

16+

ISSN 2304-4691

Актуальная биотехнология



№ 1

2024

ISSN 2304-4691

**Основан в 2012г.
г. Воронеж**

Актуальная биотехнология

№ 1

2024

16+

Учредитель: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Главный редактор

д.б.н., профессор О.С. Корнеева

Редакционный совет

д.б.н., профессор Е.Н. Ефименко

д.б.н., профессор В.В. Ревин

д.б.н., профессор Д.А. Черенков

д.б.н., профессор С.С. Антипов

д.т.н., профессор В.И. Панфилов

д.т.н., профессор Е. В. Богданова

д.т.н., профессор А.А. Дерканосова

д.т.н., профессор Ю.А. Максименко

к.т.н., доцент А.С. Муравьев

к.т.н., доцент Е.П. Анохина

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год

Официальный сайт «Актуальная биотехнология» www.actbio-vsuet.ru

Подписной индекс издания в агентстве «Роспечать» 58012

Ответственный секретарь: ДЕРКАНОСОВА А.А. (эл. почта: 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

Сдано в набор 14.10.2024. Подписано в печать 30.10.2024

Выход в свет: 01.11.2024

Усл. печ. л. 10,65 Тираж 1500 экз. Заказ.

Цена – свободная.

© ФГБОУ ВО

«Воронеж. гос. ун-т инж.
технол.», 2024

Содержание

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

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ	
А.А. Дерканосова, И.С. Косенко, Г.Н. Егорова.....	6
СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ	
А.А. Дерканосова, А.В. Дранников, Г.Н. Егорова.....	8
ИЗУЧЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА <i>LACTOBACILLUS</i>	
А.И. Петрухина, В.А. Олейникова, А.С. Козликина, О.В. Зверева, Е.А. Мотина.....	9
КЕФИРНЫЙ ПРОДУКТ С КОНЦЕНТРАТОМ МИЦЕЛЛЯРНОГО КАЗЕИНА	
Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова, Ю.П. Кулумбегова, Я.А. Дорохова.....	10
ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ФЕРМЕНТИРОВАННОГО ИВАН-ЧАЯ	
М.Я. Комаров, Ф.П. Балдынова.....	11
ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПЕКТИНА ИЗ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ И МИКРОВОЛНОВОЙ ЭКСТРАКЦИИ	
С.М. Петров, С.Л. Филатов, М.С. Михайличенко, Н.М. Подгорнова.....	13
ПИВНАЯ ДРОБИНА И ПРОДУКТЫ ДЛЯ ЖИТЕЛЕЙ КРАЙНЕГО СЕВЕРА	
А.М. Близкий.....	17
УСТОЙЧИВОЕ РАЗВИТИЕ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОГО САХАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА НА ОСНОВЕ КОНЦЕПЦИИ ЦИФРОВОГО ДВОЙНИКА	
С.М. Петров, С.Л. Филатов, М.С. Михайличенко.....	18
ВЛИЯНИЕ ОСАЖДАЮЩИХ АГЕНТОВ НА УВЕЛИЧЕНИЕ СЪЕМА СЕМЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ В ПИВОВАРЕНИИ	
С.Г. Давыденко, А.А. Шиленко, М.Н. Кунцова, А. Андреева.....	23
БИОХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ ЧЕЧЕВИЦЫ	
В.Е. Плотников, М.Г. Магомедов, И.В. Плотникова, И.М. Жаркова.....	24
ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОГЛОЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИМИНОДИУКСУСНЫМ ИОНИТОМ	
А.В. Астапов, О.И. Долматова*, С.С. Потемкин.....	25
БИОТЕХНОЛОГИЯ ТВОРОГА С УЛУЧШЕННЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ КАЧЕСТВА	
О.И. Долматова, А.В. Астапов*.....	26
ИЗУЧЕНИЕ МОРФО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СИЛИКАТНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА <i>PAENIBACILLUS</i>	
В.А. Полютова, С.П. Дампилов, А.Б. Балханова, С.В. Гомбоева.....	27
ПРОБЛЕМЫ ОБРАЗОВАНИЯ ОТХОДОВ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И СПОСОБЫ ИХ РЕШЕНИЯ	
О.В. Белашова, И.С. Горбушина, С.А. Першакова.....	28
ОПТИЧЕСКАЯ СЕНСОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ С ТЕТРАЦИКЛИНОМ	
О.А. Караваева, В.Д. Бунин, О.И. Гулий.....	30
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АМАРАНТА В КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ ПТИЦ	
С.В. Образцова, О.В. Бондарева, Т.В. Свиридова, О.С. Корнеева.....	31
ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ МЫШЦ ЯПОНСКИХ ПЕРЕПЕЛОВ (<i>COTURNIX JAPONICA</i>) ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ФИТАЗ ГРИБНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	
Е.П. Исакова, Н.Н. Гесслер, О.И. Кляйн, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева, Ю.И. Дерябина, А.В. Розумий.....	32
ДИАГНОСТИКА МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ВНЕСЕНИИ В ПОЧВУ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА	
Н.Е. Кравцова, Е.М. Вечканов, В.А. Пономаренко, М.Н. Мирнова.....	35
ВЛИЯНИЕ СОЛЕТОЛЕРАНТНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА ПАСТБИЩНЫЕ ТРАВЫ, РАСТУЩИХ НА ЗАСОЛЕННЫХ ПОЧВАХ	
И.Э. Смирнова, Г.Б. Баймаханова, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Я.У. Рахметова.....	38
НОВАЯ СТРАТЕГИЯ ПОИСКА БАКТЕРИЙ-ФИТОСТИМУЛЯТОРОВ В ПОЧВЕННЫХ КОНСОРЦИИАХ	
Е.В. Празднова, А.Ю. Гуляева, П.В. Мотько.....	42
<i>METHYLOBACTERIUM DICHLOROMETHANICUM</i> SUBSP. <i>DICHLOROMETHANICUM</i> DM4 КАК СТИМУЛЯТОР РОСТА РАСТЕНИЙ	
Н.В. Агафонова.....	43
ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОРБЕНТА ИЗ ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД В ЦЕЛЯХ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ	
О.Е. Хронюк, Т.В. Бауэр, В.Э. Болдырева.....	44
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ И ВИРУСОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОПЕСТИЦИДОВ	
С.А. Тимофеев, А.Г. Шухалова, И.В. Сендерский, В.В. Долгих.....	45
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ <i>ASPERGILLUS NIGER</i> В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ <i>PICHA PASTORIS</i>	
Е.А. Белаш, Д.Н. Щербаков.....	46
ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА	
О.И. Гулий, О.А. Караваева.....	47
РАЗРАБОТКА И ТЕСТИРОВАНИЕ НОВЫХ НАНОБИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛАЗОСОДЕРЖАЩИХ ФЕРМЕНТОВ И БИОСОВМЕСТИМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	
И.А. Любкевич, С.А. Смирнова, А.И. Зорин, В.П. Молчанов, А.М. Сульман.....	48

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ	
С.А. Лапа, А.С. Епифанов, А.В. Чудинов.....	49
ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА И ЛАКТАТА ЦИНКА НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ ТЕСТ-ШТАММА <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i>	
В.С. Макулова, И.А. Буторова, О.В. Романычева, И.А. Белова.....	51
ФОТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНОГО ПОЛИСАХАРИДА ХИТОЗАНА И СУКЦИНАТА ХИТОЗАНА ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ФИЗИЧЕСКОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ТРИПСИНА НА ИХ МАТРИЦЕ	
С.М. Панкова, М.Г. Холявка, В.А. Королева, М.С. Кондратьев, А.Н. Лукин, В.Г. Артюхов	53
ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К СА 15-3	
А.К. Могильных, М.А. Малыхина, Л.А. Усикова, О.С. Мокрушина, Е.Б. Шеметова, М.А. Сорокин, И.А. Вторушина, Е.Н. Алексеенко, В.А. Порываева, О.А. Агафонова, М.Ю. Рукавишников	54
ОТБОР ШТАММОВ <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ТЕЙХОВЫХ КИСЛОТ	
Н.Г. Сидоров	55
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МИКРОБНЫХ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ БЫСТРОЙ ОЦЕНКИ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА (БПК)	
А.С. Медведева	56
ОРМОСИЛ – ФЕРМЕНТНЫЙ МАТЕРИАЛ В КАЧЕСТВЕ МОДИФИКАТОРА ПОВЕРХНОСТИ БИОСЕНСОРА ДЛЯ АНАЛИЗА ГЛЮКОЗЫ В ОБЛАСТИ ХИМИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ	
Л.С. Кузнецова, В.А. Арляпов.....	57
БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ – ОСНОВА ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И МЕДИЦИНЫ	
В.В. Ревин, Е.В. Лияськина, М.В. Парчайкина, Н.Б. Назарова, А.В. Заварыкина.....	58
НЕЙРОТОКСИНЫ ИЗ ЯДА ОСЫ-НАЕЗДНИКА <i>HABROBRACON HEVETOR</i> И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В СОЗДАНИИ НОВЫХ БИОПЕСТИЦИДОВ	
А.Г. Шухалова, С.А. Тимофеев, И.В. Сендерский, В.В. Долгих,	59
СОСТАВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ МЕТАБОЛИТОВ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА <i>B. SUBTILIS</i> 3Н	
С.А. Лазарев, Н.А. Михайлова.....	63
ИССЛЕДОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕФЕНСИНА ТАБАКА NAD1 С КОНВЕНЦИОНАЛЬНЫМИ АНТИМИКОТИКАМИ И ЭНДОГЕННЫМИ АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ	
О.В. Шевченко, С.И. Фатеева, С.В. Баландин, Т.В. Овчинникова, Е.И. Финкина.....	64
БИОТЕХНОЛОГИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ	
О.В. Бондарева, Г.П. Шуваева, О.С. Корнеева	65

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

А.А. Дерканосова, И.С. Косенко, Г.Н. Егорова

Воронежский государственный университет инженерных технологий Воронеж, Россия

Современная пищевая промышленность переживает революцию благодаря активному внедрению биотехнологий. Эти инновации направлены на создание более устойчивых, здоровых и персонализированных продуктов питания, отвечающих потребностям современного общества и глобальным вызовам. Рассмотрим ключевые направления и тенденции, формирующие будущее пищевой биотехнологии.

1. Устойчивое и экологичное производство

Одной из главных задач современной пищевой промышленности является снижение экологического следа производства.

- **Сокращение ресурсов:** Биотехнологические методы позволяют уменьшить потребление воды, энергии и сырья. Это достигается за счёт оптимизации производственных процессов и использования микроорганизмов для эффективного преобразования сырья.
- **Переработка отходов:** Биотехнологии играют ключевую роль в переработке пищевых отходов. Они превращаются в ценные продукты, такие как биоразлагаемые упаковочные материалы, биотопливо или кормовые добавки.
- **Биоразлагаемые и съедобные упаковочные материалы:** Разработка упаковки из биополимеров и других биоматериалов снижает загрязнение окружающей среды. Съедобная упаковка, потребляемая вместе с продуктом, сокращает объём отходов и упрощает утилизацию.

2. Альтернативные источники белка

В связи с ростом населения и повышением спроса на белок, биотехнологии предлагают новые решения для обеспечения продовольственной безопасности.

- **Растительные белки:** Создание продуктов на основе гороха, сои, горчицы и других растительных источников позволяет предлагать заменители мяса, рыбы и молочных продуктов без ущерба для вкуса и питательности.
- **Культуральное мясо:** Выращивание мяса из стволовых клеток животных в лабораторных условиях исключает необходимость традиционного животноводства, снижая нагрузку на экологию и этические вопросы.
- **Ферментационные белки:** Использование дрожжей и бактерий для синтеза белков через ферментацию обеспечивает производство высококачественных белковых ингредиентов с минимальным воздействием на окружающую среду.

3. Генетическое редактирование и синтетическая биология

Прогресс в области генетики открывает новые возможности для улучшения сельскохозяйственных культур и пищевых ингредиентов.

- **Технологии CRISPR:** Генетическое редактирование позволяет создавать растения с повышенной урожайностью, устойчивостью к болезням и стрессовым климатическим условиям.
- **Прецизионная ферментация:** С помощью генно-модифицированных микроорганизмов синтезируются специфические ферменты, витамины и ароматизаторы, улучшая качество и функциональность продуктов питания.
- **Разработка новых биосинтетических путей:** Синтетическая биология позволяет создавать ингредиенты с улучшенными характеристиками, такими как повышенная стабильность или биодоступность.

4. Персонализированное питание и микробиом

Индивидуальный подход к питанию становится всё более актуальным благодаря пониманию генетических и микробиомных особенностей каждого человека.

- **Генетический анализ:** Использование генетической информации позволяет разрабатывать продукты, отвечающие конкретным потребностям организма, улучшая здоровье и профилактику заболеваний.

- Микробиом кишечника: Изучение роли микробиома в общем здоровье ведёт к созданию продуктов, способствующих его оптимизации. Персонализированные пробиотики и пребиотики разрабатываются на основе индивидуального микробиома человека.

- Функциональные продукты: Обогащение продуктов пробиотиками, пребиотиками и другими биоактивными веществами поддерживает здоровье кишечника и иммунной системы.

5. Функциональные продукты и нутрицевтики

Потребители всё больше интересуются продуктами, которые не только насыщают, но и приносят пользу здоровью.

- Обогащённые продукты: создаются продукты, насыщенные витаминами, минералами, антиоксидантами и другими полезными веществами для улучшения здоровья и профилактики заболеваний.

- Целевые эффекты: разрабатываются продукты, способствующие улучшению когнитивных функций, укреплению иммунитета и поддержанию общего благополучия.

6. Повышение безопасности и качества продуктов питания

Обеспечение безопасности пищевых продуктов остаётся приоритетом для отрасли.

- Биосенсоры и биомаркерные технологии: Инновационные методы позволяют быстро обнаруживать патогены, токсины и другие загрязнители в продуктах питания, предотвращая распространение заболеваний.

- Биологически активные упаковки: Упаковочные материалы, способные предотвращать рост микроорганизмов, продлевают срок годности продуктов и повышают их безопасность.

7. Интеграция цифровых технологий

Современные цифровые решения усиливают эффективность и прозрачность биотехнологических процессов.

- Искусственный интеллект и машинное обучение: Эти технологии используются для оптимизации процессов производства, прогнозирования спроса и улучшения цепочек поставок.

- Блокчейн: Технологии распределённых реестров обеспечивают прозрачность и прослеживаемость происхождения ингредиентов и продуктов питания, повышая доверие потребителей.

Биотехнологии в пищевой промышленности предлагают революционные решения для глобальных вызовов, связанных с питанием растущего населения, устойчивым использованием ресурсов и улучшением здоровья общества. Интеграция биотехнологических инноваций с цифровыми технологиями и глубоким пониманием потребностей человека меняет наше отношение к пище, делая её более питательной, доступной и экологически ответственной. Будущее пищевой промышленности лежит в продолжении этого прогресса, направленного на благополучие как людей, так и планеты в целом.

Литература

1 Касьянов Г.И. Техника и технология использования диоксида углерода в суб – и сверхкритическом состоянии. Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2014; (1) : 130–135. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2014-1-130-135>

2 Коновалов С.А., Гаврилова Н.Б., Полянский К.К., Щетинин М.П., Чернопольская Н.Л. Современная биотехнология производства молочного десерта с функциональными ингредиентами. Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2024; 86(1) : 70–83. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2024-1-70-83>

3 Рождественская Л.Н., Бычкова Е.С., Бычков А.Л. Анализ вызовов и современных тенденций развития технологий на рынке белков // Пищевая промышленность. – 2018. – №. 5. – С. 42–47.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ В КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ

А.А. Дерканосова, А.В. Дранников, Г.Н. Егорова

Воронежский государственный университет инженерных технологий Воронеж, Россия

Биотехнология играет все более значимую роль в кормопроизводстве, способствуя повышению эффективности, устойчивости и питательной ценности кормов для животных. Вот некоторые из актуальных тенденций в этой области:

Использование ферментов в кормах. Добавление ферментов, таких как фитазы, целлюлазы и протеазы, улучшает усвояемость питательных веществ, снижает количество непереваренных компонентов и уменьшает экологическое воздействие за счет сокращения выделения азота и фосфора.

Пробиотики и пребиотики. Внедрение полезных микроорганизмов и веществ, стимулирующих их рост, способствует улучшению микрофлоры кишечника животных, повышает иммунитет и общую продуктивность.

Генетически модифицированные культуры. Использование ГМ-культур с повышенным содержанием питательных веществ или устойчивостью к вредителям и болезням позволяет снизить затраты на производство кормов и повысить их качество.

Альтернативные источники белка. В связи с ростом населения и потребности в белке, активно исследуются и внедряются новые источники, такие как насекомые (например, мучные черви, сверчки), водоросли и одноклеточные белки, полученные из микроорганизмов.

Ферментационные технологии. Биотехнологические методы ферментации используются для производства высококачественных кормовых добавок, таких как аминокислоты, витамины и органические кислоты.

Редактирование генома. Технологии CRISPR-Cas и другие методы позволяют создавать культуры с улучшенными характеристиками, такими как повышенная усвояемость или сниженное содержание анти-питательных факторов.

Умные кормовые добавки. Разработка добавок с контролируемым высвобождением активных веществ для оптимизации питания в соответствии с физиологическими потребностями животных.

Устойчивое производство кормов. Биотехнологические методы направлены на снижение экологического следа кормопроизводства, включая использование отходов агропромышленности и возобновляемых ресурсов.

Биоконсерванты. Использование натуральных антимикробных агентов, полученных биотехнологическим путем, для продления срока хранения кормов и предотвращения развития патогенных микроорганизмов.

Персонализированное кормление. Применение биоинформатики и нутригеномики для разработки индивидуальных кормовых рационов на основе генетических и физиологических особенностей животных.

Эти тенденции отражают стремление отрасли к повышению эффективности, безопасности и экологической устойчивости кормопроизводства с помощью передовых биотехнологических решений.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS*

А.И. Петрухина, В.А. Олейникова, А.С. Козликина, О.В. Зверева, Е.А. Мотина

Воронежский государственный университет инженерных технологий Воронеж, Россия

В последнее десятилетие активно развивается поддержка здоровья микробиоты желудочно-кишечного тракта. Известно, что микробиота ЖКТ состоит из 500 видов бактерий, которые активно участвуют в метаболических путях организма. По литературным данным также известно, что многие штаммы молочнокислых бактерий обладают антимикробными активностями в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [1]. Исследования ученых доказали, что регулярное применение пробиотиков может значительно снизить риск развития инфекционных заболеваний, особенно в детском возрасте. Также отмечается, что пробиотики могут уменьшать проявления аллергических реакций, что делает их полезными для людей, склонных к аллергиям и бронхиальной астме [2].

В связи с вышеизложенным актуальным на сегодняшний день является поиск новых микроорганизмов и изучение их пробиотических свойств, что позволит расширить линейку отечественных пробиотических препаратов доказанного действия.

Ключевыми параметрами при подборе и изучение микроорганизмов является изучение их пробиотической активности. А именно проявление толерантности к концентрации соли, желчи, фенолу, желудочному соку (низким или высоким значениям pH среды), а также антагонистическая способность. Данные параметры являются ключевыми и связаны с тем, что почти основная часть пробиотических штаммов по мере прохождения через желудочно-кишечный тракт теряет активность.

В ходе анализа изученного состава микробиоты человека и линейки БАВ на отечественном рынке было установлено, что наиболее распространенными являются такие бактерии, как *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* [1].

Таким образом целью нашего исследования было изучение пробиотических свойств штамма молочнокислых бактерий *Lactobacillus paracasei*, выделенных из слюны человека.

В ходе эксперимента было проведено изучение пробиотической активности штамма по трем главным параметрам: устойчивость к pH, желчным кислотам и антагонистическая активность.

Установлено, что бактерии *Lactobacillus paracasei* проявляют устойчивость при культивировании на питательных средах с желчью при концентрации 10 и 20 %, так в контроле концентрация клеток составила $4,7 \times 10^{13}$, а в среде с желчью 10 и 20 – $3,26 \times 10^{13}$ и $1,8 \times 10^{13}$ соответственно. При увеличении концентрации желчи в среде до 30 % количество жизнеспособных клеток уменьшилось в 100 раз ($1,5 \times 10^{11}$) относительно контроля. При изучении жизнеспособности клеток молочнокислых бактерий в условиях разных pH среды было установлено, что при бактерии обладают устойчивостью к кислой среде при pH среды 2,0 количество жизнеспособных клеток *Lactobacillus paracasei* составляет $2,3 \times 10^7$, что в миллион раз ниже относительно контроля, но также не оказывает ингибирующего действия на бактерии. При изучении антагонистической активности, установили, что бактерии рода *Lactobacillus paracasei* подавляют рост условно-патогенных микроорганизмов *Escherichia coli* top 10 (33P 2,2 мм), однако, относительно бактерий *Escherichia coli* 1, выделенных из нормофлоры кишечника, не оказывают ингибирующего действия.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что бактерии *Lactobacillus paracasei*, выделенные из слюны человека, являются перспективными пробиотическими микроорганизмами, которые обладают пробиотической активностью и оказывают антимикробное действие.

Литература

1. Анализ устойчивости и антагонистической активности пробиотических микроорганизмов, выделенных из молока и молозива коров / М.Ю. Сыромятников, С.В. Шабунин, А.С. Козликина [и др.] // Ветеринарный фармакологический вестник. – 2024. – № 1(26). – С. 109–120. – DOI 10.17238/issn2541-8203.2024.1.109.
2. Молохова, Е.И. Пробиотики на российском фармацевтическом рынке / Е.И. Молохова, В.Н. Тарасевич, Д.Е. Липин // Фармация. – 2022. – Т. 71, № 7. – С. 11–17. – DOI 10.29296/25419218-2022-07-02.

КЕФИРНЫЙ ПРОДУКТ С КОНЦЕНТРАТОМ МИЦЕЛЛЯРНОГО КАЗЕИНА

Е.И. Мельникова, Е.В. Богданова, Ю.П. Кулумбегова, Я.А. Дорохова

Воронежский государственный университет инженерных технологий Воронеж, Россия

Обогащенные кисломолочные напитки представляют собой сегмент, в котором ожидается быстрорастущий спрос на мицеллярный казеин [1]. Наиболее полезным среди таких напитков является кефир. Инновации во вкусовых характеристиках и универсальных формах таких продуктов повышают привлекательность рынка для более широкой потребительской базы, а интерес производителей к чистым этикеткам и натуральным ингредиентам подталкивает сосредоточиться на минимальной обработке сырья и поставках с экологически чистых молочных ферм.

В этой связи было предложено применение концентрата мицеллярного казеина (КМК) в технологии кефира. Экспериментальные исследования проводили на базе кафедры технологии продуктов питания животного происхождения ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий и Центра прикладных исследований ПАО МК «Воронежский». В качестве основного компонента нормализованной смеси применяли концентрат мицеллярного казеина, физико-химические показатели которого приведены в таблице.

Таблица – Характеристика сырья для производства кефира

Показатель	Обезжиренное молоко	КМК
Массовая доля сухих веществ, %	9,92	13,41
Массовая доля жира, %	0,08	<0,02
Массовая доля общего белка, %, в т. ч.:	3,55	9,38
сывороточных белков	0,69	0,78
казеина	2,67	8,62
Соотношение казеин: сывороточные белки	75:25	92:8
Титруемая кислотность, °Т	16	23

Пастеризованное обезжиренное молоко подвергали микрофильтрации с применением полупроницаемых полимерных мембран с диаметром пор 0,1 мкм при $t = 10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давлении 0,2–0,3 МПа до массовой доли сухих веществ в концентрате 12–16 %; далее проводили последовательно две ступени диафильтрации полученного концентрата двойным объемом обратноосмотической воды по отношению к объему концентрата на каждой ступени диафильтрации при режимах работы мембранной установки, аналогичных процессу микрофильтрации, до получения концентрата объемом, равным объему первоначально отправленного на диафильтрацию концентрата. Полученный концентрат подвергали пастеризации при $t = 85 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ с выдержкой 5–10 мин, охлаждали до $t = 20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$; вносили производственную закваску, приготовленную на кефирных грибках, в количестве 3–5 % от массы заквашиваемой смеси перемешивали 15–20 мин, сквашивали при $t = 20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ до титруемой кислотности 85–100 °Т; перемешивали и охлаждали до $t = 14 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3–6 ч, далее подвергали созреванию при $t = 8\text{--}10\text{ }^{\circ}\text{C}$ не менее 12 ч.

