэтому поиск новых классов антибактериальных агентов является важной и актуальной задачей. Наряду с отдельными указаниями на антибактериальное действие врожденного иммунитета в отношении некоторых видов бактерий, существуют данные о пробактериальном действии этой системы на другие виды бактерий. В последние годы внимание было обращено на разнообразные молекулярные механизмы взаимодействия с бактериями одного из компонентов врожденной иммунной системы животных организмов – мультигенного семейства *TRIM*. (Tripartite motif), основной известной на сегодняшний день функцией которого является участие в противовирусной защите организма. Постепенно становится очевидным, что гены *TRIM* при бактериальной инфекции, также как и при взаимодействии с вирусами, используют схожие механизмы: воспалительную реакцию, убиквитинирование белков, аутофагию, апоптоз, белок-белковое взаимодействие бактериальных и хозяйских белков, интерфероновый ответ, сигнальный путь NF-κB и др. Однако при общей схожести механизмов, используемых разными членами семейства *TRIM* в ответ на вирусные и бактериальные инфекции, конечный результат существенно различается. Отдельные члены семейства *TRIM* участвуют в антибактериальном ответе иммунной системы на некоторые виды бактерий, в то время как другие, наоборот, способствуют размножению ряда видов бактерий. Новые результаты, полученные в последние годы при исследовании влияния *TRIM*ов на бактериальные инфекции, служат важным вкладом в более точное понимание функционирования врожденной иммунной системы животных и человека и могут способствовать поиску новых эффективных средств защиты от вирусных инфекций.

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23–25–00157.*



Уважаемые коллеги!  
Дорогие друзья!

Мы выражаем большую и искреннюю благодарность всем участникам XI 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.

•