Применение концентрата мицеллярного казеина в качестве сырья для производства кефира позволяет получить продукт с высокой биологической ценностью и содержанием незаменимых аминокислот, а также низкими массовыми долями жира, лактозы для диетического, спортивного и специализированного питания; интенсифицировать процесс производства кефира за счет применения мембранных технологий и получения сырья с заданными физико-химическими характеристиками.

Литература

1. Ионова, И.И. Перспективные ресурсосберегающие технологии минорных белковых компонентов из молочной сыворотки / И.И. Ионова, А.О. Юрасов, Н.А. Тихомирова // Переработка молока. – 2022. – № 7 (273). – С. 32–34.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ФЕРМЕНТИРОВАННОГО ИВАН-ЧАЯ

М.Я. Комаров, Ф.П. Балдынова

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

В последние годы в России огромной популярностью пользуются чай из дикорастущих видов растительного сырья. Одним из таких видов растительного сырья является иван-чай. Иван-чай, или кипрей узколистный, (лат. *Chamerionangustifolium* или *Epilobium angustifolium*) – многолетнее травянистое растение рода кипрейных (*Onagraceae*), достигает 150–160 см в высоту и произрастает практически на всей территории современной России [1].

Литературные источники свидетельствуют о высоком содержании биологически активных веществ в иван-чае, проявляющих антиоксидантную, антибактериальную, противоопухолевую и противовоспалительную активность. Исследования свойств иван-чая проводились еще в дореволюционное время П.А. Бадмаевым. П.А. Бадмаев известен, как знаток лекарственных трав и тибетской медицины.

В настоящее время проводятся многочисленные исследования по изучению химического состава и лечебных свойств иван-чая [2]. Изучаются полезные свойства готового напитка, способы его выращивания и воспроизводства, технологии заготовки, ферментирования, режимы сушки, способы сохранения биологической ценности.

Производителями этого напитка предпринимаются попытки возрождения производства иван-чая в промышленных масштабах.

Цель настоящей работы – исследование химического состава ферментированного иван-чая Байкальского региона.

Объектом исследования являлся иван-чай узколистный. Сбор объекта исследования проводился в экологически чистом Байкальском регионе.

Образцы были собраны в разный вегетативный период 2023 года. Весна и лето 2023 года были поздними, и сбор образцов проводили 15 июня, 30 июня и 13 июля.

На исследование были представлены образцы ферментированного цельного скрученного на агрегате для скручивания листа DL-6CRT-45 и гранулированного листа иван-чая, смолотого на мясорубке МИМ-300М-01.

Результаты исследований приведены в таблицах 1, 2 и 3.

Таблица 1.

Содержание органических кислот (г/кг от сухой массы) в сухих и ферментированных листьях, цветах иван-чая в разный вегетативный период произрастания (метод капиллярного электрофореза)

Показатель	Сухие листья (15.06.23)	Сухие листья (30.06.23)	Сухие листья (13.07.23)	Ферментированные гранулированные листья (13.07.23)	Ферментированные не гранулированные листья (13.07.2023)	Цветы (13.07.2023)
Щавелевая	0,112	0,146	0,160	0,117	0,128	0,188
Муравьиная	–	–	–	–	0,084	–
Фумаровая	0,003	0,002	0,003	0,011	0,012	0,006
Янтарная	–	–	–	0,188	0,574	0,068
Яблочная	1,977	1,157	1,720	2,415	0,908	1,184
Лимонная	0,867	0,288	0,240	0,731	0,7185	0,743
Уксусная	–	–	–	0,092	–	0,052
Пропионовая	–	–	–	–	–	–
Бензойная	0,020	0,008	0,0045	0,057	0,035	0,0115
Сорбиновая	0,828	0,088	0,029	0,260	0,431	0,087

Анализ полученных данных показал, что органические кислоты: щавелевая, фумаровая, яблочная, лимонная, бензойная, сорбиновая присутствуют как в ферментированных, так и в сухих листьях иван-чая и его соцветиях. Янтарная и уксусные кислоты присутствуют в цветах иван-чая и в ферментированных листьях иван-чая. Муравьиная кислота была обнаружена в ферментированных гранулированных листьях иван-чая.

В таблице 2 представлены данные содержания макроэлементов в сухих и ферментированных листьях иван-чая. Полученные данные показывают, что содержание макроэлементов больше в ферментированных листьях иван-чая и в цветах, чем в сухих листьях.

Таблица 2.

Содержание макроэлементов (г/кг от сухой массы) в сухих и ферментированных листьях, цветах иван-чая в разный вегетативный период произрастания

Компонент	Сухие листья (15.06.23)	Сухие листья (30.06.23)	Сухие листья (13.07.23)	Ферментированные гранулированные листья (13.07.23)	Ферментированные не гранулированные листья (13.07.2023)	Цветы (13.07.2023)
K	132	117	94,6	172	148	154
Na	3,04	2,66	2,10	3,11	2,74	2,79
Li	0,536	0,386	0,220	0,683	0,345	0,526
Mg	22,6	14,7	9,97	20,6	17,9	14,1
Ca	26,8	18,4	14,1	27,2	31,3	15,5

В наших исследованиях по витаминам группы В мы обратили внимание на фолиевую кислоту. Содержание витаминов группы В в сухих и ферментированных листьях и цветах иван-чая представлено в таблице 3. Анализ результатов показывает, что в образцах до цветения (13.06.2023) содержание фолиевой кислоты в листьях иван-чая составляет всего 0,556 г/кг сухой массы, тогда как в образцах в период цветения (30.06.2023) фолиевой кислоты накапливалось до 1,310 г/кг сухой массы. В образцах от 13.07.2023 содержание фолиевой кислоты увеличилось до 1,375 г/кг сухой массы. В ферментированных листьях иван-чая фолиевая кислота отсутствует.

Таблица 3.

Содержание витаминов группы «В» (г/кг от сухой массы) в сухих и ферментированных листьях, цветах иван-чая в разный вегетативный период произрастания (метод капиллярного электрофореза)

Витамин	Сухие листья (15.06.23)	Сухие листья (30.06.23)	Сухие листья (13.07.23)	Ферментированные гранулированные листья (13.07.23)	Ферментированные не гранулированные листья (13.07.2023)	Цветы (13.07.2023)
B ₂	0,00706742	0,006305578	0,00651909	0,011744561	0,009559418	0,07597
B ₆	0,18095044	0,278900556	0,10032493	0,093875907	0,041430881	0,05105
B ₅	0,18582455	0,315278901	0,22136474	0,00247784	0,019927243	0,02107
B _c	0,55645816	1,309622004	1,37489845	0	0	0,00948

Таким образом, установлено присутствие янтарной, уксусной и муравьиной кислот в ферментированных листьях иван-чая. Определено содержание макроэлементов в сухих листьях и ферментированных листьях иван-чая. Установлено, что содержание фолиевой кислоты в листьях иван-чая в вегетативный период увеличивается и активнее происходит ферментация листьев иван-чая.

Литература

1. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений: учеб. Пособие/ Под.ред. Г.П. Яковлева. 3-е изд. СПб.: СпецЛит, 2015. 759 с.
2. Корсун В.Ф., Корсун Е.В. Русский чай по имени Иван. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Концептуал, 2017. 224 с.
3. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 3. Общие методы анализа/МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – Москва: Медицина, 1987 г. – 336 стр., ил.

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПЕКТИНА ИЗ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ И МИКРОВОЛНОВОЙ ЭКСТРАКЦИИ

С.М. Петров¹, С.Л. Филатов², М.С. Михайличенко², Н.М. Подгорнова²

¹ Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия

² ООО НТ-Пром, Москва, Россия

Пектин состоит из 300–1000 сахаридных звеньев, большая часть которых представляет собой полимеры D-галактуроновой кислоты. Промышленный пектин обычно используется в качестве технологического адьюванта в косметической, пластмассовой и фармацевтической промышленности, в медицине при лечении рака, в сельском хозяйстве, в качестве абсорбента в текстильной промышленности или в качестве желеобразующего, стабилизирующего компонента или загустителя в пищевой промышленности. Он содержится в основном в яблочных выжимках и кожуре цитрусовых, экстрагированных при низком pH и высокой температуре. Однако в последние годы для получения пектина использовались другие агротехнические отходы, такие как жом сахарной свеклы (SBP, sugar beet pulp), кожура плодов дракона, или подсолнечник [3].

Свекловичный жом является одним из наиболее распространенных отходов, производимых в России. В 2023 году российскими свеклосахарными заводами было получено 8,8 млн т жома, а в Европе производится SBP около 20 млн т в год, и его наиболее распространенное использование отмечается в кормлении сельскохозяйственных животных. Согласно литературным данным SBP имеет в составе компонентов 20–25 % целлюлозы, 20–30 % гемицеллюлозы, 15–25 % пектина и 10–15 % белка. Благодаря этому составу валоризация SBP для получения таких высокоценных продуктов, как пектин и олигосахариды, может быть актуальной в рамках экономики замкнутого цикла [4].

Наиболее распространенной технологией извлечения пектина из агроотходов является традиционная экстракция при низком pH и высоких температурах в течение длительного времени, повышающая селективность и выход экстракции. Однако эти жесткие условия традиционной технологии могут привести к деградации ценных соединений. Таким образом, создаются предпосылки в необходимости разработки новых методов улучшения экстракции пектина с учетом принципов массопереноса при гидролизе, солубилизации и др. Некоторые из этих новых технологий включают экстракцию с помощью ферментов, экстракцию с помощью микроволнового излучения, субкритическую водную экстракцию или экстракцию с помощью ультразвука [1–3].

Ультразвуковая экстракция (UAE, Ultrasound-assisted extraction) в основном характеризуется выбором частоты и амплитуды длины волны для проведения процесса. UAE улучшает выход экстракции пектина за счет увеличения разрыва клеток биомассы и процесса, известного как кавитация двухэтапного цикла: сначала расширение, при котором образуются и расширяются пузырьки, и затем сжатие, при котором пузырьки разрушаются из-за падения давления. Этот тип экстракции имеет некоторые преимущества по сравнению с традиционным методом, такие как повышение эффективности экстракции при сокращении времени процесса и потреблении меньшего количества энергии и воды. Однако UAE может приводить к снижению однородности пектина из-за применения ультразвуковых волн, что затрудняет воспроизводимость результатов метода.

Также предложено использовать поверхностно-активные вещества в сочетании с UAE для улучшения выхода и воспроизводимости экстракции. Использование поверхностно-активных веществ при экстракции органических соединений является новой технологией, которая появилась недавно. Поверхностно-активные вещества представляют собой амфифильные молекулы с гидрофильной головкой и гидрофобным хвостом. Когда концентрация поверхностно-активного вещества превышает критическую концентрацию мицеллообразования, образуются мицеллы. Эти мицеллы склонны устанавливать химические и физические взаимодействия с гидрофильными и липофильными соединениями, присутствующими в жидкости. Например, органические соединения, такие как пектин, остаются внутри мицеллы в липофильной зоне. Этот тип экстракции может быть пригоден для улучшения процесса получения пектина, не вызывая при этом деградации соединения.

После завершения экстракции необходим этап восстановления пектина. Некоторые исследования показали, что осаждение спиртом является эффективным методом извлечения пектина из жидких экстрактов. Однако осаждение является неселективным методом. Не только пектин осаждается, но и другие соединения, такие как мономерные и олигомерные сахара, снижая тем самым чистоту осажденного пектина.

Пектин, экстрагируемый UAE, характеризуется относительно высокой молекулярной массой (M_w) (> 50 кДа). Следовательно, одним из способов концентрирования и очистки полученного жидкого экстракта является использование мембран ультрафильтрации / диафильтрации (UF/DF), которые могут отделять пектин от соединений с низкой молекулярной массой M_w , которые не представляют интереса. Таким образом, ожидается, что осажденный пектин, полученный после процесса мембранной очистки, будет иметь более высокую степень чистоты. При этом количество этанола, необходимое для последующего осаждения пектина, значительно снижается. В некоторых исследованиях сообщалось о различных способах очистки экстрактивных жидкостей. Например, предложено сначала проводить ультрафильтрацию (UF) для концентрирования экстракта, а затем диафильтрацию (DF) для очистки фракций гемицеллюлозы, полученных гидротермальной обработкой отбракованной моркови. Однако другое предложение заключается в том, чтобы начать с процесса DF, а затем провести этап UF для извлечения гемицеллюлозы и лигнина из термомеханической целлюлозы [2].

На основании обзора литературы установлено, что ни одно исследование не анализирует влияние поверхностно-активных веществ на UAE для извлечения пектина из сельскохозяйственных отходов, таких как SBP. Кроме того, ни одно из них не включает использование мембран UF/DF для разделения и очистки жидкостей, богатых пектином. Основными целями комбинированного подхода являются:

оптимизация извлечения пектина на основе технологии UAE с использованием различных синтетических (Tween80, PEG4000) и натуральных (Saponin) поверхностно-активных веществ. Для этой цели использовался факторный план при выборе наилучших условий (концентрация поверхностно-активного вещества, pH, амплитуда и время);

изучение последовательности концентрирования и очистки пектина на основе использования мембран DF/UF для получения жидкости, богатой пектином, с M_w и чистотой, соответствующей потенциальному коммерческому использованию.

Большое значение для химической промышленности имеет развитие экологически чистых и энергосберегающих технологий переработки побочных продуктов агропродовольственного производства с целью получения продукции с высокой добавленной стоимостью. Разработки, подобные рассматриваемым в этой работе (обогащенный пектинами продукт от SBP), в значительной степени способствуют прогрессу в достижении целей устойчивого развития: обеспечение устойчивых моделей потребления и производства (SDG 12, Responsible consumption and production – Ответственное потребление и производство), а также доступной и чистой энергии (SDG 7, Sustainable Development Goal – Цель устойчивого развития).

Опыты были проведены со свекловичным жомом, промытым, высушенным в печи при температуре 70°C и измельченным до размера частиц $d_p < 1$ мм.

Экстракцию осуществляли на ультразвуковом оборудовании с прямой сонификацией (20 кГц) в установленных экспериментальных условиях. Для UAE стандартный метод был следующим: экстракция S:L (solid / liquid – твердое вещество–жидкость) проводилась с использованием герметичного реактора из нержавеющей стали, в котором смешивали необходимое количество свекловичного жома и 150 мл растворителя (рис. 1). После экстракции смесь центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g. Далее осуществлялась фильтрация для тщательного извлечения супернатантов (supernatant – часть отцентрифугированного раствора, который не может быть осажден при данных условиях (скорости) центрифугирования и остается над осадком). Затем супернатанты хранили при 4°C до дальнейшего извлечения и анализа продукта.

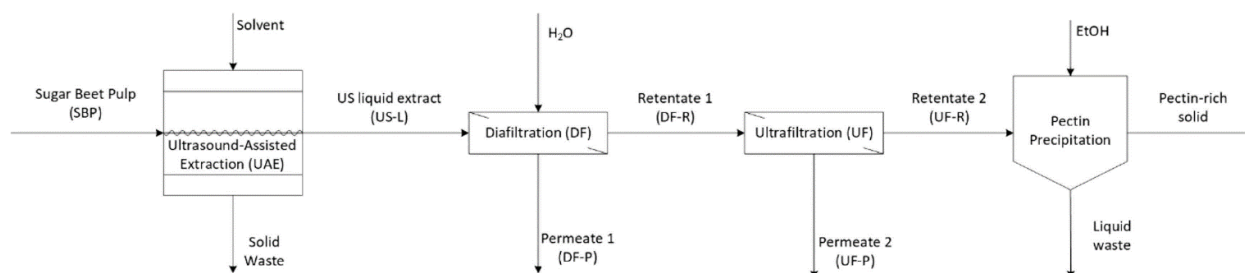


Рис. 1. Предлагаемый интегрированный процесс извлечения пектина из жома сахарной свеклы [2]

Были определены шесть критических факторов и их рабочие диапазоны: соотношение S:L (1:5–1:40), pH (1–5), время экстракции (30–180 мин) и температура (30–85 °C), амплитуда (50–100 % от максимальной амплитуды волновода 170 мкм), а также использование или отсутствие поверхностно-активных веществ.

В конфигурации DF/UF (рис. 1) сначала был выполнен непрерывный процесс диафильтрации (DF) для очистки экстрагированной жидкости, предоставленной UAE (US-L) с использованием дистиллированной воды. Затем ретентат 1, полученный с помощью DF (DF-R), был подвергнут процессу ультрафильтрации (UF) для его концентрирования и получения жидкости (ретентат 2), обогащенной галактуроновой кислотой (UF-R). В этом случае ручной регулирующий клапан на стороне ретентата поддерживал трансмембранное давление (TMP) в диапазоне 1,5–2,0 бар. Диапазон скорости потока подачи составлял 0,8–1,0 мл/мин/см². Примерно через час работы процедура была завершена, когда объем подачи был снижен на 50 % (об./об.). Мембраны UF/DF проходили этап очистки и промывки после каждого эксперимента.

Использование поверхностно-активных веществ увеличивает концентрацию галактуроновой кислоты (GalA) в экстрагированной жидкости по сравнению с контрольными прогонами. Поверхностно-активные вещества создавали от 1,1 до 3,3 раз более высокую степень извлечения GalA, чем вода (контроль) для каждого рабочего состояния, изученного в экспериментальных опытах. В этом случае Tween80 и Saponin являются поверхностно-активными веществами с лучшими результатами, обеспечивая от 5,5 до 5,9 г/л галактуроновой кислоты (GalA) в самых экстремальных условиях. Эти результаты могут быть обусловлены структурой каждого поверхностно-активного вещества и балансом между гидрофобными и гидрофильными силами. Такая структура может образовывать мицеллы для защиты GalA и побочных продуктов от деградации UAE, увеличивая конечную концентрацию.

Интегрированный процесс экстракции ультразвуком с использованием поверхностно-активных веществ с последующей диафильтрацией и ультрафильтрацией подходит для выделения и очистки пектина из свекловичного жома (SBP). Выход пектина в результате этого интегрированного процесса составил 24,6 %, а тип полученного продукта был высокометоксильным пектином с высокой молекулярной массой 930 кДа, что указывает на хорошие желирующие свойства для потенциального его применения. Данный подход представляет собой значительный прогресс в исследованиях по улучшению промышленного производства пектина из жома сахарной свеклы, представляющего коммерческий интерес. Однако необходимы дальнейшие исследования для оптимизации интегрированного процесса UAE/мембран и определения функциональных свойств конечного продукта, обогащенного пектином.

Растущий исследовательский интерес вызывает также интеграция ультразвуковой и микроволновой экстракции (UMAЕ) для объединения их преимуществ в комбинированном методе (рис. 2). Этот гибридный подход может ускорить экстракцию и минимизировать потребление энергии, что приводит к более высокому выходу пектина и улучшению качества. Основываясь на их механизме экстракции, последовательное использование UAE и MAЕ может сократить время и температуру операции MAЕ, тем самым минимизируя деградацию пектина RG-I (rhamnogalacturonan-I) и потребление энергии. Следовательно, сочетание этих новых технологий предлагает перспективный путь развития для эффективного и устойчивого производства пектина рамногалактуронан-I из жома сахарной свеклы.

RG-I имеет разветвленную структуру, состоящую из основной цепи чередующихся единиц галактуроновой кислоты (GalA) и рамнозы с различными боковыми цепями арабинозы и галактозы. RG-I особенно интересен своим потенциальным применением в пищевых и фармацевтических продуктах.

Как было указано выше, пектин – это не однородное вещество, а сложная смесь различных структурных элементов, таких как гомогалактуронан (HG), рамногалактуронан-I (RG-I) и рамногалактуронан-II (RG-II). Из них RG-I может модулировать реологические свойства пектиновых гелей, повышать стабильность эмульсий и проявлять биологическую активность, такую как противовоспалительное, противораковое и иммуномодулирующее действие. Поэтому извлечение пектина из растительных источников и оптимизация методов экстракции для сохранения структуры RG-I являются важными темами исследований, которые могут привести к разработке новых и функциональных продуктов на его основе, таких как пектоолигосахариды (POS). POS известны своими потенциальными пребиотическими свойствами, способностью регулировать микробиоту кишечника человека.

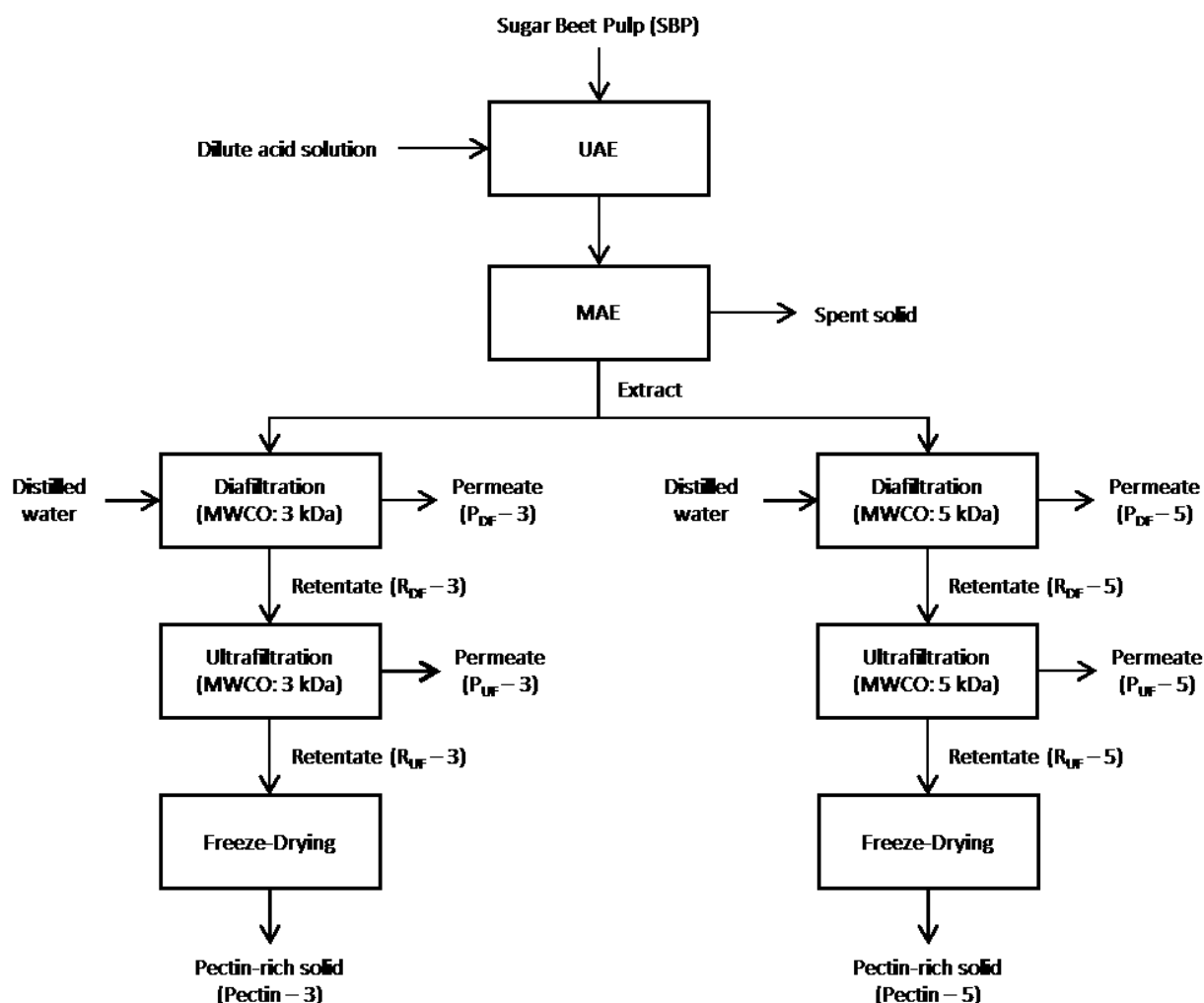


Рис. 2. Схема последовательной экстракции пектина с помощью ультразвука (UAE) и микроволнового излучения (MAE) с последующей мембранной очисткой непрерывной диафильтрацией и концентрированием ультрафильтрацией: MWCO - пороговые значения молекулярной массы [1]

Извлечение RG-I является сложной задачей, поскольку традиционная экстракция пектина HG с использованием кислых горячих растворов (pH 1,5–3, 60–100 °C) в течение нескольких часов неэффективна. В этих условиях боковые цепи разрушаются. Более того, экстракция требует большого количества растворителя и высокого потребления энергии и воды. Новые технологии, такие как ультразвуковая и микроволновая экстракция, привлекли внимание исследователей для устранения ограничений традиционной экстракции [1].

Так как ультразвуковая экстракция (UAE) – это нетермический метод экстракции, использует высокочастотные звуковые волны для создания кавитационных пузырьков, которые разрушают растительные ткани, то при этом растворитель может легко проникать в клетки и способствовать высвобождению пектина. Известно исследование использования UAE для извлечения пектина из отработанной кожуры грейпфрута с применением HCl (pH 1,5) в качестве растворителя и получением выхода 23,49 % с содержанием RG-I на уровне 38,31 %.

Микроволновая экстракция (MAE, microwave-assisted extraction) – метод термической экстракции использует электромагнитные волны для быстрого нагрева образца, способствуя разрушению клеточных стенок и высвобождению пектина. Некоторые преимущества MAE по сравнению с обычным нагревом заключаются в однородном рассеивании энергии и быстром нагреве. MAE изучалась для экстракции пектина из жома сахарной свеклы в щелочных условиях (pH 13) при 90 °C в течение 120 минут, достигая выхода 23,4 %, богатого сахарами (60,09 %).

Применительно к комбинированному методу экстракции пектина RG-I из свекловичного жома SBP получены следующие оптимальные условия реализации последовательного UMAE (pH 4, 10 мин UAE, 157 °C MAE). Этап UAE сокращает время и температуру, необходимые для MAE, что приводит к более высокому извлечению POS (66,0 %), превосходя предыдущие исследования. Непрерывный DF снижает вязкость экстракта и повышает выход с более высокими MWCO мембранами. Этот подход к очистке дает высокоочищенный POS, при этом мембрана MWCO 3 кДа обеспечивает самую высокую концентрацию POS и несколько улучшенный общий выход. Эти очищенные пектины RG-I подходят для различных применений благодаря высокому содержанию метоксильных групп, молекулярной массе и чистоте.

Литература

1. del Amo-Mateos E. et al. Recovering rhamnogalacturonan-I pectin from sugar beet pulp using a sequential ultrasound and microwave-assisted extraction: Study on extraction optimization and membrane purification // *Bioresource Technology*. – 2024. – Т. 394. – С. 130263.
2. Fernández-Delgado M. et al. Enhancement of industrial pectin production from sugar beet pulp by the integration of surfactants in ultrasound-assisted extraction followed by diafiltration / ultrafiltration // *Industrial Crops and Products*. – 2023. – Т. 194. – С. 116304.
3. Грабишин А.С. О некоторых особенностях технологий производства пектина // *Новые технологии*. 2010. № 2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/o-nekotoryh-osobennostyah-tehnologiy-proizvodstva-pektina> (дата обращения: 14.07.2024).
4. Справочный документ по измерению и мониторингу круговой экономики и использованию данных для разработки политики. – Европейская экономическая комиссия ООН, Женева. – 2021. – 37 с.

УДК 502.174.1 + 663.48

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-1-17>

ПИВНАЯ ДРОБИНА И ПРОДУКТЫ ДЛЯ ЖИТЕЛЕЙ КРАЙНЕГО СЕВЕРА

А.М. Близкий

ВНИИ молочной промышленности, Москва, Россия

Миграция людей, вызванная развитием экономики страны, потребовала изменения пищевого рациона в различных регионах, особенно на Крайнем Севере, где появилась необходимость обогащения традиционных продуктов компонентами, содержащими минеральные вещества, клетчатку, витамины и др. Следует отметить, что результаты исследований подтверждают необходимость насыщения пищевых продуктов различными витаминами и белками растительного происхождения [1].

В рамках государственных программ формируются задачи использования пищевых отходов, которые содержат много полезных и очень нужных человеку веществ. Программы способствуют включению отходов в производственную цепочку «отходы – вторичный ресурс (ВР) – вторичное сырье (ВС) – пищевой продукт», что представляется естественным и будет способствовать повышению удельного веса использования ПО в производстве инновационных пищевых продуктов (новых или модернизированных по составу традиционных пищевых продуктов) [2]. Одновременно, уменьшение пищевых отходов способствует решению сложных экологических проблем.

Пивная дробина (ПД) является основным отходом пивоваренного производства [3], ежегодные объемы которой составляют более 60 млн декалитров. В ПД содержится большое количество аминокислот (лизин, лейцин, и др.), микро- и макроэлементы, жир, витамины и др., что делает ПД (переход «ВР-ВС») в перспективное сырье для использования в регионах с дефицитом ценных пищевых компонентов в рационе питания человека. Состав ПД, содержащей также клетчатку, богатый белковый состав, фенольные соединения и др.) гармонично соответствует требованиям к обогащенным пищевым продуктам для жителей Крайнего Севера. В настоящее время проводятся исследования по применению ПД в молочных продуктах, включая сгущенное молоко.

Литература

1. Каких витаминов не хватает жителям Севера и как... [Электронный ресурс] // news.sgnorilsk.ru – Режим доступа: <https://news.sgnorilsk.ru/2023/05/11/kakih-vitaminov-ne-hvataet-zhityam-severa-i-kak-vozpolnit-ih-deficit/>, свободный.
2. Хуршудян С.А. Требования к качеству отходов пищевых продуктов / С.А. Хуршудян, А.М. Близкий // *Контроль качества продукции*. 2024. – № 1. – С. 27–30.
3. Икрам С., Хуан Л., Чжан Х., Ван Дж., Инь М. Состав и питательная ценность пивоваренной дробины. *J Food Sci*. 2017 Октябрь; 82 (10): 2232–2242. doi: 10.1111/1750-3841.13794. Epub 2017 23 августа. PMID: 28833108.

УСТОЙЧИВОЕ РАЗВИТИЕ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОГО САХАРНОГО ПРОИЗВОДСТВА НА ОСНОВЕ КОНЦЕПЦИИ ЦИФРОВОГО ДВОЙНИКА

С.М. Петров¹, С.Л. Филатов², М.С. Михайличенко²

¹ *Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия*

² *ООО НТ-Пром, Москва, Россия*

Четвертая промышленная революция стимулирует отрасли пищевой промышленности к переходу от традиционного производства к интеллектуальному производству. В ходе этой трансформации существующее оборудование, процессы или устройства оснащаются некоторыми дополнительными датчиками, включая датчики программного типа (Soft Sensor) и другими киберфизическими системами (CPS) и адаптируются к цифровому производству, которое представляет собой сочетание критически важных технологий. В текущем сценарии Индустрии 4.0 сахарная промышленность ориентируется на разработку наилучших доступных и экономически эффективных технологий и процессов для повышения качества сахара с помощью платформы цифровых двойников (DT, Digital Twin), которая позволяет пользователю отслеживать, моделировать, контролировать, оптимизировать и выявлять дефекты и тенденции в текущем процессе, а также снижает вероятность ошибок, подверженных риску со стороны человека.

Технический прогресс, повышение глобальной конкурентоспособности, диверсификация требований потребителей, динамичные рыночные тенденции, цифровизация и постоянно усложняющиеся технологические процессы 21-го века оказали значительное влияние на традиционные отрасли обрабатывающей промышленности. Такая ситуация подталкивает традиционные производственные отрасли к интеллектуальному производству, которое объединяет элементы (роботы, большие данные, облачные вычисления, Интернет вещей (IoT), промышленный Интернет вещей (IIoT), моделирование и т. д.) платформы Индустрии 4.0 [7]. Это помогает в разработке процессов или продуктов со встроенными возможностями, такими как принятие решений, оптимизация производительности, реконфигурация и адаптация в рамках заявленной структуры. Наряду со всеми преимуществами интегрированных элементов, внедрение цифровых технологий и техническое обслуживание по-прежнему являются сложными задачами в интеллектуальном производстве.

Техническое обслуживание является одним из ключевых факторов, влияющих на отрасль экономически и привлечших особое внимание в эпоху цифровизации. С использованием передовых технологий диагностических цифровых двойников, включающих датчики, исполнительные механизмы и системы автоматизации, техническое обслуживание стало ключевым вопросом в современной промышленности. Общие затраты на техническое обслуживание оцениваются примерно в 15–40 % от общей стоимости производства. Отсутствие мероприятий по техническому обслуживанию приводит к внезапному выходу оборудования из строя, незапланированным простоям, потере производительности, а также увеличению производственных затрат и времени. Следовательно, для решения этой проблемы необходимо развернуть надлежащую стратегию технического обслуживания. В целом, существует три стратегии технического обслуживания, а именно: профилактическое обслуживание, реактивное обслуживание и проактивное (predictive) обслуживание. Профилактическое обслуживание является аналогом планового технического обслуживания, при котором действия по техническому обслуживанию планируются или синхронизируются в зависимости от технологического процесса или производственного цикла. Слишком высокая частота профилактических ремонтов приводит к увеличению производственных затрат, чрезмерным плановым простоям оборудования, потерям ресурсов. Реактивное обслуживание – это разновидность технического обслуживания, основанного на отказах, при котором техническое обслуживание выполняется после выхода из строя оборудования или компонента. Его также называют «корректирующим обслуживанием» или «техническим обслуживанием при поломке». Реактивное обслуживание приводит к внезапному выходу оборудования из строя, незапланированным простоям, потерям производительности и увеличению себестоимости продукции.

Среди всех стратегий технического обслуживания проактивное (predictive) обслуживание является наиболее экономически эффективной стратегией технического обслуживания, которая позволяет планировать техническое обслуживание, когда оборудование или техника нуждаются в техническом

обслуживании. Оно основано на условиях эксплуатации, а его производительность основана на прогнозах, сделанных на основе сигналов, полученных от машины. Проактивное обслуживание имеет различные преимущества по сравнению с традиционными стратегиями технического обслуживания, такие как более раннее обнаружение неисправностей, сокращение времени простоя, повышение надежности, снижение затрат и повышение производительности. Проактивное обслуживание экономит примерно 8–12 % по сравнению с профилактическим обслуживанием и до 40 % по сравнению с реактивным обслуживанием. Кроме того, в нынешнюю эпоху Индустрии 4.0 интеллектуальные стратегии технического обслуживания с помощью диагностических цифровых двойников (DT), идентифицирующих сбои и обнаруживающих нештатное поведение оборудования, могут предложить огромные преимущества по сравнению с существующими подходами к техническому обслуживанию.

В рамках парадигмы Индустрии 4.0 технологические достижения в области киберфизических систем (CPS) и постоянное совершенствование структур умного производства все более развивают концепцию «цифрового двойника». DT – это систематическая интеграция между физическим и виртуальным объектами посредством различных коммуникаций, а также данных процесса в реальном времени. Развитие вспомогательных технологий, таких как аналитика данных, IoT, PoT, большие данные, облачные вычисления, датчики, дополненная и виртуальная реальность, моделирование, искусственный интеллект и т. д., способствует бесшовной интеграции DT в различные объекты. Среда DT позволяет принимать решения в режиме реального времени, быстро перенастраивать и оптимизировать производственные процессы. Это также способствует повышению надежности, производительности, снижению рисков, раннему обнаружению неисправностей и сокращению времени простоя.

DT – это смесь больших данных, облачных вычислений, IoT, PoT, датчиков, искусственного интеллекта, машинного обучения и многих других технологий. Эти технологии находятся на пути постоянного развития. Следовательно, предполагается, что DT постоянно развивается вместе с этими технологиями. За последние четыре десятилетия цифровые двойники производственных процессов претерпели значительную технологическую эволюцию. Последние технологические достижения в области датчиков, мониторинга и инструментов принятия решений в рамках Индустрии 4.0 позволили точно внедрить цифровой двойник для мониторинга и оптимизации процесса в режиме реального времени. В 2003 году профессор Гривз из Мичиганского университета предложил концепцию виртуального цифрового представления эквивалентных физических продуктов с использованием трех компонентов, а именно: виртуального объекта, физического объекта и сетей информации и данных.

Для надлежащей интеграции устройств с их виртуальными копиями в киберфизической области и эффективного обмена информацией и данными между цифровыми двойниками, физическими двойниками и внешним миром была предложена шестиуровневая архитектура DT (рис. 1).

Архитектура включает в себя различные физические устройства, датчики и системы сбора данных в физической области во время передачи, обработки, сбора, вычислений и обмена данными в виртуальной среде. В архитектуре уровни 1 и 2 представляют собой физическую сущность или устройство. Уровень 1 включает в себя исполнительные механизмы, датчики и другие физические устройства, в то время как источник данных физического объекта определяется уровнем 2. Уровень 3 содержит локальное хранилище данных, которое получает значения контроллера от уровня 2. Интерфейс для взаимодействия между различными уровнями архитектуры и физическим объектом находится на уровне 3. Коммуникация на открытой платформе – Унифицированная архитектура (OPC-UA) является наиболее важным элементом для эффективного обмена данными между уровнями. Уровень 4 – это преобразователь данных в информацию, поддерживаемый технологиями IoT. Этот слой повышает ценность информации, полученной с уровня 3, и обрабатывает полученные данные, чтобы сделать их более ценными для верхних уровней архитектуры. Уровень 4 связывает уровень 3 с уровнем 5 путем преобразования данных из уровня 2 в информацию, отправляемую на уровень 5. И здесь OPC-UA играет жизненно важную роль в коммуникации. Уровни 5 и 6 включают репозитории облачных вычислений и инструментов эмуляции и моделирования соответственно. Слой 5 хранит историческую информацию, полученную из предыдущего слоя. Уровень 5 повышает доступность, простоту доступа и точность цифрового двойника. Уровень 6 – это когнитивный уровень архитектуры, который позволяет отслеживать состояние машины в режиме реального времени и содержит

историческую информацию о физическом двойнике. Этот уровень облегчает интеграцию пользователя с виртуальной копией физического двойника, что помогает в принятии решений, оптимизации и прогнозировании различных задач и процессов.

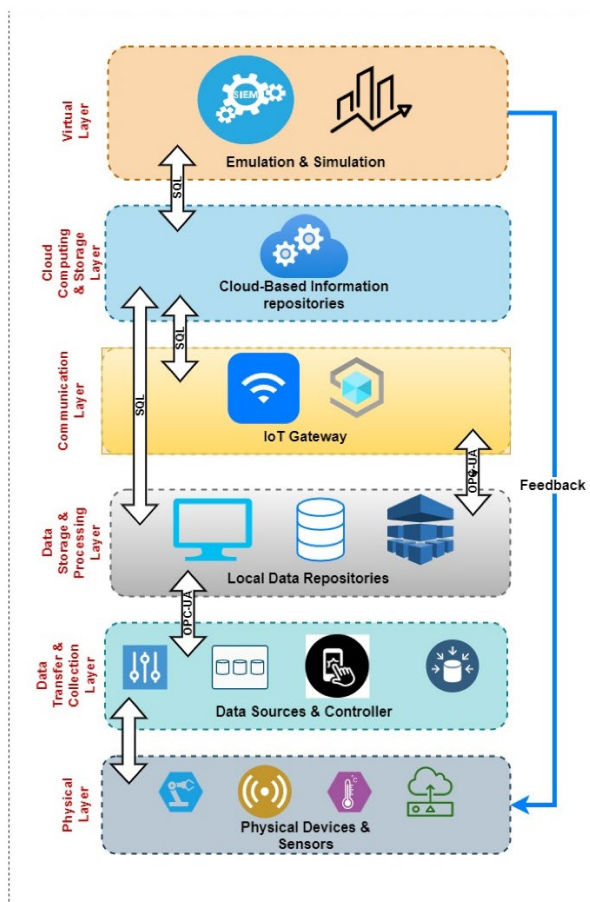


Рис. 1. Шестислойная архитектура цифрового двойника [7]

Интеллектуальное сахарное производство в рамках Индустрии 4.0 использует технологию DT для мониторинга состояния оборудования, профилактического обслуживания, оценки срока службы, оптимизации процессов, экономичного производства и настройки параметров. Модель DT строится с использованием мультисенсорных данных о технологических параметрах оборудования, процессов и имитационных моделей. DT учитывает различные рабочие параметры процесса / оборудования [8, 9]. Как правило, DT используется в локальных производственных участках, а также в работе оборудования. Данные в режиме реального времени также проверяются с помощью имитационных моделей, которые позже генерируют сигнал обратной связи для оптимизации процесса [4, 10].

В работе [5] показана возможность создания цифрового двойника на основе валидированной физико-химической модели как для сложных компонентных систем с множественными ограничениями, так и для сложных процессов с множеством различных фаз экстракции. Требуемые параметры модели могут быть определены с помощью лабораторной установки, которая успешно масштабируется по сравнению с производственной диффузионной установкой. На основе цифрового двойника компоненты могут быть классифицированы, а их поведение при экстрагировании сахарозы можно наблюдать при различных методах реализации. При этом возможность проведения большого количества симуляций или различных рабочих точек может быть использована для создания пространства для проектирования сложного процесса экстрагирования. Таким образом, успешно разработанные пространства для проектирования демонстрируют возможность применения цифровых двойников в процессе разработки на основе системного подхода «качество по дизайну»

Технологические достижения, которые позволяют использовать инструменты и технологии DT, способствуют эффективной интеграции DT в существующие системы. Для разработки и внедрения эффективной модели DT была предложена пятимерная модель DT, которая устраняет барьеры на пути реализации DT в различных областях. Модель может быть сформулирована следующим образом

$$M = (PE, VM, Ss, DD, CN),$$

где PE – физическое лицо, VM – виртуальную модель, Ss – услуги, DD – данные DT, CN – соединения [7].

Согласно пятимерной модели, для успешной реализации DT в реальной среде требуются различные технологии для практического сбора, моделирования, анализа и оценки данных. Последние технологические достижения устраняют технические барьеры при внедрении DT. Для реализации DT в фреймворк DT включены различные методы, такие как дополненная реальность/ виртуальная реальность, IoT, облачные вычисления, машинное обучение и интерфейс прикладного программирования.

Quality-by-Design (QbD). Кроме того, разделение различных эффектов массопереноса позволяет моделировать сложные методы непрерывной экстракции путем разработки эквивалентной технологической схемы путем разделения процесса на фазы мацерации и перколяции.

Впервые был разработан и внедрен цифровой двойник многоступенчатой выпарной установки на реальном промышленном предприятии [3]. С помощью динамической модели было показано, что приложение подходит для обработки колебаний завода, включая запуск и останов завода. Онлайн-измерения с завода передавались в модель в режиме реального времени через прямую связь с PI Server завода. Настройка и валидация проводились в разные периоды времени с использованием в качестве показателей качества образцов сока по шкале Брикса и аналоговых измерений давлений. Процедура обеспечила хорошее соответствие между моделью и данными процесса. Аналогичным образом, хорошие результаты были получены при переходных процессах, где цифровой двойник оставался стабильно работающим после последовательности технологических нарушений. Кроме того, информация о качестве калибровки датчиков может быть получена путем сравнения рассчитанных и наблюдаемых значений на предприятии, что может способствовать управлению техническим обслуживанием. Еще одной важной особенностью является возможность мониторинга индивидуальных KPI, разработанных специально для удовлетворения интересов компании. Наконец, полученные результаты свидетельствуют об успешном применении предложенного цифрового двойника, который функционирует с простой реальной инфраструктурой автоматизации и не требует значительных капитальных затрат на внедрение, обеспечивая важные прогнозы процессов и расширяя возможности мониторинга процессов для повышения операционной эффективности.

Актуальной на сегодняшний день является цифровизация промышленных предприятий, которая является эволюционным продолжением внедрения систем управления производством и производственными операциями (MES/MOM). При этом важную роль играет построение математических моделей различного назначения, которые являются основной составляющей разработки цифрового двойника. Цифровой двойник обеспечивает новую философию ведения производственных процессов предприятия на основе этих моделей, которая направлена на повышение эффективности как отдельных секторов, так и предприятия в целом. Для увеличения прибыли предприятия необходимо обеспечить плановую производительность технологических процессов, конечным показателем которых является выход сахара. Учитывая, что на предприятии действует значительное количество материальных потоков, в работе выделяются только производственные потоки, с которыми работает оператор-технолог. Выбранным потокам на основе экспертных оценок были присвоены взвешенные значения влияния на общие показатели сахарного производства. Это позволило построить математическую модель, которая прогнозирует выход сахара из входных потоков. Структура и параметры этой модели определяются методами машинного обучения. Это нейронная сеть прямого действия MLP 7–23–23–1, которая обеспечивает точность прогноза с погрешностью менее 1 %. Модель может быть использована для моделирования, коррекции и прогнозирования технологических режимов работы предприятия, что позволит повысить общую производительность сахарного завода [2].

Например, в работе [6] разработана цифровая модель, которая может быть использована для описания процесса кристаллизации сахара в промышленности с учетом определенной начальной точки. Предложенная валидированная физико-химическая модель процесса в виде цифрового двойника способна оценить основное влияние фактора температуры и привести к более глубокому пониманию процесса кристаллизации. Это позволяет использовать модель в качестве инструмента прогнозирования для изменения исходной точки и оптимизации результатов процесса. Полученные результаты позволяют квалифицировать модель как цифровой двойник, в отличие от цифровой тени, которая способна предсказать поведение реального объекта только в тех условиях, в которых осуществлялся сбор данных, но не позволяет моделировать ситуации, в которых реальный объект не эксплуатировался. Однако, гидродинамика жидкости в лабораторном кристаллизаторе значительно отличается от механики жидкости в промышленном кристаллизаторе, и параметры необходимо корректировать на основе данных о промышленной кристаллизации.

С использованием компьютерного моделирования цифрового двойника была разработана трехступенчатая технология кристаллизации для полунепрерывного уваривания утфелей на подготовленной кристаллической основе из затравочной суспензии (первая стадия) и кристаллической

основе из предшествующего утфеля (вторая и третья стадии). Создана компьютерная расчетная модель экспресс-метода определения коэффициента насыщения мелассы. При нагревании до температуры 50–55 °С мелассу переводят в ненасыщенное состояние, затем при кондуктометрическом контроле частично растворяют колеблющиеся кристаллы белого сахара до достижения насыщения. Метод позволяет определить оптимальные параметры стандартной мелассы с учетом технических характеристик кристаллизационного оборудования и центрифуг. На основе имитационного моделирования в программной среде VisSim были проведены испытания и дано обоснование технологии полунепрерывного уваривания утфелей для повышения эффективности кристаллизации в вакуумных аппаратах периодического действия [4].

Затраты и время, необходимые для выполнения сложных процессов, могут быть сокращены с помощью методов компьютерного моделирования, которые позволяют более точно прогнозировать качество продукта. В прогнозных исследованиях доступные данные и распределение этих данных очень важны с точки зрения используемой техники. Метод искусственной нейронной сети лучше, чем другие традиционные методы. Искусственные нейронные сети могут обобщить проблему, изучая отношения и решая проблемы в пределах допустимых пределов ошибок. В исследовании [1] использовали множественную линейную регрессию (MLR), искусственные нейронные сети (ANN) и адаптивные нейронные системы нечеткого вывода (ANFIS) для прогнозирования цветности раствора, которая является одним из критериев контроля качества при производстве сахара. ANFIS представляет собой комбинацию ANN и системы нечеткого вывода (FIS) и обладает скоростью, отказоустойчивостью и адаптивностью. В то время как традиционные методы решают проблему шаг за шагом, искусственный интеллект быстро решает проблемы, работая в реальном времени. Производственные данные сиропов и оттеков при уваривании утфелей, использованные для исследования, были получены в продуктовом отделении сахарного завода, включая такие параметры, как плотность по шкале Брикса, чистота, поляризация, pH, зольность и температура кипения чистой воды. После проведения анализа чувствительности было определено, что зольность, цветность и температура кипения чистой воды оказали наибольшее влияние на предполагаемый результат. Эти три параметра были использованы в качестве входных переменных для модели. Значения регрессии (R) и среднеквадратичной ошибки (MSE) были использованы для оценки эффективности модели. ANFIS показала лучшие результаты, чем MLR и ANN, с точки зрения точности прогнозирования, при значении R 0,99.

Литература

1. Erdem F. Parameter estimation in Crystal Sugar production With MLR, ANN and ANFIS // Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi. – 2022. – Т. 28. – №. 7. – С. 987–992.
2. Lutska N. et al. Modeling the Productivity of a Sugar Factory using Machine Learning Methods // 2022 IEEE 17th International Conference on Computer Sciences and Information Technologies (CSIT). – IEEE, 2022. – С. 353–356.
3. Soares R.M. et al. Digital twin for monitoring of industrial multi-effect evaporation // Processes. – 2019. – Т. 7. – №. 8. – С. 537.
4. Tuzhilkin V.I. et al. Process engineering of semi-continuous boiling of massecuites based on Digital Twin of sucrose crystallization // Journal of Food Engineering. – 2024. – Vol. 365. – P. 111816. – DOI 10.1016/j.jfoodeng.2023.111816.
5. Uhlenbrock L. et al. Digital twin for extraction process design and operation // Processes. – 2020. – Т. 8. – №. 7. – С. 866.
6. Vetter F.L., Strube J. Enabling total process digital twin in sugar refining through the integration of secondary crystallization influences // Processes. – 2022. – Т. 10. – №. 2. – С. 373.
7. Warke V. et al. Sustainable Development of Smart Manufacturing Driven by the Digital Twin Framework: A Statistical Analysis. Sustainability 2021, 13, 10139. – 2021.
8. Петров, С.М. Контроль и управление кристаллизацией сахарозы в вакуум-аппаратах периодического действия / С.М. Петров, Н.М. Подгорнова // Сахар. – 2024. – № 2. – С. 40–46. – DOI 10.24412/2413–5518–2024–2–40–46.
9. Петров, С.М. Онлайн-мониторинг кристаллов при уваривании утфелей / С.М. Петров, Н.М. Подгорнова // Сахар. – 2024. – № 3. – С. 16–21. – DOI 10.24412/2413–5518–2024–3–16–21.
10. Цифровые двойники и искусственный интеллект: оптимальное решение для повышения эффективности периодического уваривания утфелей / С.М. Петров, С.Л. Филатов и др. // Сахар. – 2024. – № 1. – С. 41–47.

ВЛИЯНИЕ ОСАЖДАЮЩИХ АГЕНТОВ НА УВЕЛИЧЕНИЕ СЪЕМА СЕМЕННЫХ ДРОЖЖЕЙ В ПИВОВАРЕНИИ**С.Г. Давыденко^{1,2}, А.А. Шиленко^{1,2}, М.Н. Кунцова^{1,2}, А. Андреева¹**¹ Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия² ООО «Пивоваренная компания «Балтика», Санкт-Петербург, Россия

Флокуляция и седиментация – важные характеристики штаммов дрожжей [1, 2]. Данные процессы представляют собой агрегацию дрожжевых клеток во флоккулы, с последующим осаждением.

От эффективности этих процессов зависят качество осветления, нагрузка на оборудование и возможность использования следующих генераций. Целью работы являлась проверка разных видов осаждающих агентов для увеличения съема дрожжей с низкой флокуляционной способностью.

В рамках эксперимента были взяты органические и неорганические осадители. Использовалось неохмеленное сусло из 100 % ячменного солода с начальной экстрактивностью 12,0 %. Норма задачи дрожжей – 10 млн кл/мл. Эксперимент проводился в анаэробных условиях. Основное брожение длилось 3 суток при 16,0 °С, дображивание 8 суток при 5 °С. По истечению времени анализировали концентрацию клеток (камера Горяева, Россия) и мутность (Tannometer, Германия). Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Концентрация клеток в пиве после осветления

Осаждающие агенты	Концентрация осаждающего агента, % в пиве	Концентрация клеток млн / мл	Мутность, ЕВС
Контроль	0	2,5	6,7
Ксерогель (SiO ₂)	0,024	0,8	2,1
Наносуспензия (SiO ₂)		2,1	1,6
Маннопротеины		2,5	5,7
Клеточные стенки		1,3	10,7
Коллаген		13,4	8,9

Концентрация клеток, оставшихся в объеме, показывает эффективность дрожжевого осаждения, мутность – недрожжевого осаждения. Наилучший результат формирования осадка наблюдался в случае применения нано- и ксерогелей.

Использование осаждающих агентов органической природы было менее значимым. Для дальнейших исследований требуется оптимизация их концентраций.

Литература

[1] Stewart G. Yeast Flocculation – Sedimentation and Flotation. Fermentation 2018; 4:28. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020028>

[2] Vidgren V, Lonsborough J. 125th Anniversary Review: Yeast Flocculation and Sedimentation in Brewing. Journal of the Institute of Brewing 2011; 117:475–87. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00495.x>.

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ ЧЕЧЕВИЦЫ**В.Е. Плотников, М.Г. Магомедов, И.В. Плотникова, И.М. Жаркова***Воронежский государственный университет инженерных технологий Воронеж, Россия*

Чечевица является богатым источником высококачественного белка и обладает высокой питательной ценностью за счет содержания биологически активных веществ. По содержанию белка чечевица превосходит горох и фасоль. По питательным свойствам белок чечевицы не уступает мясному белку и намного легче усваивается организмом.

Количество сырого протеина в чечевице варьируется в среднем 24–36 %, что составляет почти третью часть от общего содержания всех пищевых веществ. Исследования фракционного состава белков чечевицы показали, что в них преобладают водо- и солерастворимая фракции, при этом количественно водорастворимая фракция белков чечевицы превосходит аналогичную фракцию белков сои. Фракционный состав белков чечевицы: наибольшую долю составляет солерастворимая глобулиновая фракция – 54–86 %, водорастворимая альбуминовая несколько меньше – 8–26 %, щелочерастворимая глютелиновая – 6–20 %, спирторастворимая проламиновая – 2–3 %. Белки чечевицы содержат более 1/3 части незаменимых аминокислот от суммы всех аминокислот. Причем альбуминовая фракция содержит больше незаменимых аминокислот, чем глобулиновая. По содержанию незаменимых аминокислот белки чечевицы практически не уступают белкам сои, а по содержанию лизина, изолейцина, аргинина, фенилаланина даже превосходят. По содержанию лизина белки чечевицы близки к белкам животного происхождения и в 2–2,5 раза превышают этот показатель для злаковых культур. Однако, белки чечевицы бедны такими некоторыми незаменимыми аминокислотами, как треонином, метионином, триптофаном, изолейцином и лейцином, а также серосодержащими аминокислотами (метионином и цистеином). По показателям биологической ценности (БЦ) и коэффициенту использования белка (K_n) чечевица близка к сое, а по коэффициенту перевариваемости (K_p) превосходит ее, так как на 2–3 % лучше переваривается.

Вид бобовых	БЦ, %	Кп, %	КИ, %
Чечевица	41,0–58,0	78,0–90,0	0,6–1,1
Соя	64,0–80,0	76,0–87,0	1,3–2,0

Белки чечевицы обладают высокими функциональными свойствами, участвуя в процессах гелеобразования, эмульгирования и пенообразования. Они относятся к гидрофильным коллоидным соединениям и имеют высокую гидратационную способность из-за хорошего связывания влаги, набухания и образовывания геля. Однако они обладают ограниченной растворимостью. Для достижения максимальной растворимости при повышении поверхностно-активных свойств белковых веществ, pH водного раствора чечевицы должна быть в диапазоне 7,0–9,0. При pH 4–4,5 растворимость белков чечевицы в водном растворе минимальна. Низкая растворимость в воде может быть улучшена с помощью физических, химических или ферментативных подходов, что может привести к формированию новых функциональных свойств, например стабилизации пены и эмульсий и изменению текстуры. При взбивании чечевичные растворы дают обильную пену, что связано с высоким содержанием растворимых фракций белков альбуминового и глобулинового типа, которые обеспечивают большую диффузию к границе раздела фаз. Причем чечевичные белки проявляют пенообразующую способность при всех уровнях pH, и эта способность выше, чем у соевого и горохового белков при аналогичных диапазонах pH.

Таким образом, белковые чечевичные растворы обладают высокими биологическими и функциональными свойствами, что позволяет повысить их потенциал для дальнейшего использования, например, в качестве пенообразователя.

Литература

1. Hamid Khazaei, Maya Subedi, Mike Nickerson, Cristina Martínez-Villaluenga, Juana Frias, Albert Vandenberg / Seed Protein of Lentils: Current Status, Progress, and Food Applications // Foods. 2019 Sep 4; 8(9) : 391. doi: 10.3390/foods8090391

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОГЛОЩЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИМИНОДИУКСУСНЫМ ИОНИТОМ**А.В. Астапов, О.И. Долматова*, С.С. Потемкин***Военно-воздушная академия им. профессора Н.Е. Жуковского и Ю.А. Гагарина Воронеж, Россия***Воронежский государственный университет инженерных технологий Воронеж, Россия*

При разработке технологий ионообменных процессов, связанных с системами, в которых происходит конкуренция между низкомолекулярными и полимерными лигандами за ион металла, необходимо иметь представление о составе и устойчивости соединений, образующихся в фазе ионита. Для количественного описания сорбционных процессов в данных системах целесообразно определение термодинамических характеристик ионного обмена с учетом комплексообразования.

Целью данной работы было определение состава обменивающихся ионов и термодинамическое описание ионного обмена при конкурентном комплексообразовании в системе «иминокарбоксильный ионообменник – глутаминовая кислота – катионы меди (II) или никеля (II)».

Исследованный ионит марки АНКБ-35 содержит в своём составе иминодикарбоксильные группы ($-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$), глициновые группы ($-\text{NCH}_2\text{COOH}$) и аминогруппы ($-\text{NH}_2$) группы, которые способны выступать в качестве лигандов в процессах комплексообразования. Основными группами ионита являются иминодикарбоксильные, отношение концентрации карбоксильных групп к суммарной концентрации азота в ионите составляет 1.74. Подготовка ионита к работе осуществлялась по стандартным методикам, после чего он переводился в натриевую форму.

Для определения состава соединений, образующихся в ионите, были получены изотермы сорбции ионов меди (II) и никеля (II) из растворов их комплексов с глутаминовой кислотой при 298, 318 и 338 К. Полученные зависимости имеют вид изотерм Ленгмюра. Отсутствие перегибов свидетельствует о том, что поглощение катионов меди и никеля протекает без смены типа сорбционного взаимодействия, а именно за счет ионного обмена. После представления изотерм в координатах Ю.А. Кокотова и математической обработки по методике изложенной в работе [1] установлено, что в фазу ионообменника входит однозарядный комплексный ион металла, соединенный с аминокислотным анионом. Прямолинейность изотерм позволяет утверждать, что в фазе ионообменника образуются комплексы одного состава с функциональными группами одного типа при всех степенях заполнения ионита. Таким образом, установлено, что в иминокарбоксильном ионите происходит обмен иона Na^+ на однозарядный комплексный ион $[\text{MeGlu}]^\pm$.

После установления состава поглощаемых ионов, с использованием уравнений В.С. Солдатова [2] были вычислены константы, а также ΔG , ΔH и ΔS ионного обмена. При анализе этих величин выяснено, что селективность сорбента к комплексным ионам, содержащим медь, выше, чем к ионам, содержащим никель. Значения равновесных характеристик обмена комплексных ионов на иминодиуксусном ионите показывают, что данные процессы являются самопроизвольными и сопровождаются увеличением энтропийной составляющей изобарно-изотермического потенциала. Увеличение температуры улучшает сорбцию комплексных ионов, не изменяя при этом соотношения селективности.

Таким образом, в работе установлены состав обмениваемых ионов и термодинамические характеристики ионного обмена комплексных ионов на иминодиуксусном ионите.

Литература

1. Астапов А.В., Перегудов Ю.С., Енютина М.В. // Журнал физической химии. 2009. Т. 83. № 6. С. 1165.
2. Солдатов В.С. Простые ионообменные равновесия. Минск: Наука и техника, 1979. 182 с.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ТВОРОГА С УЛУЧШЕННЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ КАЧЕСТВА

О.И. Долматова, А.В. Астапов*

Воронежский государственный университет инженерных технологий Воронеж, Россия

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

Сбалансированный рацион питания человека должен иметь соотношение пищевых компонентов: углеводов, жиров и белков соответственно 1:1,2:4. Достигнуть его можно правильной группировкой продуктов питания. Исключительность творога в рационе человека, по сравнению с другими ферментированными молочными продуктами, доказана его близким идеальным соотношением базовых веществ 1:1:1,5. Творог является универсальным продуктом, так как отличается хорошей перевариваемостью [1, 2].

Главными процессами, определяющими качество творога, являются коагуляция казеина и обработка образующегося сгустка. Известно, что увеличение в молоке массовой доли сухих веществ, особенно белков, использование в заквасках энергичных кислотообразователей способствуют образованию плотных прочных молочных сгустков с выраженными синергетическими свойствами [3].

Продукт получали кислотным способом. При производстве творога использовали молоко сырое с высокими показателями качества, т. е. повышенной массовой долей белка на 0,7–0,8 % и жира на 0,2–0,4 %, сухих веществ; наименьшим количеством соматических клеток по сравнению с контрольным образцом. Операцию сквашивания проводили при температурах 26–32 °С, что способствовало получению творога стандартной кислотности и влажности. Температурные режимы выше 32 °С не желательны, т. к. увеличиваются размеры белковых частиц сгустка и степень выделения сыворотки при самопрессовании, в результате чего может получиться излишне обсушенный продукт с крошливой консистенцией.

Определение окончания сквашивания молока – важный момент при производстве творога. Обработка сгустка при недостаточной кислотности приводит к получению продукта с резиновой консистенцией, а при излишней кислотности продукта – с мажущей консистенцией и кислым вкусом, что обусловлено взаимодействием молочной кислоты с казеиновым комплексом. Окончание процесса сквашивания устанавливали по виду и кислотности сгустка. Кислотность должна составлять 70–80 °Т (рН 4,5–4,7). Образующийся в процессе сквашивания плотный сгусток самопроизвольно сжимается и выделяет сыворотку. Отделение сыворотки начинается в изоэлектрической точке казеина при рН 4,6–4,7 для кислотного сгустка. Нарастание кислотности при выдержке разрезанного сгустка, а также его нагревание при отстаивании ускоряют выделение сыворотки.

При производстве творога выбраны следующие технологические режимы, которые обеспечивали определенные характеристики сгустка: температура сквашивания – 30 °С, кислотность сгустка – 76 ± 1 °Т, рН – 4,7.

Продукт имеет улучшенные показатели качества: пониженную массовую долю влаги на 4,5 ± 0,2 %, меньшую титруемую кислотность на 25 ± 1 °Т, пониженное количество дрожжей и плесеней, повышенную влагоудерживающую способность по сравнению с контрольным образцом.

Литература

1. Долматова О.И., Зыгалова Е.И. Биотехнология творожного продукта с компонентами растительного происхождения // Вестник ВГУИТ. 2018. Т. 80. № 1. С. 129–132.
2. Долматова О.И., Чернышева Т.Е. Здоровый молочный перекус // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2020. – Т. 82. – №. 2 (84). – С. 88–93.
3. Физико-химические и биохимические процессы при производстве и хранении молочных продуктов: учебное пособие / Н.Г. Догарева, М.В. Клычкова; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2019. – 181 с.

ИЗУЧЕНИЕ МОРФО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СИЛИКАТНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *PAENIBACILLUS*

В.А. Полютова, С.Ц. Дампилов, А.Б. Балханова, С.В. Гомбоева

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

Работа посвящена изучению морфолого-биохимических свойств исследуемых микроорганизмов. Микроорганизмы рода *Paenibacillus* способны гидролизовать высокомолекулярные углеводы и синтезировать экзополисахариды (ЭПС), также они широко применяются в производстве моющих средств, продуктов питания, кормов, текстиля, бумаги, биотоплива, а также в здравоохранении [1].

Для определения физиолого-биохимических характеристик микроорганизмов рода *Paenibacillus* пользовались стандартными аттестованными биохимическими и микробиологическими методами. а также использование питательных сред с добавлением разных источников кремния: жидкое стекло, пепел, песок. и ЭПС осаждали, выход определяли гравиметрическим методом [2].

Цель работы – изучение морфолого-биохимических свойств исследуемых микроорганизмов. На основании данной цели были поставлены следующие задачи: изучить физиолого-биохимические характеристики культур *Paenibacillus mucilaginosus* и *Paenibacillus polymyxa*; сравнить выход ЭПС [3].

Все исследованные штаммы образовывали характерного вида колонии – слизистые, прозрачные, круглые, выпуклые с ровными краями. Микроскопирование показало, что все штаммы палочковидные, грамположительные, образуют споры и капсулы полисахаридной природы, обладают силиказной активностью. Исследование биохимических свойств культур показал одинаковое использование в качестве углевода таких сахаров, как сахароза, глюкоза, манит (исключение для штамма 4901), обе культуры не усваивают сорбит, а *Paenibacillus mucilaginosus* не усваивает мальтозу. Наибольший выход ЭПС у всех культур с источником кремния – жидкое стекло (ВСГУТУ-2 – 0,24 г; ВСГУТУ1 – 0,07 г; 4901–0,24 г; 7519–0,22 г). Максимальный выход ЭПС у *Paenibacillus mucilaginosus* 7519 составил 0,22 г и *P. Mucilaginosus* 4901–0,24 г, *P. Polymyxa* ВСГУТУ-2 – 0,24 г.

Литература

1. Перспектива применения бактерий рода *Paenibacillus* в промышленной биотехнологии для получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова // Вестник ПГТУ. Серия Лес. Экология. Природопользование. 2020. № 3. С. 47. <https://doi.org/10.25686/2306-2827.2020.3.74>
2. Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В. Влияние условий культивирования на продукцию экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, № 2. С. 179–181. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-2-179-181>
3. Улаханова, Л.А. Влияние кремнийсодержащих компонентов питательной среды на синтез экзополисахаридов силикатными бактериями / Л.А. Улаханова, С.В. Гомбоева, В.Ж. Цыренов // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. – 2023. – Т. 45. – С. 46–57.

ПРОБЛЕМЫ ОБРАЗОВАНИЯ ОТХОДОВ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И СПОСОБЫ ИХ РЕШЕНИЯ

О.В. Белашова, И.С. Горбушина, С.А. Першакова

Кузбасский государственный аграрный университет им. В.Н. Полецкого, Кемерово, Россия

В связи с изменением образа жизни и быстрой урбанизацией населения планеты увеличивается количество отходов от промышленных, сельскохозяйственных и бытовых источников [4].

Быстро развивающаяся пищевая промышленность в большинстве стран мира производит огромное количество побочных продуктов, например, выжимки, кожуру, шелуху, стручки, скорлупу, семена, стебли, отруби, целлюлозосодержащие отходы [5].

Традиционно растительное сырье является продуктами питания среди плодово-ягодных культур. В технологии пищевой промышленности продукты могут быть использованы сырыми, номинально приготовленными или полностью приготовленными, в зависимости от их природы и процесса приготовления. С изменением привычек питания и ростом численности населения производство и переработка плодово-ягодного сырья значительно улучшились, для поддержания экономической эффективности производства продуктов питания. Известно, что при переработке растительного сырья образуется значительные отходы, которые составляют не менее 25–30 % от общего объема продукции [1, 2].

По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации (ПСО) (англ. Food and Agriculture Organization, FAO), почти треть от общего объема продовольствия, производимого ежегодно, расходуется впустую. Это вызывает серьезную озабоченность, поскольку речь идет не только о потере ценных природных ресурсов, но и об их утилизации в окружающей среде. Отходы пищевой промышленности богаты органическими веществами, поэтому традиционные подходы к засыпке и сжиганию земель могут представлять серьезную опасность для окружающей среды и здоровья человека из-за образования токсичных газов во время гниения, разложения, брожения [3, 4]. Также при таких методах утилизации органических отходов уничтожаются ценные органические и другие компоненты в составе отходов.

Согласно данным Росстата, с 2005 по 2020 год количество отходов увеличилось более чем в 2 раза (рисунки 1–3).

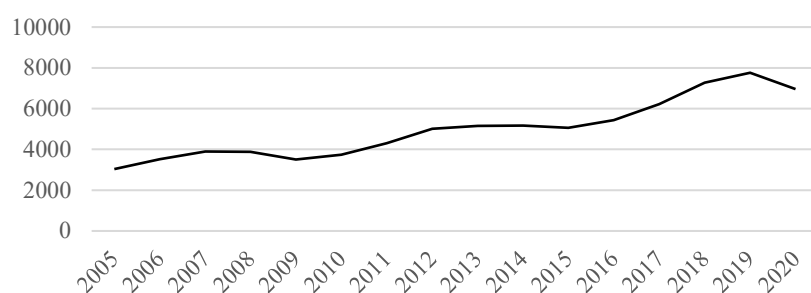


Рисунок 1. Общий объем отходов производства и жизнедеятельности

Анализируя рисунок 1, можно сделать вывод, что количество произведенных в Российской Федерации отходов постоянно увеличивается разными темпами. С 2008 по 2009 и 2019 по 2020 года наблюдалось понижение образования отходов в среднем на 516 млн тонн, что связано с Мировым экономическим кризисом

(2008 г.) и кризисом, связанным с пандемией COVID-19 (2020 г.) [6, 7]. Эти периоды характеризуются снижением промышленного производства и темпов роста. Однако в выбранный промежуток времени (с 2005 по 2020 год) количество образования отходов во всех сферах деятельности производства и жизнедеятельности увеличивается:

- с 2005 по 2020 год количество мусора увеличилось на 3920 млн тонн;
- с 2015 по 2019 год – на 2700 млн тонн, что составляет больше половины объема произведенных отходов в период за 15 лет.

Стабильная ситуация по накоплению отходов, согласно полученным данным, наблюдается с 2012 по 2015 год. В указанный период количество отходов практически не изменялось, что можно объяснить снижением импорта из-за сложной политической обстановки того времени [11].

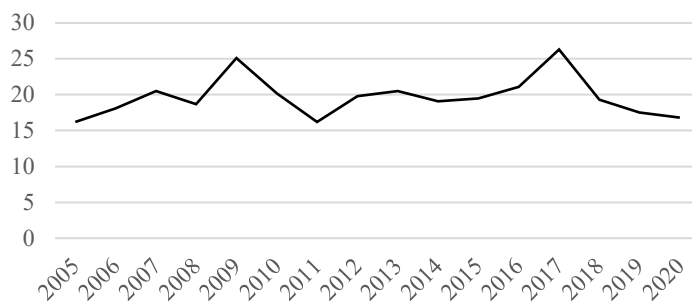


Рисунок 2. Производство отходов пищевой промышленности

2005 по 2007, с 2008 по 2009, с 2011 по 2013, с 2014 по 2017 года. В среднем количество пищевых отходов увеличивалось на 5,55 млн тонн. Так же можно наблюдать активный спад образования отходов: с 2007 по 2008 на 1,8 млн тонн; с 2009 по 2011 на 8,9 млн тонн; с 2013 по 2014 на 1,4 млн тонн; с 2017 по 2020 года на 9,5 млн тонн. Объяснить данную тенденцию можно, как и ранее экономической и политической обстановкой в стране.

В современных условиях темпы производства и потребления пищевых продуктов значительно растут и на первый план по целесообразности применения способов переработки выходят биотехнологические методы. Они являются экологичными, практичными и высоко результативными. В настоящее время биотехнологические методы являются перспективными для научных исследований [8].

Одним из методов биологической переработки отходов пищевой промышленности является биоконверсия. В основе данного способа лежит анаэробное расщепление с целью получения тепловой и электрической энергии и высококачественных органических удобрений. Среди преимуществ данного способа можно выделить максимальное использование потенциальных ресурсов отходов и глубокой переработки пищевых отходов, сокращение выбросов парниковых газов, а также получение таких новых продуктов, как удобрения, корма, биологически активные вещества и биопластики [9, 10].

Литература

1. Food loss analysis: causes and solutions Case study on the maize value chain in the Democratic Republic of Timor-Leste / ROME, 2018 / S. 48
2. Kumar, H. Fruit and Vegetable Peels: Utilization of High Value Horticultural Waste in Novel Industrial Applications / Kumar H, Bhardwaj K, Sharma R, Nepovimova E, Kuča K, Dhanjal DS, Verma R, Bhardwaj P, Sharma S, Kumar D. / Molecules. – 2020. – 25(12). – S. 2812.
3. Ravindran, R. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products / Ravindran R, Jaiswal AK. / Trends Biotechnol. – 2016. – 34(1). – S. 58–69.
4. Sharma, P. Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources / Sharma P, Gaur VK, Kim SH, Pandey A. / Bioresour Technol. – 2020. – S. 299.
5. Sharma, SK. Utilization of Food Processing By-products as Dietary, Functional, and Novel Fiber: A Review / Sharma SK, Bansal S, Mangal M, Dixit AK, Gupta RK, Mangal AK. / Crit Rev Food Sci Nutr. – 2016. – 56(10). – S.1647–1661.
6. Горковенко, А.А. Финансовый кризис 2008–2009 годов и его уроки / Матер. науч. иссл. конф. Общество в эпоху перемен: современные тенденции развития. – 2014. – том часть II. – 209–210 с.
7. Иваненко, Н.О. Влияние пандемии на экономику России: сравнительный анализ экономики России в 2019, 2020 и 2021 годах / Сборник материалов XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Россия молодая. – 2022. – 83908.1–83908.4с.
8. Кобилова, Г.И. Исследование реализации использования биотехнологий для переработки и утилизации пищевых отходов / Кобилова Г.И., Шингисов А.У. / Universum: технические науки. – 2024. – № 6–3 (123). – 74–75 с.
9. Маркелова, У.Г. Утилизация пищевых отходов с применением методов экологической биотехнологии / Маркелова У.Г., Усольцева М.А. / Сборник статей XI Международной научно-практической конференции. Проблемы и перспективы развития сельского хозяйства и сельских территорий. – 2023. – 174–177 с.
10. Нуретдинова Э.И. и др. Биотехнологическая переработка растительных отходов агропромышленного комплекса как основа экологической безопасности // Актуальная биотехнология. – 2018. – № 3 (26). – 534 с.
11. Петрушина, О.М. Динамика объемов импорта России за 2014–2016 гг./О.М. Петрушина, С.И. Смирнова // Внедрение результатов инновационных разработок: проблемы и перспективы: сборник статей по итогам Международной научно-практической конференции, Самара, 08 января 2018 года. Том Часть 1. – Самара: Общество с ограниченной ответственностью "Агентство международных исследований", 2018. – С. 151–153. – EDN YBWTEL.

**ОПТИЧЕСКАЯ СЕНСОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ С ТЕТРАЦИКЛИНОМ****О.А. Караваева¹, В.Д. Бунин², О.И. Гулий¹**¹ ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Саратов, 410049, Россия² Elosystems GbR, Берлин, 13407, Германия

В связи с широким применением антибиотиков в различных областях деятельности (медицине, ветеринарии, пищевой промышленности и др.), остро стоит проблема их определения в объектах окружающей среды. Неконтролируемое применение антимикробных препаратов приводит к их накоплению в водных ресурсах, что, в итоге, угрожает здоровью человека. Поэтому актуальным является развитие ускоренных методов анализа антибиотиков, в том числе биосенсорных. В качестве биоселективного агента (элемента распознавания) в биосенсорах преимущественно используют антитела, специфичные к определяемому антигену. Альтернативным методом получения специфичных антител, не требующим иммунизации животных и способствующим уменьшению затрат при получении антител, является технология фагового дисплея. Фаговый дисплей антител позволяет получать антитела к низкомолекулярным антигенам (гаптенам) и является перспективной методикой при разработке биосенсоров для определения антибактериальных препаратов [1–5].

В работе отработана методика получения в препаративных количествах фаговых антител, специфичных к тетрациклину, с использованием овечьей дисплейной библиотеки фрагментов scFv (Griffin.1), как описано ранее [6]. Проведены предварительные исследования, демонстрирующие возможность применения оптической сенсорной системы для регистрации взаимодействия тетрациклина со специфичными фаговыми антителами. В основе оптического метода анализа указанного взаимодействия лежит поляризация частиц, суспендированных в жидкости под воздействием переменного электромагнитного поля, как описано в работе [7]. В результате проведенных исследований выбран минимальный объем исследуемой суспензии, необходимый для заполнения измерительной оптической системы, который составляет не менее 3 мл, необходимо учитывать, что этот объем измерительной ячейки составляет ~ 0.7 мл. Оптимизированы частоты для проведения исследований и время воздействия электрического поля на исследуемую суспензию.

Установлено, что с помощью оптической сенсорной платформы и антитетрациклиновых фаговых антител можно проводить определение тетрациклина в водных растворах.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00309.

Литература

- [1] Zhao H., Nie D., Hu Y., Chen Z., Hou Z., Li M., Xue X. // *Molecules*. 2023, 28, 2621. <https://doi.org/10.3390/molecules28062621>.
- [2] Mahdavi S.Z.B., Oroojalian F., Eyvazi S., Hejazi M., Baradaran B., Pouladi N. et al. // *Int J Biol Macromol*. 2022, 208, 421–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.113>.
- [3] Smith G.P. // *Science*. 1985, 228, 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944> 5.
- [4] McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // *Nature*. 1990, 348, 552–554. <https://doi.org/10.1038/348552a0> 6.
- [5] Гулий О.И., Евстигнеева С.С., Староверов С.А., Фомин А.С., Караваева О.А. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2023, 59 (5), 512–519. doi: 10.31857/S0555109923050070.
- [6] Мартыненко А.В., Караваева О.А., Фомин А.С., Гулий О.И. // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2024. Т. 24, вып. 2, 202–207. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-2-202-207>.
- [7] Guliy O.I., Bunin V.D. A sensory system for the detection and diagnosis of bacterial cells in the book "Biointerface Engineering: Prospects for Medical Diagnostics and Drug Delivery" Editors: Pranjal Chandra and Lalit M. Pandey. 2020. Springer. Chapter 11, 233–254. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4790-4_11.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АМАРАНТА В КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ ПТИЦ**С.В. Образцова, О.В. Бондарева, Т.В. Свиридова, О.С. Корнеева***Воронежский государственный университет инженерных технологий Воронеж, Россия*

В Российской Федерации птицеводство занимает лидирующее положение среди других подотраслей животноводства. В 2023 году объем производства мяса птицы достиг 52 %, однако, наряду с данным увеличением наблюдается рост в ценовом сегменте. В первую очередь, цена на мясо птицы обусловлена рекордным ростом стоимости на комбикорма и кормовые ингредиенты. В связи с этим, дальнейшее развитие птицеводческой отрасли тесно связано с улучшением и созданием отечественной кормовой базы и генетикой птиц [1]. Современная база комбикормов включает в себя применение биологически активных веществ таких как ферменты, аминокислоты, белково-витаминные концентраты, пробиотики и др. Однако, в России производство комбикормов и премиксов в значительной степени ведется без использования альтернативных источников биологически активных веществ. При применении данных кормов в рационе птиц наблюдается значительное отставание их продуктивных показателей от мирового уровня, что приводит к снижению конкурентоспособности российского птицеводства. Таким образом, в настоящее время является актуальным поиск и использование новых кормовых ингредиентов в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы для балансирования их рациона по аминокислотам [2]. В настоящее время наиболее перспективным видом сырья для производства кормовых добавок является амарант. Он становится более популярным на рынке сельскохозяйственной продукции за счет своей низкой стоимости, высокой урожайности, простотой возделывания и уникальным химическим составом. Амарант содержит 14–20 % легкоусвояемого белка, 6 % растительных масел с высоким содержанием сквалена, витамины В, С, Е, Р, каротиноиды, макро-, микроэлементы. По аминокислотному составу белок амаранта не уступает соевому белку и молочному казеину, имеет высокую перевариваемость (90 %), сбалансирован по количеству незаменимых аминокислот, таких как лизин, метионин, цистин, которые не содержатся в традиционных злаковых и бобовых культурах. По количеству лизина амарант в 2 раза превосходит пшеницу и в 3 раза – кукурузу [4]. В надземной части амаранта содержится около 10 % пектина. Зеленая масса молодых растений амаранта содержится до 28 % белка, что характеризует его как высокобелковую культуру, и около 7 % клетчатки. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН FAO, коэффициент функциональной нагрузки продукта у амаранта самый низкий и составляет 0,08, в то время как у ячменя – 0,32, кукурузы – 0,62. В последнее десятилетие амарант все чаще применяют в качестве источника белка, содержащего незаменимую аминокислоту лизин, которая не содержится в традиционных злаковых и бобовых растениях [4]. Отечественными учеными доказано, что включение амаранта в состав рационов сельскохозяйственных животных и птицы положительное влияние на продуктивность, сохранность и физиологическое состояние кур-несушек практически всех возрастных групп, без увеличения, как стоимости кормов, так и затрат корма. Зерно и высушенная фитомасса амаранта могут заменить продукты животного происхождения – мясокостную и рыбную муку в составе комбикормов для свиней и цыплят-бройлеров, высокобелковые растительные кормовые добавки – соевый и подсолнечниковый шроты в рационах кур-несушек [5]. Таким образом, разработка кормовой добавки в виде витаминно-травяной муки из зеленой массы амаранта позволит обогатить рацион птиц высоким белковым продуктом, что окажет положительное влияние на репродуктивные функции, рост, прочность скорлупы яиц, а также резистентность организма.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ № 22-76-00062.**Литература**

1. Нормова, Т.А. Долгосрочные перспективы развития птицеводства в России / Т.А. Нормова, Р.В. Схабо, П.В. Шимко // Вестник Академии знаний, 2020. – № 38 (3). – С. 218–239.
2. Морозов В.С. Федеральная научно-технологическая программа развития сельского хозяйства на 2017–2025 годы // Матер. докл. Междунар. конгресса по кормам: XXIV Междунар. специализир. торгово-промышленная выставка «MVC: Зерно-Комбикорма-Ветеринария-2019» // Агроинвестор, 2019. – № 1. – С. 46–50.
3. Хошимжонова, Н. Амарант – как нетрадиционная культура многоцелевого использования / Н. Хошимжонова. – Текст: непосредственный // ScienceandEducation ScientificJournal. – Sep-tember2020. – Volume1, Issue6. – P. 27–34.3
4. Kondrat'ev V.B. The global pharmaceutical industry. Available at: http://perspektivy.info/rus/ekob/globalnaja_farmaceuticheskaja_promyshlennost 2011–07–18.html. (accessed 23.06.2013)
5. Адыгезалов А.М. Объективная возможность замены зерновых на зерна амаранта в кормлении растущих птиц // Инновационные направления в химизации земледелия и сельскохозяйственного производства: мат. всеросс. науч.-пр. конф. с межд. участ. и Всероссийской школы молодых ученых (19–21 июня 2019 г.). – Белгород: ООО «Принт», 2019. – С. 538–544

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ МЫШЦ ЯПОНСКИХ ПЕРЕПЕЛОВ (*COTURNIX JAPONICA*) ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ФИТАЗ ГРИБНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е.П. Исакова, Н.Н. Гесслер, О.И. Кляйн, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева,
Ю.И. Дерябина, А.В. Розумий

Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия

Птица является важным источником животного белка, на долю которой приходится 30 % мирового потребления мяса [1]. По сравнению с говядиной и свининой мясо птицы содержит меньше жира, натрия и холестерина и обладает высоким уровнем ненасыщенных жирных кислот [2, 3]. При применении современных технологий разведения основные биологические характеристики мясных цыплят, т. е. продуктивность грудных мышц, состав тела, суточные прирост веса, эффективность конверсии корма и устойчивость к болезни, значительно улучшились [4, 5]. И важным аспектом, позволяющим повышать эффективность производства мяса птицы является соблюдение технологии выращивания мясных цыплят и их откорма, в частности, оптимальный срок откорма птицы и эффективный состав кормовых смесей. Использование сырых ферментных продуктов в качестве добавок к кормам привлекло значительное внимание производителей кормов и животноводов как средство улучшения продуктивности животных [6]. Добавление экзогенных ферментов в рацион для улучшения продуктивности домашней птицы является одной из важнейших мер оптимизации производства и включает биодобавки на основе мультиферментов, разлагающих некрахмальные полисахариды [7], пробиотиков [8] и фитазных комплексов [9].

Однако, механизмы влияния фитазных препаратов на качество мяса домашней птицы и белковый состав мышц до сих пор не изучены. В работе [10] был опубликован транскриптомный анализ мышечной ткани бройлеров (*Gallus gallus*), получающих бактериальную фитазу из *Citrobacter braakii* (DSM Nutritional Products Ltd, Kaiseraugst, Switzerland) в дозе 1000 единиц на 1 кг веса птицы. Проведенные исследования выявили, что некоторые дифференциально экспрессируемые гены у птиц, получающих фитазу, по сравнению с животными, которые получали диету с пониженным содержанием фосфора без фитазы, наблюдалась значительная активация метаболических путей, связанных с мышечным метаболизмом.

В этой связи следует отметить, что протеомные методы могут стать эффективным инструментом для определения молекулярной основы физиологических изменений в мышцах во время роста птицы и помочь в выяснении механизма действия фитазных препаратов на уровне метаболизма мышечной ткани. Целью представленной работы является анализ влияния биологической добавки на основе бактериальной фитазы из *Obesumbacterium proteus*, инкапсулированной в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* Polf pUV3-Op, и коммерческой грибной фитазы *Ladozym proxy* из *Aspergillus ficuum* на белковый состав мяса японских перепелов (*Coturnix japonica*) с применением методов протеомного анализа. В исследовании изменения протеома определялись в грудных (pectoralis) и ножных (femoralis) мышцах перепелов, получающих фитазные препараты бактериального и грибного происхождения, чтобы лучше понять механизмы, лежащие в основе изменения характеристик тушек птицы и качества мяса, вызванного их добавлением в рацион.

Исследования проводились во Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте птицеводства РАН (ВНИТИП РАН) с использованием породы маньчжурских золотистых перепелов (*Coturnix japonica*), занесенной в Международный регистр пород и линий перепелов. Это очень продуктивная порода с хорошей яйценоскостью и достаточно крупным размером яиц. В опытах самцов и самок выращивали в общих клеточных батареях для молодняка до 42 дней. 42-дневных перепелов разделяли на самцов и самок и переводили в клеточные батареи для взрослой птицы, где они содержались до 60-дневного возраста в соотношении полов 1:4 (самец: самка). Влажность воздуха поддерживали на уровне 65 ± 5 % в течение всего эксперимента, а температура в помещении варьировалась: первую неделю она составляла 30 °С, вторую – 28 °С, третью – снижалась до 26–25 °С, четвертую и последующие – 23–22 °С. Протокол эксперимента был одобрен на заседании Локального этического комитета ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (протокол № 22/1 от 09.07.2022).

В ходе эксперимента было сформировано шесть групп суточных перепелов по 25 голов в каждой, различающихся по видам корма:

Контрольная группа 1 получала корм с общим фосфором 0,8 % (0,45 % доступного фосфора) без каких-либо добавок;

Контрольная группа 2 получала корм с общим фосфором 0,6 % (0,35 % доступного фосфора) без каких-либо добавок;

Экспериментальная группа 3 получала корм с общим фосфором 0,6 % (0,35 % доступного фосфора) с добавлением микрокапсулированной фитазы *O. proteus* в дозе 500 FYT на кг корма;

Экспериментальная группа 4 получала корм с общим фосфором 0,8 % (0,45 % доступного фосфора) с добавлением микрокапсулированной фитазы *O. proteus* в дозе 500 FYT на кг корма;

Экспериментальная группа 5 получала корм с содержанием общего фосфора 0,8 % (0,45 % доступного фосфора) с добавлением коммерческой фитазы *Ladozym proxu* из *A. ficuum* в дозе 4500 FYT на кг корма;

Экспериментальная группа 6 получала корм с содержанием общего фосфора 0,6 % (0,35 % доступного фосфора) с добавлением коммерческой фитазы *Ladozym proxu* из *A. ficuum* в дозе 4500 FYT на кг корма.

Приготовление биодобавок осуществляли, как описано в [11]. Для определения качества мяса и анализа протеома был произведен убой перепелов в возрасте 42 суток. Была проведена анатомическая разделка птицы, при которой были собраны образцы мышц. Приготовление белковых экстрактов, их фракционирование методом двумерного электрофореза по О'Фарреллу (2DE) с собственными модификациями и анализ электрофореграмм проводили, как описано ранее [12–14]. Фракции, выбранные для идентификации, были вырезаны из гелей 2DE, а белки были гидролизованы трипсином. Извлечённые пептиды были проанализированы с помощью MALDI-TOF MS, как описано ранее с некоторыми модификациями [15]. Для анализа белок-белковых взаимодействий дифференциально экспрессируемые белки анализировали в базе данных STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Protein, <http://string-db.org/>) с наивысшей оценкой достоверности (score > 0,9).

Далее были проведены сравнительные исследования профиля белков мышечной ткани грудных и ножных мышц перепелов. Экстракты образцов тканей были разделены методом двумерного электрофореза белков по О'Фарреллу, а затем пятна, интенсивность которых значительно различалась в различных условиях, были идентифицированы методом MALDI-TOF масс-спектрометрии для определения дифференциально экспрессирующихся белков. Всего был идентифицирован 31 белок, содержание которых в разных условиях заметно различалось. Наборы белков, характерных для мышц различных групп животных, были сопоставлены между собой. При протеомном исследовании мышечной ткани перепелов – ткани грудки (маховые мышцы) и бедра (скелетные мышцы) был выявлен ряд различий в белковом составе этих типов мышц. Основные различия были идентифицированы в семействе тропомиозинов. В ткани ножных мышц они были представлены в виде продуктов двух генов: TPM1 (α -1 тропомиозин) и TPM2 (β -тропомиозин), а в ткани грудки присутствовала только фракция α -1 тропомиозина. Фракция мышечной креатинфосфокиназы (СКМ) (Гомолог Creatine kinase M – type *** (3)) была представлена в скелетной мышце в большем количестве, что в виде двух изоформ, одна из которых была посттрансляционно модифицирована.

Кроме специфичности белкового состава разных типов мышц также оценивалось влияние разных условий откорма на белковый состав мышечной ткани, где были выявлены определенные различия. Результаты исследований показали, что оба препарата фитазы обеспечивали некоторые изменения в протеомных профилях мышц и увеличивали общее количество белка. Однако инкапсулированная фитаза из *O. proteus* действовала более эффективно при нормальных уровнях доступного фосфора, чем грибная фитаза из *A. ficuum*. Она обеспечивала сопутствующее увеличение белков семейства тропонинов и значительное изменение сократительной способности скелетных мышц. Также для всех групп, использующих фитазы в рационе, мы впервые продемонстрировали ацетилирование N-концевой части молекулы для четырех белков перепелов, а именно парвальбумина альфа изоформы X2 (PVALB), цепи L-лактатдегидрогеназы A (LDHA), фрагмента PDZ и LIM домена белка 5 изоформы X9 (LOC107313615), что может быть связано с изменениями в формировании сократительного

аппарата мышц и перераспределением метаболитов между аэробными и анаэробными метаболическими путями.

Таким образом, мы впервые провели исследование изменения протеомных профилей мышечной ткани перепелов при внесении в их рацион добавок фитазных препаратов. Мы показали, что добавление фитаз существенным образом изменяет экспрессию мышечных белков, и этот эффект зависит от уровня доступного фосфора. Оба фитазных препарата обеспечивают изменение гистологической картины мышечной ткани и увеличение белкового компонента в составе мышц. Однако, инкапсулированная форма бактериальной фитазы при нормальном уровне доступного фосфора работает более эффективно, чем грибная фитаза, обеспечивая перестройку состава белков сократительного ряда, а также впервые продемонстрировали ацетилирование / деацетилирование некоторых ферментов, связанных с гликогенолизом / гликолизом, что в совокупности может влиять на качество мяса птицы.

Работа поддержана Российским научным фондом, соглашение № 22-16-00093 от 12 мая 2022 года.

Литература

1. Seal BS, Lillehoj HS, Donovan DM, Gay CG: Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Anim Health Res Rev* 2013, 14:78–87
2. Ponte PI, Prates JA, Crespo JP, Crespo DG, Mourao JL, Alves SP, Bessa RJ, Chaveiro-Soares MA, Ferreira LM, Fontes CM: Improving the lipid nutritive value of poultry meat through the incorporation of a dehydrated leguminous-based forage in the diet for broiler chicks. *Poult Sci* 2008, 87:1587–1594;
3. Givens I: Animal nutrition and lipids in animal products and their contribution to human intake and health. *Nutrients* 2009, 1:71–82.
4. Havenstein G, Ferket P, Qureshi M: Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci* 2003, 82:1500–1508;
5. Havenstein G, Ferket P, Qureshi M: Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult Sci* 2003, 82:1509–1518
6. Marquardt RR, Brenes A, Zhang Z, Boros D (1996). Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 60: 321–330.
7. Shehab A.E., Kamelia M.Z., Khedr N.E., Tahia E.A. and Esmail F.A. Effect of Dietary Enzyme Supplementation on Some Biochemical and Hematological Parameters of Japanese Quails. *J Anim Sci Adv* 2012, 2(9): 734–739
8. Zheng A, Luo J, Meng K, Li J, Zhang S, Li K, Liu G, Cai H, Bryden WL, Yao B. Proteome changes underpin improved meat quality and yield of chickens (*Gallus gallus*) fed the probiotic *Enterococcus faecium*. *BMC Genomics*. 2014 Dec 23; 15(1) : 1167. doi: 10.1186/1471–2164–15–1167.
9. О. Труфанов. Фитаза в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы, Киев: ПолиграфИнко, 2011. – 112 с.
10. Schmeisser J, Séon AA, Aureli R, Friedel A, Guggenbuhl P, Duval S, et al. Exploratory transcriptomic analysis in muscle tissue of broilers fed a phytase-supplemented diet. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2017; 101(3) : 563–75. <https://doi.org/10.1111/jpn.12482>.
11. Danilova, M.A.; Epova, E.Y.; Trubnikova, E.V.; Badrutdinov, N.V.; Kokoreva, A.S.; Pusev, M.S.; Deryabina, Y.I.; Isakova, E.P. Encapsulated Phytase Produced by Recombinant *Yarrowia lipolytica* Exhibits High Efficiency on Broiler Chickens in Low Dosage. *Appl. Sci.* 2022, 12, 11999. <https://doi.org/10.3390/app122311999>
12. Kovalyov, L.I., Shishkin, S.S., Efimochkin, A.S., Kovalyova, M.A., Ershova, E.S., Egorov, T.A., Musalyamov, A.K. The major protein expression profile and two-dimensional protein database of human heart. *Electrophoresis* 1995, 16, 1160–1169;
13. Kovalyova, M.A.; Kovalyov, L.I.; Serebryakova, M.V. Age-Related Changes in Albumin and Actin of Human Myo-cardium. *Biochemistry (Moscow)* 2008, 2, 160–165.;
14. Epova, E.; Guseva, M.; Kovalyov, L.; Isakova, E.; Deryabina, I.Y.; Belyakova, A.; Zylkova, M.; Shevelev, M.Z.A.A. Identification of Proteins Involved in pH Adaptation in Extremophile Yeast *Yarrowia lipolytica*. In *Proteomic Applications in Biology*; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2012; pp. 209–224
15. Govorun, V.M.; Moshkovskii, S.A.; Tikhonova, O.V.; Goufman, E.I.; Serebryakova, M.V.; Momynaliev, K.T.; Lokhov, P.G.; Khryapova, E.V.; Kudryavtseva, L.V.; Smirnova, O.V. Comparative Analysis of Proteome Maps of *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Biochemistry (Moscow)* 2003, 68, 42–49, doi : 10.1023/a : 1022189200944.

ДИАГНОСТИКА МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ВНЕСЕНИИ В ПОЧВУ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА**Н.Е. Кравцова, Е.М. Вечканов, В.А. Пономаренко, М.Н. Мирнова***Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия*

Важнейшей проблемой сельскохозяйственной биотехнологии является установление потребности сельскохозяйственных культур в удобрениях при тех или иных почвенно-агрохимических условиях. Особенно остро эта проблема стоит в современном земледелии, где идет процесс сокращения пахотных почв и площади пашни на душу населения. В то же время растет потребность в продуктах питания, а промышленности – в сырье. Таким образом, интенсификация земледелия, а вместе с ним и всего аграрного комплекса, становится объективно необходимым условием дальнейшего развития сельского хозяйства и увеличения производства его продукции. Мировая практика, огромный опыт нашей страны показали решающую роль в этом деле удобрений. Их количество из года в год растет, а вместе с тем увеличивается и ответственность работников сельского хозяйства за их рациональное использование. Требуется постоянное и детальное изучение условий, от которых зависит эффективность действия удобрений как на величину, так качество урожая сельскохозяйственных растений (Шафран, 2000).

Наиболее актуальной задачей в сельском хозяйстве является использование различных продуктов биотехнологического производства в качестве удобрений. В роли таких продуктов может выступать барда и лигногуматы. Барда является побочным продуктом производства этилового спирта, который образуется после брожения зерна. Она содержит большое количество органических веществ, таких как белки, углеводы, витамины и минералы. Использование барды в качестве удобрения имеет ряд преимуществ, таких как: улучшения плодородия почвы, снижение затрат на удобрения, экологичность использования, уменьшение количества отходов при производстве спирта, возможность получения дополнительного экономического дохода предприятия. Лигногуматы – это органические удобрения полученные из древесины, содержащие гуминовые кислоты, которые являются природными стимуляторами роста растений. Использование лигногуматов в качестве удобрений имеет те же преимущества, перечисленные выше, а также способность к стимуляции роста корневой системы растений и увеличение их устойчивости к патогенам. Идея оптимизации применения продуктов биотехнологического производства приобретает особую актуальность в настоящее время при существующем диспаритете цен на энергоносители и дороговизне промышленных удобрений. Действие данных продуктов биотехнологического производства в качестве удобрений изучено в разных регионах России, однако данных об их влиянии на минеральное питание и диагностические показатели озимой пшеницы в условиях Нижнего Дона недостаточно.

Работа включает данные полевых опытов, проведенных в учебно-опытном хозяйстве Южного федерального университета и лабораторных исследований Академии биологии и биотехнологии ЮФУ. Объектом полевых исследований является озимая пшеница сорт Зерноградка-11. Биологические признаки сорта Зерноградка-11: среднеранний, вегетационный период 233–285 дней, высота растений 71–86 см, засухоустойчив, хлебопекарные качества хорошие, среднеустойчив к твердой головне, средняя урожайности в Северо-Кавказском регионе 39,7 ц/га.

Полевой опыт был заложен на опытном участке согласно методике полевого опыта Доспехова (1985). Общая площадь делянок – 3750 м². Повторность опыта четырехкратная. Предшественник – чистый пар. Основная обработка почвы складывалась из следующих приемов: вспашка на глубину 25–27 см плугом ПН – 4–35. По мере прорастания сорняков проводили культивации КПС-4 в агрегате с гусеничным трактором марки ДТ-75. Посев и прикатывание проводили зерновой сеялкой СЗ – 3,6 и катком ЗКК – 3,6, смонтированными на тракторе марки МТЗ-82.

В качестве удобрений применялись биотехнологические продукты: «Барда», «Гумат калия», «Лигногумат», «Биогумус». Полевой опыт проводился согласно схеме: 1 вариант – контроль, 2 вариант – «Барда», 3 вариант – «Гумат калия», 4 вариант – «Лигногумат», 5 вариант – «Биогумус». В работе были использованы следующие методы: морфо-биометрическая диагностика проведена по Церлинг (1990). Мокрое озоление растительного материала проводили по Гинзбург (Минеев, 2001). Азот после мокрого озоления растительного материала определяли фотоколориметрическим способом с использованием реактива Несслера (Минеев, 2001). Кислоторастворимый фосфор в растениях

определяли колориметрически (Минеев, 2001). Определение содержания общего калия проводили пламенно-фотометрическим методом (Минеев, 2001). Для статистической обработки полученных данных проводили дисперсионный и корреляционный анализы при помощи программы Statistika 13,3.

Результаты морфо-биометрической диагностики важны при анализе данных химической диагностики, поскольку имеет значение зависимость концентрации элементов в растении от его массы, так называемое «разбавление массой». Только сопоставление результатов этих двух видов растительной диагностики позволит выявить роль минерального питания или другого изучаемого фактора в формировании урожая (Шафран, 2000).

В полевых исследованиях в фазу кущения озимой пшеницы провели визуальные наблюдения, которые показали, что во всех вариантах опыта отмечен активный рост растений. Растения озимой пшеницы имели интенсивную окраску листьев и стеблей.

Каждый поглощенный корнями элемент вступает во внутриклеточный обмен и взаимодействие с другими элементами, находящимися в клеточном содержимом. Наилучшие условия для обменных реакций и образования нового органического вещества в растении создаются при оптимальном содержании необходимых элементов. Среди основных элементов питания, которые улучшают качество зерна озимой пшеницы, важная роль принадлежит азоту. Он является составной и незаменимой частью всех аминокислот, белков, хлорофилла, ферментов. О параметрах содержания общего азота, фосфора и калия в растениях озимой пшеницы можно судить в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Среднее содержание общего азота, фосфора и калия в растениях озимой пшеницы в фазу кущения по вариантам опыта

Вариант опыта	N, %	Уровень содержания	P, %	Уровень содержания	K, %	Параметр содержания
Контроль	0,83	очень низкий	0,47	низкий	3,15	низкий
«Барда»	4,85	высокий	0,42	низкий	3,72	оптимальный
«Гумат калия»	2,04	низкий	0,42	низкий	4,81	оптимальный
«Лигногумат»	2,31	низкий	0,50	оптимальный	3,19	низкий
«Биогумус»	2,40	низкий	0,40	низкий	3,34	низкий

В контроле уже в начале вегетации наблюдается начало недостатка питания. В фазу осеннего кущения содержание азота характеризуется как высокое при внесении «Гумата калия», при этом растения из контрольного варианта соответствуют очень низкому уровню обеспеченности. Содержание фосфора характеризуется как оптимальное при внесении «Лигногумата», а оптимальное содержание калия при внесении «Барда» и «Гумат калия».

Результаты определения элементов питания в надземной части растений озимой пшеницы в фазу полной спелости приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Химический состав надземной части растений озимой пшеницы в фазу полной спелости

Вариант	N, %	P %	K, %
Контроль	2,44	0,64	1,9
«Барда»	2,22	0,80	2,1
«Гумат калия»	2,01	0,72	2,2
«Лигногумат»	2,11	0,74	2,0
«Биогумус»	2,11	0,73	2,1

Из полученных данных видно, что максимальное содержание азота в растениях озимой пшеницы в фазу полной спелости отмечено на контрольном варианте. Следует отметить прямую среднюю зависимость ($r = 0,5$) между содержанием азота в растениях и урожаем соломы (Лакин, 1990).

При оптимальном соотношении азота и фосфора, создаются условия для получения одновременно высокого урожая и хорошего качества зерна. Внесение продуктов биотехнологического производства положительно повлияло на содержание фосфора и калия в растениях во всех вариантах.

Озимая пшеница является важнейшей продовольственной и стратегической культурой в РФ. Её урожайность является результатом влияния каждого из показателей почвенного плодородия. Для получения высокого урожая зерна озимой пшеницы необходимо правильное сочетание агротехнических приемов. Большое значение в формировании урожая имеет правильный выбор предшественников и удобрений. Анализ полученных данных показал, что во всех вариантах опыта происходит повышение урожайности зерна озимой пшеницы при внесении удобрений. Следует отметить снижение эффективности «Барды» при использовании ее в качестве основного удобрения. Влияние удобрений на урожай озимой пшеницы в условиях полевого опыта, показано в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние удобрений на урожайность озимой пшеницы

Вариант опыта	Урожай зерна, ц/га	Разница с контролем, ц/га	Урожай соломы, ц/га	Разница с контролем, ц/га
Контроль	32,0	–	81,8	–
«Барда»	32,8	0,8	62,2	-19,6
«Гумат калия»	38,8	6,8	61,8	-30,0
«Лигногумат»	40,0	8,0	59,8	-22,0
«Биогумус»	39,2	7,2	61,6	-20,2

Таким образом, достоверное увеличение урожайности озимой пшеницы отмечается в вариантах при внесении продуктов биотехнологического производства «Гумат калия», «Лигногумат», «Биогумус» на 6,8, 8,0 и 7,2 ц/га соответственно.

Литература

- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
 Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебник для вузов. 4-е издание. – М.: Высшая школа. 1990. – 352 с
 Минеев В.Г. Практикум по агрохимии. – М.: МГУ, 2001. – 689 с.
 Церлинг В.В. Диагностика питания с-х культур (справочник). – М.: Агропромиздат, 1990. – С. 235.
 Шафран С.А. Диагностика азотного питания зерновых культур и определение потребности в азотных удобрениях. – М.: РАСХН, 2000–66 с.

ВЛИЯНИЕ СОЛЕТОЛЕРАНТНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ НА ПАСТБИЩНЫЕ ТРАВЫ, РАСТУЩИХ НА ЗАСОЛЕННЫХ ПОЧВАХ

И.Э. Смирнова, Г.Б. Баймаханова, Э.Р. Файзулина, Л.Г. Татаркина, Я.У. Рахметова

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

Введение. Исторически и традиционно Казахстан является территорией пастбищного животноводства. Однако в Казахстане, как и во всем мире, наблюдается устойчивая тенденция к засолению пастбищных земель, что связано с прежде всего с потеплением климата, которое приводит к увеличению скорости испарения воды с поверхности почв, орошением пастбищ минерализованной водой, а также с неблагоприятными методами ведения пастбищного хозяйства [1]. Большая часть пастбищных экосистем серьезно нарушена, ряд ценных видов кормовых трав исчезают, почвы сильно истощаются. Так, в Казахстане, в 2022 году 33,4 % пастбищ находились в плохом состоянии, 26,2 % – в очень плохом состоянии, в 2023 году очень плохое состояние пастбищ было выявлено уже на 40 % угодий [2]. В настоящее время, общая площадь деградированных пастбищных земель в Казахстане составляет более 22,0 млн га, из них на засоленные пастбища приходится 31,3 % [3]. Засоление почв существенно влияет на продуктивность культур и является одним из самых разрушительных абиотических стрессов, так как отрицательно воздействует как на почвы угодий, так и урожайность кормовых трав. Показано, что засоленные почвы, прежде всего отрицательно влияют на азотное питание растений, поскольку снижают эффективность поглощения и использования азота из почвы растениями и, тем самым, сдерживают, а иногда и полностью прекращают их рост и развитие [4].

Бактерии, стимулирующие рост растений (PGPB – Plant Growth Promoting Bacteria), играют положительную роль в улучшении роста растений и повышают их продуктивности посредством различных механизмов [5]. Они способны влиять на растения, помогая поглощению питательных веществ посредством продукции фитогормонов (ауксин, гиббереллины, цитокинины), АСС-дезаминазы (аминоциклопропанкарбоксилат дезаминаза) и увеличивая доступность азота почвы [6,7]. Практическое использование азотфиксирующих солетолерантных бактерий, присутствующих в засоленных почвах, предлагает многообещающий подход к улучшению роста растений, особенно в стрессовых условиях окружающей среды. Растения, инокулированные такими бактериями, показали более высокую устойчивость к воздействию различных типов стресса, в том числе, и солевого [8].

Цель работы – изучение влияния солетолерантных азотфиксирующих бактерий на рост пастбищных трав в условиях солевого стресса.

Материалы и методы. Объектами исследований служили выделенные и идентифицированные ранее солетолерантные свободноживущие азотфиксирующие бактерии. Бактерии были выделены из почв двух засоленных пастбищ в Илийском районе Алматинской области. Тип почв – серозем обыкновенный, содержание гумуса низкое – 0,9–1,1 %, легкогидролизуемого азота – 58,2 мг/кг почвы, подвижного фосфора – 21,4 мг/кг почвы и подвижного калия – 460 мг/кг почвы. Сбор почвы проводили с глубины 10–20 см. Анализ водной вытяжки почв показал, что почва одного пастбища относится к средnezасоленным, с содержанием солей 0,389 % и значением pH 8,9, второго поля – к сильнозасоленным, с содержанием солей 1,051 %, значение pH 9,2. По содержанию ионов HCO_3^- (0,015 %) почвы пастбищ относятся к слабощелочным.

Для смягчения солевого стресса у луговых трав использовали два штамма солетолерантных азотфиксирующих бактерий, выделенных из образцов засоленных почв, приведенных выше. Идентификация бактерий классическими и молекулярно-генетическими методами показала, что один штамм относится к роду *Azotobacter*, вид *Azotobacter chroococcum* Az37, второй – к роду *Agrobacterium*, вид – *Agrobacterium* sp. Azg28. Род *Azotobacter* характеризуется как свободноживущие, аэробные, азотфиксирующие, гетеротрофные, грамотрицательные бактерии, класс γ -Proteobacteria.

Род *Agrobacterium* – это грамотрицательные, аэробные палочки, расположены одиночно или в парах, спор не образуют, подвижны за счет перитрихальных жгутиков, относятся к семейству *Rhizobiaceae*, классу α -Proteobacteria, способны фиксировать атмосферный азот.

В опытах использовали семена основных луговых трав, произрастающих в естественных травостоях высокопродуктивных пастбищ Алматинской области Казахстана. В состав травосмеси входили злаковые травы: тимофеевка луговая (*Phleum pratense* L.), овсяница луговая (*Festuca pratensis* L.) и райграс многолетний (*Lolium perenne* L.), в соотношении 1:1:1.

Для изучения влияния бактерий на рост трав в условиях засоления почвы, семена были стерилизованы [9]. Стерилизованные семена были инокулированы суспензией бактерий с титром 1×10^8 КОЕ/мл в течение 2 часов при температуре 23°C , из расчета 5 мл суспензии на 1 г семян. Далее семена были высеяны в сосуды на 250 мл с засоленной почвой по 1 г семян на сосуд. Тип почвы – серозем обыкновенный, содержание гумуса 0,86 %, легкогидролизуемого азота – 58,6 мг/кг, подвижного фосфора – 24,8 мг/кг и подвижного калия – 468,7 мг/кг. Общее содержание солей 1,058 %, значение pH 9,2. Через 30 дней после постановки опыта, растения убирали, высушивали корни и стебли до постоянного веса, определяли их сухую массу и осуществляли микробиологический и биохимический анализ почвы. Эксперименты проводили в климатической камере (Memmert HPP 750 Constant Climate Chamber, Германия). Световой день – 9 ч, температура 25°C , освещенность: холодный белый свет – 6500 К, теплый свет 2700 К; ночной режим – 15 ч; температура 18°C , влажность – 68 %. Исследования проводили в трехкратной повторности.

Общее количество микроорганизмов в образцах почвы оценивали высевом на питательный агар [10], численность азотфиксирующих микроорганизмов – на среде Эшби [11]. Активность дегидрогеназы в почве анализировали путем восстановления хлорида 2, 3, 5 – трифенилтетразолия (ТТС) до трифенилформазана (ТФФ) [12]. Общий азот и сырой протеин в растениях определяли на приборе Turbotherm TT-125M («Gerhardt», Germany) в соответствии с протоколом, прилагаемом к прибору.

Статистическую значимость полученных результатов анализировали с использованием пакета программ STATISTICA 10.0, ver. 6.0 [13]. Различия считались значимыми при $p < 0,05$, а значения представлены как среднее значение (М) $\pm$ стандартное отклонение ($\pm$ SEM) [14].

Результаты и обсуждение. Изучение влияния инокуляции бактерий на микробиологические характеристики почвы показали высокий положительный воздействие на ее микрофлору. В таблице 1 приведены данные по влиянию бактерий на общее микробное число, численность азотфиксирующих микроорганизмов и активность дегидрогеназы почвы.

Таблица 1 – Влияние азотфиксирующих бактерий на микрофлору засоленной почвы и активность дегидрогеназы

Варианты опыта	ОМЧ*, КОЕ/г почвы	Азотфиксаторы, КОЕ/г почвы	Дегидрогеназа, ед. ОП
Исходная почва (контроль)	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^3$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^2$	$0,14 \pm 0,01$
Почва+ <i>Az. chroococcum</i> Az37	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^5$	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^3$	$0,94 \pm 0,3$
Почва+ <i>Agrobacterium</i> sp. Azg28	$(4,8 \pm 0,2) \times 10^5$	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^3$	$0,97 \pm 0,4$

Примечание: ОМЧ * – общее микробное число; $p < 0,05$; $n = 5$

Из данных таблицы 1 следует, что инокуляции солетолерантных азотфиксирующих бактерий *Az. chroococcum* Az37 и *Agrobacterium* sp. Azg28 в условиях солевого стресса увеличила общее количество микробов в почве на два порядка – с 10^3 КОЕ/г почвы (исходная почва) до 10^5 КОЕ/г почвы. Кроме того, установлено, что при внесении бактерий количество азотфиксаторов повысилось на порядок и составило для *Az. chroococcum* Az37 и *Agrobacterium* sp. Azg28 – $3,6 \times 10^3$ КОЕ/г почвы и $4,1 \times 10^3$ КОЕ/г почвы, соответственно. Через 30 дней после инокуляции активность фермента дегидрогеназы в почве увеличилась в 6,7–6,9 раз. Следует отметить, что среди почвенных ферментов, дегидрогеназа является одним из основных биохимических показателей почвы, так как это фермент считается индикатором биологических окислительно-восстановительных процессов почвы, мерой интенсивности микробиологического разложения веществ и показателем микробиологической активности почв. Приведенные результаты свидетельствуют о высоком положительном влиянии инокуляции бактерий на микрофлору почв и ее ферментативную активность.

Рядом авторов установлено, что инокуляция *A. chroococcum* повышает устойчивость растений к засолению за счет увеличения содержания в растениях растворимых сахаров, белков и аминокислот и

стимулирует рост корней и стебля растений [15,16]. Также показано, что бактерии рода *Agrobacterium* можно использовать в качестве биоудобрения для улучшения роста и урожайности культур при различных стрессах. Установлено, что основной причиной положительного воздействия *Agrobacterium* на растения является выработка фитогормонов, которые влияют на растения, способствуя усвоению воды и почвенных элементов [17].

Проведенные нами исследования по влиянию азотфиксирующих бактерий на развитие пастбищных трав показало, что они существенно улучшают их рост в условиях солевого стресса. На рисунке 1 приведены результаты влияния бактерий *A. chroococcum* и *Agrobacterium* sp. на рост и развитие трав.

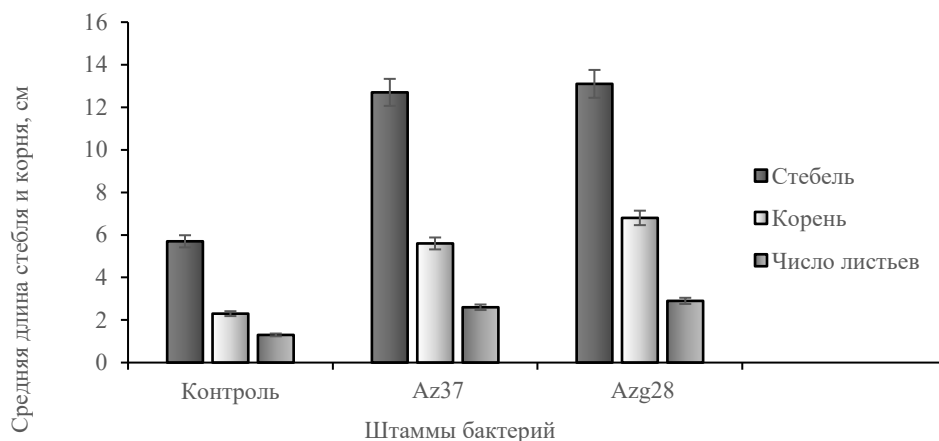


Рисунок – Влияние солетолерантных азотфиксирующих бактерий на рост и развитие пастбищных трав

Из результатов, приведенных на рисунке следует, что инокуляция семян солетолерантными азотфиксирующими бактериями положительно влияет на рост и развитие растений при солевом стрессе. При этом, длина стебля растений увеличилась в среднем в 2,2–2,3 раза, корня – в 2,4–2,9 раза, число листьев возросло в 2,0–2,2 раза по сравнению с контролем. Можно сказать, что солетолерантные азотфиксирующие бактерии *Az. chroococcum* Az37 и *Agrobacterium* sp. Azg28 стимулируют рост и развитие пастбищных трав и потенциально могут стать бактериями, стимулирующими рост растений на засоленных почвах.

Известно, что именно только за счет деятельности бактерий, органические соединения азота почвы превращаются в минеральные – аммонийные соли, нитраты и нитриты, которые затем легко усваиваются растениями. Поэтому исследовали способность солетолерантных азотфиксирующих бактерий влиять на содержание азота в растениях. Полученные результаты, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние азотфиксирующих бактерий на урожайность и содержание азота в растениях

Варианты опыта	Урожайность сухой массы, г/сосуд	Азот, %	Сырой протеин, %
Контроль	4,1 ± 0,1	0,11 ± 0,001	0,69 ± 0,001
<i>A. chroococcum</i> Az37	8,7 ± 0,1	0,17 ± 0,002	1,06 ± 0,003
<i>Agrobacterium</i> sp. Azg28	8,9 ± 0,2	0,19 ± 0,003	1,20 ± 0,004

Примечание: $p < 0,01$; $n = 5$

Из данных таблицы 2 следует, что инокуляция семян бактериями *Az. chroococcum* Az37 и *Agrobacterium* sp. Azg28 повышает урожайность пастбищных трав в 2,1–2,2 раза. При этом, количество азота и содержание сырого протеина в сухой биомассе растений возросла в 1,5–1,7 раза, что свидетельствует о положительном влиянии бактерий на развитие растений и частичном снижении солевого стресса у них.

Заключение. Таким образом, исследовано влияние солетолерантных азотфиксирующих бактерий на пастбищные травы в условиях солевого стресса. Установлено высокое положительное воздействие этих бактерий на рост, развитие и урожайность пастбищных трав, растущих на засоленных почвах. Показано, что применение этих бактерий вносит значительный вклад в общее поглощение азота травами. Также, установлено, что азотфиксирующие бактерии активируют микрофлору почв и почвенные процессы (ферментативная активность). В целом можно сделать вывод, что инокуляция солетолерантными азотфиксирующими бактериями, помогает растениям противостоять абиотическим стрессам, таким как засоленность почв и их применение имеет большой потенциал для поддержания растений в стрессовых условиях на засоленных почвах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан, в рамках грантового проекта AP23487733.

Литература

1. Abdel Latef A.A.H., Alhmad M.F.A., Kordrostami M., Abo-Baker, A. – B.A. – E., Zakir A. Inoculation with Azospirillum lipoferum or Azotobacter chroococcum reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions // Journal of Plant Growth Regulation. – 2020. – Vol. 39. – P. 1293–1306. <https://doi.org/10.1002/ldr.2780>.
2. Оралмагамбетов Б. Деграляция пастбищ: площадь неиспользуемых пахотных земель в Казахстане выросла втрое за год // Аграрный сектор. – 2023. – № 7. С. 1–2.
3. Буянов С. Почему казахстанским фермерам не хватает пастбищ. – URL: <https://eldala.kz/specproekty/15498-pochemu-kazahstanskim-fermeram-ne-hvataet-pastbishch> (дата доступа 27.03.2024).
4. Tarolli P., Luo J., Park E., Barcaccia G., Masin R. Soil salinization in agriculture: Mitigation and adaptation strategies combining nature-based solutions and bioengineering // iScience. – 2024. – Vol. 27(2). – e108830. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108830>.
5. Smirnova I., Sadanov A., Baimakhanova G., Faizulina E., Tatarkina L. Phosphate solubilizing salt tolerant bacteria promoting the growth of soybean (Glycine max (L.) Merr.) on salt soils // The Open Agriculture Journal. – 2023. – Vol. 17. – e187433152302140. DOI: 10.2174/18743315-v17-230223-2022-42.
6. Rafique E, Mumtaz MZ, Ullah I, Rehman A, Qureshi KA, Kamran M, Rehman MU, Jaremko M, Alenezi MA. Potential of mineral-solubilizing bacteria for physiology and growth promotion of Chenopodium quinoa willd // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol.13. – e1004833. doi: 10.3389/fpls.2022.1004833.
7. Timofeeva A.; Galyamova M.; Sedykh S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture // Plants. – 2022. – Vol. 11. – P. 2119. <https://doi.org/10.3390/plants11162119>.
8. Hryniewicz K, Patz S, Ruppel S. Salicornia europaea L. as an underutilized saline-tolerant plant inhabited by endophytic diazotrophs // Journal of Advanced Research. – 2019. – Vol. 19. – P. 49–56. doi: 10.1016/j.jare.2019.05.002.
9. Lindsey B.E., Rivero L., Calhoun C.S., Grotewold E., Brkljacic J. Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds // Journal of Visualized Experiments. – 2017. – Vol. 128. – e56587. doi: 10.3791/56587.
10. Веслополова Е.Ф. Микрометод определения численности колониеобразующих микроорганизмов // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 2. – С. 279–284.
11. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: МГУ. 1991. – 304 с.
12. Хазиев Ф.Х. Ферментативная активность почв. – М.: Наука, 2012. – 134 с.
13. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA 10.0, ver. 6. – М.: Горячая линия-Телеком, 2016. – 288 с.
14. Gomez-de-Mariscal E., Guerrero V., Sneider A. et al. Use of the p-values as a size-dependent function to address practical differences when analyzing large datasets // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – e20942. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00199-5>.
15. Van Oosten M.J, Di Stasio E., Cirillo V., Silletti S. et al. Root inoculation with Azotobacter chroococcum 76A enhances tomato plants adaptation to salt stress under low N conditions // BMC Plant Biology. – 2018. – Vol.18(1). – P. 205. doi: 10.1186/s12870-018-1411-5.
16. Gamalero E, Glick BR. Recent advances in bacterial amelioration of plant drought and salt stress // Biology (Basel). – 2022. – Vol.11(3). – P. 437. doi: 10.3390/biology11030437.
17. Фунг Т.М., Манучарова Н.А., Степанов А.Л., Поздняков Л.А. и др. Agrobacterium tumefaciens – ассоциативная азотфиксирующая бактерия // Вестник Московского Ун-та, сер. почвоведение. – 2015. – № 3. – С. 50–55.

НОВАЯ СТРАТЕГИЯ ПОИСКА БАКТЕРИЙ-ФИТОСТИМУЛЯТОРОВ В ПОЧВЕННЫХ КОНСОРЦИИУМАХ

Е.В. Празднова, А.Ю. Гуляева, П.В. Мотько

Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, Россия

Микробиомы почв являются важнейшими резервуарами потенциально полезных микроорганизмов для агrobiотехнологий, улучшающих здоровье хозяйственно-ценных растений. Такие микроорганизмы могут быть основой для биопрепаратов, которые становятся экологичной альтернативой использованию химических средств защиты растений. Однако выделение новых штаммов из почвенных сообществ – долгий и трудоемкий процесс, требующий большого объема микробиологических исследований, так как из одного образца выделяются сотни отдельных культур, каждая из которых требует отдельного тестирования.

В данной работе мы применили подход, основанный на молекулярно-генетическом исследовании культуром почв. Целью был поиск новых штаммов бактерий, положительно влияющих на рост и развитие растений. В качестве целевых генов были выбраны гены нерибосомальных пептид-синтаз (НРПС) и поликетидсинтаз (ПКС). Они обеспечивают синтез веществ, которые проявляют противогрибковые и противомикробные свойства, обладают свойствами биосурфактантов и сидерофоров и стимулируют системную устойчивость растений [1]. Как показывают наши предыдущие исследования [2], НРПС могут обеспечивать значительную часть положительных эффектов споровых бактерий, в частности, представителей *Bacillus* и *Paenibacillus*.

Из различных образцов почв Ростовской области (всего 16 образцов целинных, залежных, и антропогенно-измененных почв) были выделены культуры споровых бактерий, представляющие собой смешанную культуру сообщества споровых микроорганизмов. Был проведен ПЦР-скрининг почвенного спорообразующего сообщества, представленного, главным образом, видами родов *Bacillus* и *Paenibacillus* на наличие генов НРПС (итурин (ген *ituD*), полимиксины (*PmxE*), сурфактин (*SrfAA*), фузарицидин (ген *FusA*). В культурах трех образцов почвы, отобранных в Песчанокопском районе и п. Рассвет Аксайского района было обнаружено 8, 7 и 6 исследуемых генов НРПС и ПКС из 8. Из этих трех образцов было выделено 88 культур спорообразующих микроорганизмов, которые затем протестированы в качестве биопрепарата в вегетационном опыте на семенах пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Геномы чистых культур также были протестированы на наличие целевых генов. По результатам скрининга для опыта на семенах пшеницы были отобраны штаммы, в геноме которых содержалось по несколько целевых генов. Наиболее заметный фитостимулирующий эффект на проростки оказали 10 штаммов, самый активный из них, обозначенный как AG-8, увеличивал рост корней на 141 %, стеблей – на 169,4 %. Сухая масса корней и стеблей проростков была также значительно выше в опыте с 7 из 10 штаммов-стимуляторов. Кроме того, были найдены 3 штамма, способных активно подавлять рост фитопатогенных грибов – максимальные зоны подавления составили 13,6 мм для *F. graminearum* и 14,4 для *Aspergillus flavus*. Полногеномное секвенирование штамма AG-8 показало, что он относится к виду *Bacillus atrophaeus*, а в его геноме были обнаружены кластеры генов биосинтеза различных вторичных метаболитов, включая нерибосомальные пептиды, поликетиды, бактериоцины, сидерофоры – всего 18 биосинтетических генных кластеров, ответственных за синтез вторичных метаболитов, включая как сурфактин и итурин, наличие которых ранее показал ПЦР-анализ, так и других НРПС (бациллибактин, лоциллимицин, латероцидин).

Таким образом, предложенная стратегия позволяет с помощью молекулярно-генетического анализа значительно сузить область поиска перспективных штаммов-фитостимуляторов и ускорить процесс первичного скрининга, необходимый при разработке.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания в сфере научной деятельности № FENW-2023-0008

Литература

1. Ranjan A. et al., Jindal T. Nature's antimicrobial arsenal: non-ribosomal peptides from pgpb for plant pathogen biocontrol // *Fermentation*. 2023. V. 9. №. 7. P. 597. doi: 10.3390/fermentation9070597
2. Gorovtsov, A.V., Vasilchenko, N.G., Prazdnova, E.V., Chistyakov, V.A., & Kukharensko, L.E. (2019). The influence of soil type and preceding crop on the suppression of fusarium by indigenous spore-forming bacteria. *Periodico Tch Quimica*, 16(33), 225–240

**METHYLOBACTERIUM DICHLOROMETHANICUM SUBSP. DICHLOROMETHANICUM DM4
КАК СТИМУЛЯТОР РОСТА РАСТЕНИЙ****Н.В. Агафонова***Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ Пушинский научный центр
биологических исследований РАН, Пушино, Россия*

Methylobacterium dichloromethanicum subsp. dichloromethanicum DM4 является представителем розовоокрашенных факультативных метилотрофных (РОФМ) бактерий, выделен из осадков промышленных сточных вод, детально изучен как деструктор токсичного растворителя дихлорметана, а ранее проведенный анализ его последовательности генома был посвящен поиску и описанию генов, определяющих его физиологическую адаптацию к метилотрофии. Поскольку многие представители рода *Methylobacterium* являются типичными обитателями филло- и ризосферы растений, в данной работе проведен анализ генома *Mb. dichloromethanicum subsp. dichloromethanicum* DM4 на наличие генетических детерминант, указывающих на его потенциал как фитосимбионта, а также исследовано его влияние на рост растений в условиях *in vitro*.

Согласно аннотации генома в программах BlastKOALA (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) и RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) 29.8–40.3 % от общего числа аннотированных белок-кодирующих последовательностей связаны со способностью штамма использовать доступные в среде обитания ресурсы углеводов и аминокислот, участвовать в процессах взаимодействия с окружающей средой (обработка и передача сигналов извне): адгезии, моторике и хемотаксисе, противостоять стрессовым факторам, – все это свидетельствует о высокой адаптивности штамма к условиям окружающей среды.

Известно, что многие РОФМ способны улучшать рост и развитие растений за счет синтеза различных биоактивных соединений. В геноме штамма DM4 обнаружены гены ключевых ферментов синтеза фитогормонов (стимулируют рост, деление клеток растений, улучшают корнеобразование и процессы фотосинтеза): индолилпируватдекарбоксилазы (*ipdC*), обеспечивающей синтез индолил-3-уксусной кислоты посредством индолилпируватного пути, и изопентенилтрансферазы (*miaA*), ответственной за биосинтез цитокининов. Также найден ген D-цистеиндесульфогидразы (*dcyD*), участвующий в формировании ассоциации бактерий с растениями, обладающий фунгицидным действием и участвующий в стимуляции роста растений. Выявлены гены гидролитических ферментов эндоглюканазы, β -глюкозидазы, амилазы, эндо- и аминопептидаз, облегчающих проникновение и колонизацию растения-хозяина за счет гидролиза клеточной стенки растений. Обнаружены гены синтеза каротиноидов (*crtB*, *crtF*, *crtE/I* и *crtC*), обеспечивающие защиту клеток от ультрафиолета; гены, кодирующие ферменты биосинтеза полигидроксibuтирата (*phaAB*, *phaR*, *phaC*), внутриклеточного запасного источника углерода и энергии, расходуемого при неблагоприятных условиях. Вместе с тем, найдены гены ферментов, участвующих в солюбилизации нерастворимых фосфатов, а также кластер генов, вовлеченных в синтез сидерофоров, метаболитов-хелаторов, специфически связывающих ионы Fe^{3+} . И те, и другие участвуют в повышении доступности связанных ионов и обеспечивают преимущество для выживания и развития микроорганизмов, в том числе при колонизации растений. В опытах по инокуляции клетками штамма DM4 стерильных семян салата (*Lactuca sativa* L.) выявлено, что к 14 суткам сырая биомасса ростков и длина корней колонизированных растений превышала показатели контрольных (стерильных) на 18–20 %. При этом показано, что штамм синтезировал индолпроизводные до 12 мкг/мл культуральной жидкости, а при культивировании на среде с $Ca_3(PO_4)_2$ в качестве единственного источника фосфора, концентрация свободных фосфатов достигала 114 мкг/мл, что подтверждало способность штамма к увеличению биодоступности фосфора для себя и растений.

Таким образом, штамм DM4 обладает комплексом генетических детерминант, указывающих на его потенциал как фитосимбионта, перспективен для применения в сельскохозяйственной практике, обеспечивая более высокую урожайность, поскольку синтезирует фитогормоны, обладает фосфатсолюбилизирующей активностью и стимулирует рост растений.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00377).

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОРБЕНТА ИЗ ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД В ЦЕЛЯХ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ***О.Е. Хронюк, Т.В. Бауэр, В.Э. Болдырева****Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия*

Быстрое развитие промышленности и увеличение сельскохозяйственной, химической и энергетической продукции приводят к серьёзному загрязнению вод и почв, особенно тяжёлыми металлами, которые наносят вред окружающей среде и здоровью людей. Остро встает потребность развития устойчивых технологий. Адсорбция и иммобилизация являются перспективными методами ремедиации. Биоуголь – эффективный адсорбент с высоким содержанием углерода и большой удельной поверхностью, который производится из сельскохозяйственных и отходов. Одним из потенциальных источников для биоугля являются осадки сточных вод (ОСВ), однако высокое содержание влаги и тяжелых металлов (ТМ) снижает качество полученного биоугля и делает процесс энергоёмким. Смешивание отходов биомассы с ОСВ для совместного пиролиза может решить эту проблему. Добавление сельскохозяйственных и пищевых отходов снижает содержание влаги и ТМ, увеличивая углеродное содержание и улучшая пористую структуру биочара.

В данном исследовании был создан биосорбент из осадка сточных вод и соломы пшеницы, и его эффективность была проверена для ремедиации почв от ТМ, такого как Рb.

Сырьем служили частично обезвоженные и уплотненные после обработки на центрифуге иловые ОСВ городских канализационных очистных сооружений. Для получения биоугля (БОСВ) осадки сточных вод высушивали, после чего измельчали в фарфоровой ступке. Пиролиз проводили в высокотемпературной трубчатой печи с системой подачи газов. Осадки сточных вод загружали в цилиндрический реактор. Выдерживали при температуре 700 °С, скорость нагрева 10 °С/мин в течение 60 мин. После завершения процесса пиролиза реактор охлаждали, извлекали и взвешивали полученные образцы биоугля и определяли их физико-химические характеристики. Для выявления роли синергетического эффекта сопиролиза на качество продукта были получены образцы биосорбентов из осадков сточных вод и соломы пшеницы (БОСВ-СП), смешанных в соотношении 1:1 по массе.

Выявлено, что добавление лигнинсодержащей биомассы к ОСВ увеличивает площадь удельной поверхности $S_{\text{вет}}$ с 14,02 м²/г (БОСВ) до 25,31 м²/г (БОСВ-СП), уменьшает средний диаметр пор с 14,27 нм (БОСВ) до 11,72 нм (БОСВ-СП). При этом снижается соотношение Н/С и О/С, что повышает ароматичность и устойчивость к окислению образцов биоугля: 0,50 и 0,22 соответственно (БОСВ) против 0,38 и 0,17 соответственно (БОСВ-СП).

Сорбционную способность биосорбента по отношению к ТМ на примере Рb изучали в условиях лабораторного модельного эксперимента. Рабочие растворы готовили из нитратных солей металлов квалификации «ч.д.а.» в концентрациях 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 мМ/л. Массовое соотношение твердой и жидкой фаз составляло 1:10. Суспензии взбалтывали в течение часа и оставляли на сутки при температуре 298 ± 1 К. Затем суспензию фильтровали через фильтр «синяя лента». Концентрацию ионов ТМ в водном растворе определяли с использованием атомно-абсорбционного спектрометра «Квант-2». Из эмпирических данных были построены изотермы адсорбции и аппроксимированы уравнением Ленгмюра, при этом коэффициент детерминации имеют высокие значения ($R^2 = 0,972 - 0,979$). Установлено, что по максимальному количеству адсорбированных ионов (C_{∞} , мМ/кг), полученное из уравнения Ленгмюра, сорбенты расположены в ряду: БОСВ-СП (193,1) > БОСВ (126,3). Параметр, который указывает на степень закрепления ионов на поверхности углеродистой матрицы (Кл, л/мМ) имеет идентичные тенденции: БОСВ-СП (249,9) > БОСВ (110,5).

Таким образом, проведены сорбционные исследования поглощения ТМ синтезированным биосорбентом на основе осадков сточных вод с добавлением соломы пшеницы. Обнаружено, что сорбент, полученный в ходе сопиролиза обладает более высокими сорбционными характеристиками. Параметры уравнения Ленгмюра подтверждают эффективность применения биочара из осадка сточных вод с добавлением соломы пшеницы в целях поглощения ТМ на примере Рb.

***Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда
(проект № 22-76-10054) в Южном федеральном университете***

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ И ВИРУСОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОПЕСТИЦИДОВ

С.А. Тимофеев, А.Г. Шухалова, И.В. Сендерский, В.В. Долгих

ВНИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

Биологическая борьба с вредителями в сельском хозяйстве представляет собой безопасную и экологически чистую альтернативу широко распространенному использованию синтетических пестицидов. Разнообразные естественные враги насекомых, хищники или паразитоиды, а также патогены, такие как бактерии, вирусы и грибы, как по отдельности, так и в комбинациях, могут быть использованы для этой цели [1]. Тем не менее, этот подход не лишен недостатков, включая относительно низкую скорость уничтожения вредителей и уязвимость биопестицидов к влиянию окружающей среды. Во многом эту проблему можно решить с помощью генетической модификации патогенов насекомых, направленной на повышение их вирулентности и/или устойчивости [2, 3]. В этой работе будут представлены результаты последних лет исследований нашей группы по получению штаммов энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana* и *Lecanicillium muscarium*, а также вируса ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcMNPV) с повышенной вирулентностью. Этот эффект достигается за счет встраивания в их геномы последовательностей, кодирующих токсины из ядов хищных и паразитоидных членистоногих, а также рекомбинантные одноцепочечные антитела.

Общая схема эксперимента, для большинства изученных встраиваемых молекул заключалась в их бактериальной экспрессии, иммунизации мышей рекомбинантным продуктом и получении поликлональных антител. Затем с помощью системы bac-to-bac и вектора pFastBac™ Dual были получены рекомбинантные штаммы AcMNPV. Штаммы же генетически модифицированных грибов создавались за счет электропорации пророщенных конидий конструкциями на базе вектора pBarGPE по ранее разработанной нами методике [4]. Первичное тестирование рекомбинантных вирусов проводили за счет заражения клеточной культуры Sf9 и изучения локализации рекомбинантного продукта с помощью ранее полученных антител. Эти же антитела использовали для оценки синтеза рекомбинантных белков в *B. bassiana* и *L. muscarium* при их культивировании в жидкой среде. Целью этого этапа работы служил отбор молекул, которые будут секретироваться в активной форме зараженными вирусом клетками насекомых, или клетками энтомопатогенных грибов во внешнюю среду. Таким образом при заражении насекомых рекомбинантным штаммом, гетерогенный белок будет поступать в гемолимфу насекомого-вредителя, где он сможет оказать токсическое действие на его жизнедеятельность. Для создания биопестицидов на основе энтомопатогенных грибов и вирусов перспективными оказались 30кДа нейротоксин из яда осы наездника *Nabrobracon hebetor*, иммуносупрессорный белок rVPr1 из яда осы-наездника *Pimpla hypochondriaca*, токсин из яда паука *Agelena orientalis*. В то же время добиться экспрессии и секреции белка в активной форме не удалось для рекомбинантных одноцепочечных антител, 16кДа нейротоксина *H. hebetor*, а также δ-латроинсектотоксина из яда каракурта *Latrodectus tredecimguttatus*.

Работа выполнена при поддержке РНФ, грант 23-26-00039.

Литература

1. Koller J, Sutter L, Gonthier J, Collatz J, Norgrove L (2023) Entomopathogens and Parasitoids Allied in Biocontrol: A Systematic Review. *Pathogens* 12:957. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070957>
2. Kroemer JA, Bonning BC, Harrison RL (2015) Expression, Delivery and Function of Insecticidal Proteins Expressed by Recombinant Baculoviruses. *Viruses* 7:422–455. <https://doi.org/10.3390/v7010422>
3. Lovett B, St. Leger RJ (2018) Genetically engineering better fungal biopesticides. *Pest Manag Sci* 74:781–789. <https://doi.org/10.1002/ps.4734>
4. Timofeev S, Tsarev A, Senderskiy I, Rogozhin E, Mitina G, Kozlov S, Dolgikh V (2019) Efficient transformation of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* by electroporation of germinated conidia. *Mycoscience* 60(3): 197–200 <https://doi.org/10.1016/j.myc.2019.02.010>

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ *ASPERGILLUS NIGER* В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *PICHIA PASTORIS*

Е.А. Белаиш, Д.Н. Щербаков

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Россия

Глюкозооксидаза (ЕС 1.1.3.4) представляет собой флавопротеин, катализирующий окисление глюкозы до глюконовой кислоты и перекиси водорода в присутствии молекулярного кислорода. Получение биосенсоров на основе глюкозооксидазы (GOX) для мониторинга уровня сахара в крови является востребованным направлением, что способствовало увеличению спроса на данный фермент. Плесневые грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium* являются наиболее широко используемыми хозяевами для лабораторного и промышленного производства GOX. В связи с умеренной продуктивностью актуальной задачей является получение глюкозооксидазы в гетерологичных системах экспрессии. Дрожжевая система экспрессии на основе *Pichia pastoris* является наиболее популярной для получения гетерологичного белка, поскольку недорога, имеет относительно быстрое время экспрессии, обеспечивает высокие выходы целевых полипептидов.

Цель работы – получение штамма продуцента рекомбинантной глюкозооксидазы на основе дрожжей *Pichia pastoris*.

Кодон оптимизированный ген глюкозооксидазы *Aspergillus niger* длиной 1759 п.н. амплифицировали с использованием пары праймеров, содержащих на 5' конце сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции PstI и SalI соответственно. Полученный ПЦР-продукт и вектор pPICZ обрабатывали рестриктазами, затем лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* штамма Stbl3. Выросшие на агаризованной питательной среде LB, содержащей 50 мкг/мл зеоцина, индивидуальные

колонии анализировали на содержание плазмиды pPICZ-GOX путем проведения ПЦР. Полученным вектором pPICZ-GOX трансформировали клетки дрожжей *Pichia pastoris* штамма X33. Трансформанты отбирали на среде YPDS (глюкоза 2 %), содержащей антибиотик зеоцин в концентрации 1000 мкг/мл.

Отобранные колонии культивировали в среде BMGY в течение 16 часов. Клетки центрифугировали 10 минут при 3000g. Индукцию проводили в 15 мл среды BMMY. Культивирование продолжали в течение 3 суток при 30 и 250 об/мин. Каждые 24 часа добавляли метанол до конечной концентрации 1 %. В результате наблюдали полосу, соответствующую глюкозооксидазе с ожидаемой молекулярной массой около 72 кДа (рис 1).

Для детекции активности глюкозооксидазы использовали одноразовые тест-полоски к глюкометру Diasont, показывающие изменение концентрации глюкозы после инкубации с культуральной жидкостью, содержащей рекомбинантный белок. Таким образом, был сконструирован вектор pPICZ-GOX и получен штамм продуцент *Pichia pastoris*/GOX-BEA, обеспечивающий синтез рекомбинантной глюкозооксидазы *Aspergillus niger*.

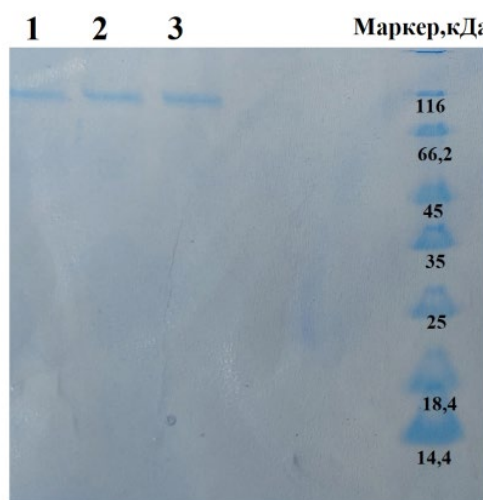


Рис. 1. Электрофореграмма разделения белковых препаратов в ПААГ, 1–3 – культуральная жидкость *Pichia pastoris* pPICZ-GOX после 3 суток индукции метанолом

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА**О.И. Гулий¹, О.А. Караваева¹**¹ ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» Саратов, 410049, Россия

Несмотря на десятилетия исследований, раковые заболевания ежегодно приводят к гибели миллионов людей. В связи с ростом числа раковых заболеваний требуются новые вспомогательные инструменты для их ранней диагностики. Ранняя диагностика рака основывается на анализе релевантных биомаркеров, что может быть использовано для наблюдения за популяцией с целью выявления заболевания до тех пор, пока оно не будет определено стандартными методами и не станет клинически манифестным. Таким образом, ранняя диагностика рака позволяет не только диагностировать начало заболевания, но и прогнозировать ответ на уже проводимое лечение и оценить тяжесть заболевания у пациентов, обеспечивая индивидуальный подход к больному, что удовлетворяет целям персонализированной медицины.

Одним из потенциальных маркеров рака являются белки теплового шока (БТШ), которые действуют как молекулярные шапероны, а изменения экспрессии БТШ могут служить важным диагностическим маркером ответа клетки на повреждение. Функции БТШ связаны с возникновением, прогрессированием и метастазированием рака, а также с резистентностью к терапии рака [1, 2]. Одним из перспективных направлений по ранней неинвазивной диагностике рака является развитие сенсорных систем диагностики БТШ. При развитии биосенсоров основополагающим моментом является подбор компонента узнавания сенсорной системы. Среди биосенсорных методов определения онкологических маркеров лидирующее положение занимают системы с применением антител. Перспективным инструментом для получения антител, специфичных к определяемому онкологическому маркеру является технология фагового дисплея. Начиная с момента открытия (1985 г.) технология фагового дисплея пережила огромный экспоненциальный рост, продемонстрировав высокую востребованность при решении разнообразных сложных проблем в биоинженерии и медицине, в том числе при исследовании рака [3]. Исследования, направленные на раннюю диагностику рака, сосредоточены на создании молекулярных сенсорных зондов, с помощью которых можно проводить мониторинг раковых заболеваний [4]. Одним из таких направлений является развитие биосенсоров, в которых рецептор (фаговые антитела), сопряжены с преобразователем и детектором. В зависимости от концентрации биомаркера в анализируемом субстрате, фиксируется изменение регистрируемого сигнала и можно количественно определить концентрацию биомаркера. Проводя измерения количества определенных белков, экспрессируемых и/или секретируемых опухолевыми клетками, с помощью биосенсорных систем на основе фаговых антител можно определить начало развития онкологического заболевания и оценить эффективность проводимого лечения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-29-00463.

Литература

- [1] Akerfelt M., Morimoto R.I., Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010; 11(8): 545–555.
- [2] Mendillo M.L., Santagata S., Koeva M., et al. HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. // Cell. 2012; 150(3): 549–562. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.031 [3] Petrenko, V.A. Phage display in cancer research: special issue editorial. Viruses 2024, 16: 968. doi : 10.3390/v16060968.
- [4] Гулий О.И., Староверов С.А., Дыкман Л.А. Белки теплового шока в онкодиагностике // Прикладная биохимия и микробиология 2023; 59(4): 323–336. doi: 10.31857/S0555109923040062.

РАЗРАБОТКА И ТЕСТИРОВАНИЕ НОВЫХ НАНОБИОКАТАЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛАЗОСОДЕРЖАЩИХ ФЕРМЕНТОВ И БИОСОВМЕСТИМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

И.А. Любкевич, С.А. Смирнова, А.И. Зорин, В.П. Молчанов, А.М. Сульман

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

С учетом растущей устойчивости микроорганизмов к антибиотикам перспективной стратегией борьбы с инфекционными заболеваниями становится использование бактериолитических ферментов. В качестве объекта исследования в данной работе выступали специально синтезированные образцы нанобиокатализаторов на основе лизоцима. Этот фермент относится к классу муреиновых гидролаз, расщепляющих пептидогликан, содержащийся в клеточных стенках бактерий. Он эффективен в борьбе с бактериями, особенно с теми, которые обладают грамположительной клеточной стенкой, может применяться для лечения таких инфекций как тонзиллит, бронхит, пневмония. Для повышения эффективности использования лизоцима проведена его иммобилизация на биосовместимых полимерных матрицах природного происхождения.

Тестирование синтезируемых нанобиокатализаторов выполнялось с применением бактерий вида *Micrococcus luteus*, являющегося стандартной тест-культурой для спектрофотометрических методик определения антибактериальной активности ферментов. Разработана методика определения антибактериальной активности нанобиокатализаторов на основе лизоцима, заключающаяся в измерении изменений оптической плотности во время действия препарата на тестовую культуру. Измерения проводились до достижения постоянной оптической плотности против дистиллированной воды, активность лизоцима вычислялась по изменению оптической плотности.

Эксперименты были проведены на растворах лизоцима и лизоциме, ковалентно или адсорбционно иммобилизованном на полимерных носителях – альгинате или хитозане. Носители были выбраны по принципам биоразлагаемости и биосовместимости. Ковалентная иммобилизация на хитозане осуществлялась путём случайной перешивки лизоцима и хитозана глутаровым альдегидом с последующей простой отмывкой препарата от избытка сшивающего агента. Иммобилизация на альгинате проводилась путем микрокапсулирования – это процесс заключения мелких частиц вещества в тонкую оболочку пленкообразующего материала. В результате микрокапсулирования получены частицы биокатализаторов в виде отдельных микрокапсул размером от долей микрона до сотен микрон.

Моделирование кинетики лизиса показало большую линейность реакции у препаратов с меньшей концентрацией. Степень кривизны кинетической кривой зависит от активности раствора. Наибольшей линейностью обладают пробы с минимальным содержанием (активностью) лизоцима. Активность препаратов с иммобилизованным лизоцимом в результате была ниже активности растворов чистого лизоцима. Препараты лизоцима, адсорбционно иммобилизованного на альгинате, были более активны чем препараты, связанные ковалентно (разницы между концентрациями обнаружено не было). Препараты лизоцима, иммобилизованного на хитозане, показали аналогичные результаты.

Разработаны математические модели для экспериментальных препаратов. Смоделированы скорости лизиса культуры *Micrococcus luteus*. В ходе анализа полученных данных рассчитаны коэффициенты уравнения ингибирования микробной культуры растворами лизоцима разной концентрации. По уравнению кинетики каталитического химического процесса рассчитана константа скорости реакции, установлен первый порядок реакции по лизоциму и полупорядок реакции по микрококку. Первый порядок означает наличие лишь одного субстрата реакции лизиса и правильность выбора для анализа уравнения кинетики Михаэлиса–Ментен. Полупорядок по микрококку объясняется наличием диффузионных ограничений в реакции. Рассчитаны коэффициенты V_m (максимальная скорость реакции при данной концентрации субстрата) и K_m (константа Михаэлиса) уравнения Михаэлиса–Ментен для разных концентраций раствора лизоцима.

В результате выполнения исследований экспериментально подтверждено, что разработанная методика определения активности может иметь широкое применение на фармацевтических и биотехнологических производствах для улучшения контроля качества выпускаемой продукции.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-79-10042).

УДК 577.213.32; 577.213.39; 577.213.44

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-1-49-50>**МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ
ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ****С.А. Лапа, А.С. Епифанов, А.В. Чудинов**

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Инфекционная пневмония – острый воспалительный процесс легочной ткани, вызываемый широким рядом возбудителей. Вспышки инфекционных пневмоний, вызванных коронавирусами, вирусами гриппа А и В, а также бактериальными возбудителями, являются серьезной социальной угрозой. От своевременной постановки точного диагноза зависит успешность назначенной терапии и стратегия лечения пациента в целом [1]. Создание методов экспресс-диагностики для точного выявления этиологии пневмонии имеет важное значение как для назначения индивидуальной терапии, так и для решения эпидемиологических задач.

Ранее мы докладывали о разработке мультиплексной ПЦР [2] и рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) [3] для видового определения бактериальных возбудителей пневмонии человека. Отличие RPA от ПЦР заключается в том, что это реакция идет в изотермическом режиме, благодаря тому, что представляет собой сложную ферментативную систему, в состав которой включены: рекомбиназа, которая создает комплекс между двухцепочечной ДНК и праймером на участке их комплементарности, стабилизирующие белки, которые удерживают этот комплекс, чтобы он не распался в момент, когда начинается синтез удлинения цепи с помощью полимеразы, обладающей 5' – 3' вытесняющей активностью, и собственно полимеразы.

Для разработки дискриминирующей тест-системы был проведен выбор видоспецифичных генетических мишеней, которые представляют собой фрагменты генов с последовательностями, характерными для конкретного индивидуального возбудителя бактериальной пневмонии. На основании проведенного анализа сконструированы видоспецифичные праймеры к шести возбудителям, удовлетворяющие требованиям для RPA, в том числе, определяющие необходимость конструирования праймеров большей длины для работы ферментативного комплекса с рекомбиназой.

Таблица 1. Видоспецифичные праймеры RPA для идентификации бактериальных возбудителей пневмонии человека

Бактериальный возбудитель	Нуклеотидные последовательности праймеров, 5'→3'	Длина продукта, п.н.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	f – TTCTGAGCCCAGGACTGCTCGTCGTGGCCGGTAGC r – GTACAACATGGCTCTGGGCGAGCGTCGTGCCAAGG	150
<i>Haemophilus influenzae</i>	f – CC(A/T) GCACCAGACCCAAACACAGCAAATTGGGTATC r – TGCTAACGGTAATTGGGATCCATCGATTTTAGCCT	195
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	r – ATGTAGATGACGGTCCCAAGTCAAGAGAGGAAAGC f – ATCTCTGCGCCATAAGCAATGACTAAATCATCTGC	210
<i>Legionella pneumophila</i>	f – CATGTTGGAGTTCTATGGCACGAATTTTC(G/T) AATAAG r – GCAGCGATCA(C/T) CCTCGGTGGATTGGCTGCCGCAAT	232
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	f – GTTGTTGGCGTAGATGTTCCAGATGAACTGGAAGGAGTCG r – GGTGTGCTGTCTGAGTTTTTCAGGCACCGTGAAATATAACG	261
<i>Staphylococcus aureus</i>	f – ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCTCAAGATAAGTCT r – CCAAATATCGCTAATGCACCGATAATTAGTACAGC	280

Проведена модификация и оптимизация системы [3], которая теперь не использует идентификации суммарной ДНК с помощью интеркалирующего красителя. Разработанная диагностическая система, основанная на RPA, включает шесть пар видоспецифичных праймеров и способна одновременно выявлять шесть бактериальных возбудителей пневмонии человека в одном реакционном объеме. В работе использовали ДНК штаммов из коллекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск), идентификацию возбудителя проводили путем визуального анализа электрофореграммы в двухволновой системе детекции сигнала (зеленый и красный каналы возбуждения флуорофора) (Рис. 1).

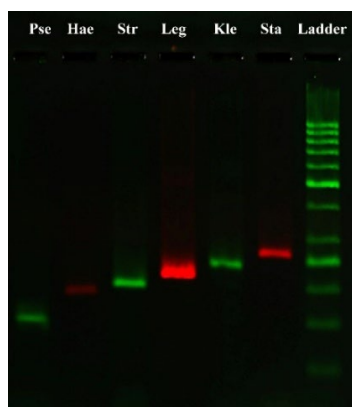


Рисунок 1: Электрофореграмма, полученная в результате определения в образце возбудителя пневмонии с помощью мультипраймерной RPA. Красный цвет означает наличие продукта амплификации праймера, несущего по 5' – концу метку Cy-5, зеленый – Cy-3. **Ladder** – молекулярный маркер длин ДНК GeneRuler 50bp (Thermo, Латвия). **Pse** – *Pseudomonas aeruginosa*, **Hae** – *Haemophilus influenzae*, **Str** – *Streptococcus pneumoniae*, **Leg** – *Legionella pneumophila*, **Kle** – *Klebsiella pneumoniae*, **Sta** – *Staphylococcus aureus*.

Из электрофореграммы, представленной на Рис. 1, видно, что праймеры сконструированы таким образом, чтобы облегчить визуальную идентификацию продуктов амплификации благодаря их различной длине. Для повышения надежности идентификации праймеры, дающие продукты близкой длины, окрашены различными флуоресцентными метками. Это позволяет визуально, по продуктам RPA, дифференцировать наличие различных возбудителей пневмонии в исследуемом образце. На том же рисунке представлен список социально-значимых возбудителей пневмонии, идентифицируемых предлагаемым методом.

Для практической проверки надежности работы системы (видоспецифичности праймеров) составлены «гипотетические» составные образцы, содержащие одновременно несколько возбудителей пневмонии. Проведены реакции одновременно с двумя возбудителями бактериальной пневмонии человека в одном образце. Из Рис. 2. видно, что во всех случаях праймеры проявляют строгую видоспецифичность, а продукты реакции хорошо дискриминируются.

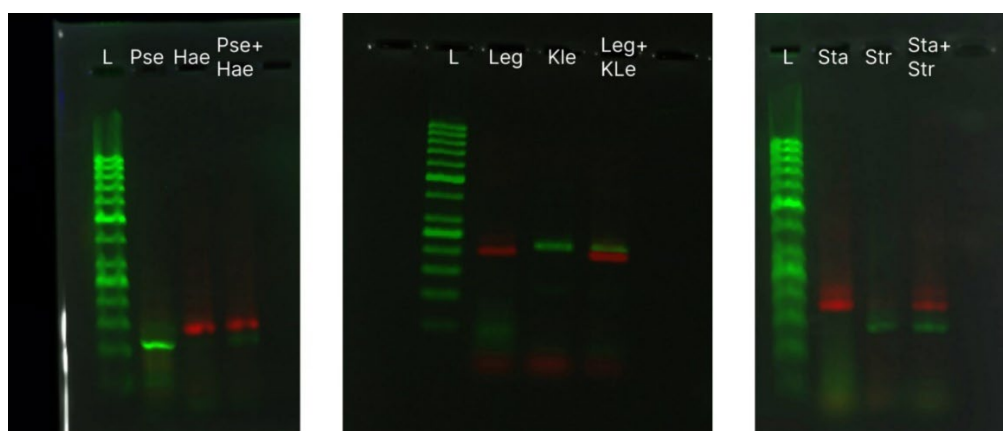


Рисунок 2: Визуальная идентификация возбудителей бактериальной пневмонии в составных образцах: L – маркер длин ДНК Ladder GeneRuler 50 bp, Sta – *S. aureus*, Kle – *K. Pneumoniae*, Leg – *L. Pneumophila*, Str – *S. Pneumoniae*, Hae – *H. Influenzae*, Pse – *P. Aeruginosa*.

Система не нуждается в использовании термоциклера. Для надежной дискриминации близких по размеру продуктов амплификации использованы флуоресцентно-меченные праймеры (Cy3 и Cy5). Аналитическая чувствительность разработанной мультиплексной RPA составила 10^2 – 10^3 копий ДНК. Тест-система может найти применение в профильных клинических лабораториях для экспресс-анализа образцов от пациентов с подозрением на пневмонию. Система запатентована (Патент РФ 2813995).

Исследование поддержано грантом РНФ № 22-14-00257.

Литература

1. Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A. // Thorax. 2011. 66 Suppl 2:ii1–23.
2. Лапа С.А., и др. // Молекуляр. биология. 2021, Т. 55. С. 944–955.
3. Лапа С.А., и др. Молекуляр. биология. 2023, Т. 57. С. 539–545.

ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА И ЛАКТАТА ЦИНКА НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ ТЕСТ-ШТАММА *STREPTOCOCCUS MUTANS***В.С. Макулова¹, И.А. Буторова¹, О.В. Романычева², И.А. Белова¹**¹ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия² АО «СВОБОДА», Москва, Россия

В настоящее время при разработке составов зубных паст или других очищающих композиций для полости рта большое внимание уделяется компонентам, способным предотвращать развитие кариеса – патологического процесса, при котором происходит деминерализация и размягчение твердых тканей зуба с последующим образованием полости под действием органических кислот, появление которых связано с деятельностью микроорганизмов. Ключевым механизмом возникновения и развития кариеса зубов является формирование зубной бляшки, плотно прикрепляющейся к поверхности зубов и образующей биопленку, которая представляет собой сложное по организации сообщество одного или нескольких видов микроорганизмов, прикрепленных к поверхности зубов и погруженных в синтезированный ими полимерный матрикс, состоящий из полисахаридов, гликопептидов, нуклеиновых кислот и липидов. Образование биопленок – это сложный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов, первым и ключевым из которых является адгезия клеток на поверхности зубов [1–3].

Из литературных данных известно, что цитрат цинка обладает антимикробной активностью и способен препятствовать образованию зубной бляшки, а лактат цинка может сдерживать развитие бактерий, продуцирующих летучие соединения серы, а также способен связывать летучие соединения серы с образованием нерастворимых соединений, устраняя неприятный запах изо рта [4].

В связи с этим в данной работе было исследовано влияние цитрата и лактата цинка на адгезию тест-микроорганизма *Streptococcus mutans* ATCC 25175, который имеет наибольшее значение в развитии кариеса.

Метод оценки заключался в культивировании тест-штамма на поверхности полистирольных чашек Петри. После инкубации планктонные бактерии удаляли вместе с питательной средой, а оставшиеся биопленки исследовали путем окрашивания красителем кристаллическим фиолетовым, который способен связываться с клетками и матриксом биопленок с последующим элюированием красителя этиловым спиртом и спектрофотометрией полученных растворов [3, 5].

Соединения цинка, как правило, вводят в состав зубных паст в концентрациях около 0,5 % масс., для чистки зубов используют порядка 1 г зубной пасты, исходя из этого было рассчитано количество цитрата и лактата цинка для исследования.

Для культивирования тест-штамма *Streptococcus mutans* ATCC 25175 использовали жидкую питательную среду для выделения стрептококков, имеющую следующий состав (на 1 л): ГМФ-основа – 8,4 г, гидролизат казеина солянокислый – 14,4 г, глюкоза – 5,0 г, натрия ацетат трехводный – 1,0 г.

Суспензию тест-штамма *Streptococcus mutans* ATCC 25175 в жидкой питательной среде с концентрацией бактерий 10^5 КОЕ/мл, соответствующей среднему содержанию *Streptococcus mutans* в полости рта [1], готовили из предварительно выращенной культуры в пробирках на скошенной агаризованной среде в течение 24 ч при температуре 36 °С. Затем в приготовленную суспензию добавляли цитрат и лактат цинка и перемешивали до полного растворения. Далее вносили по 5 мл подготовленной суспензии в стерильные полистирольные чашки Петри диаметром 60 мм в трех повторностях и культивировали в термостате при температуре 36 °С в течение 24 часов. В качестве контрольного образца использовалась жидкая питательная среда для выделения стрептококков с инокулятом без цитрата и лактата цинка. По окончании инкубации планктонные клетки удаляли из чашек Петри, 4 раза промывали их стерильной водопроводной водой (по 5 мл) и проводили окраску биопленок: добавляли по 5 мл 0,1 %-го водного раствора кристаллического фиолетового и выдерживали в течение 45 минут при комнатной температуре. Несвязавшийся краситель удаляли путем пятикратной отмычки (по 5 мл) стерильной водопроводной водой. После этого в чашки Петри добавляли по 5 мл 96 %-го этилового спирта для экстракции связавшегося с клетками красителя (рисунок 1).



Рисунок 1. Фотография растворов, полученных путем экстракции этиловым спиртом связавшегося с клетками красителя: 1 – контрольный образец, 2 – образец, содержащий цитрат цинка, 3 – образец, содержащий лактат цинка

Затем измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 583 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя, равной 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали этиловый спирт. Длину волны, при которой проводили измерения, определяли по максимуму на спектре поглощения водного раствора кристаллического фиолетового. Все действия для контрольных чашек Петри были аналогичны таковым для опытных образцов. Средние значения оптической плотности представлены на рисунке 2.

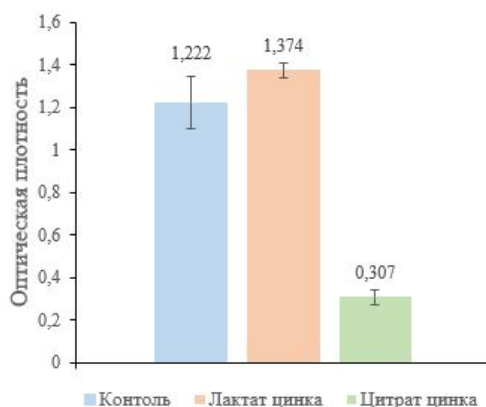


Рисунок 2. Средние значения оптической плотности растворов, полученных путем экстракции этиловым спиртом связавшегося с клетками красителя

Снижение значения оптической плотности растворов по сравнению с контролем в случае образцов, содержащих цитрат цинка, свидетельствует о том, что способность клеток *S. mutans* к адгезии и последующему биопленкообразованию на поверхности полистирольных чашек Петри в присутствии данного компонента снижается, в отличие от образцов, содержащих лактат цинка в том же количестве. Данный результат позволяет использовать цитрат цинка в концентрации 0,5 % масс. в составах очищающих композиций для полости рта с целью предотвращения формирования биопленок бактерий *Streptococcus mutans*, способных вызывать кариес. В случае лактата цинка необходимы дополнительные исследования при его больших концентрациях, также представляет интерес исследование антимикробной активности лактата цинка в отношении бактерий, продуцирующих летучие соединения серы.

Литература

1. Правосудова Н.А., Мельников В.Л. Микробиология полости рта. Учебно-методическое пособие для студентов медицинских вузов. Пенза, 2013. 89 с.
2. Flemming H.C. Biodeterioration of synthetic materials – A brief review // Materials and Corrosion. 2010. V. 61 (12). P. 986–992.
3. Симонова И.Р., Головин С.Н., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Титова С.В. Методы культивирования и изучения бактериальных биопленок // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2017. № 1. С. 73–79.
4. Голованенко А.Л., Березина Е.С., Алексеева И.В. Цинксоодержащие лекарственные препараты как перспективные средства для профилактики и лечения кариеса // Медицинский альманах. 2023. № 3 (76). С. 113–118.
5. Савилов Е.Д., Маркова Ю.А., Немченко У.М., Носкова О.А., Чемезова Н.Н., Кунгурцева Е.А., Духанина А.В. Способность к биопленкообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара // Тихоокеанский медицинский журнал. 2020. № 1. С. 32–35.

ФОТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНОГО ПОЛИСАХАРИДА ХИТОЗАНА И СУКЦИНАТА ХИТОЗАНА ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ФИЗИЧЕСКОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ТРИПСИНА НА ИХ МАТРИЦЕ

С.М. Панкова^{1,2}, М.Г. Холявка¹, В.А. Королева^{1,2}, М.С. Кондратьев^{1,3}, А.Н. Лукин¹, В.Г. Артюхов¹

¹ Воронежский государственный университет Воронеж, Россия

² Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко Воронеж, Россия

³ Институт биофизики клетки РАН, Пущино Московской области, Россия

Трипсин (КФ 3.4.21.4) – фермент поджелудочной железы, относится к семейству S1 сериновых протеаз, расщепляющих пептидные связи белков, состоит из полипептидной цепи длиной 223 аминокислоты, в активном центре находятся остатки His57 и Ser195. Применение протеаз в свободной (растворимой) форме имеет ряд ограничений, например, их быстрая инактивация за счет процессов протеолиза. В основе стабилизации функциональной активности фермента путем иммобилизации лежит идея сохранения каталитически активной конформации его молекул. Хитозан – полиаминосахарид, получаемый из хитина путем N-деацетилирования. Он биосовместим, нетоксичен, а также биоразлагаем, широко применяется в различных областях биотехнологии. УФ-излучение инициирует свободно-радикальные фотопротекторные процессы в биомолекулах, которые приводят к нарушению структуры и инактивации фермента. В связи с этим целью работы явилось исследование действия УФ-излучения в присутствии фотосенсибилизатора метиленового синего и без него на изменение активности трипсина, свободного и иммобилизованного путем адсорбции на хитозанах различной молекулярной массы и путем включения в гель хитозана и сукцината хитозана.

В качестве объекта исследования был выбран трипсин из поджелудочной железы быка фирмы «MP biomedical», субстратом для гидролиза служил бычий сывороточный альбумин фирмы «Sigma-Aldrich», носителями для иммобилизации – хитозаны, синтезированные ЗАО «Биопрогресс»: <100, 200 и 350 кДа, а также сукцинат хитозана. Иммобилизацию трипсина абсорбционным методом и путем включения в гель осуществляли по методикам, изложенным в статьях [1, 2]. Методика УФ-облучения образцов подробно изложена в работе [2]. УФ-облучение свободного и иммобилизованного трипсина проводили в диапазоне доз 151–6040 Дж/м² в присутствии фотосенсибилизатора – метиленового синего – в трёх концентрациях: 10⁻⁵, 5×10⁻⁵ и 10⁻⁴ моль/л.

Установлено, что УФ-облучение в дозах 3020, 4510 и 6040 Дж/м² приводит к снижению уровня удельной активности свободного трипсина на 28, 32 и 49 % соответственно. Адсорбционная иммобилизация на матрице хитозанов с молекулярными массами 200 и 350 кДа, включение в гель хитозана (<100 кДа) и сукцината хитозана способствуют сохранению активности молекулы трипсина на уровне ~ 90 % и выше. При УФ-облучении в диапазоне доз до 6040 Дж/м² в присутствии фотосенсибилизатора – метиленового синего – в концентрации 10⁻⁴ моль/л активность свободного трипсина снижается на 72 %. После иммобилизации стабильность ферментного комплекса возрастает и активность трипсина, иммобилизованного на матрице хитозанов с молекулярными массами 200 и 300 кДа, при названных условиях сохраняется на уровне порядка 75 %, после включения энзима в гель хитозана (<100 кДа) – до ~ 50 %, сукцината хитозана – до ~ 70 %. Методом молекулярного докинга установлено, что в образовании связей и взаимодействий между молекулой трипсина и матрицами хитозана и сукцината хитозана принимает участие ряд остатков триптофана, тирозина и фенилаланина, а также два цистина, что, вероятно, обеспечивает фотопротекторные свойства названных полисахаридов.

Литература

1. Панкова С.М., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Лукин А.Н., Вышкворкина Ю.М. ИК-спектроскопия в исследовании процессов УФ-модификации иммобилизованного трипсина // Сорбционные и хроматографические процессы. 2019. № 4. Т. 19. С. 489–497.
2. Холявка М.Г., Панкова С.М., Вышкворкина Ю.М., Лукин А.Н., Кондратьев М.С., Артюхов В.Г. Хитозан и сукцинат хитозана как фотопротекторы для иммобилизованного на их матрице папаина // Радиационная биология. Радиоэкология. 2022. № 5. Т. 62. С. 532–542.

ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К СА 15–3

А.К. Могильных, М.А. Малыхина, Л.А. Усикова, О.С. Мокрушина, Е.Б. Шеметова, М.А. Сорокин, И.А. Вторушина, Е.Н. Алексеенко, В.А. Порываева, О.А. Агафонова, М.Ю. Рукавишников

АО «Вектор-Бест, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия

Введение. Опухолевый маркер СА 15–3 (муцин-1, MUC1) используется для мониторинга течения рака молочной железы, контроля эффективности проводимого лечения и раннего выявления рецидивов заболевания. СА 15–3 – это трансмембранный муцин, который имеет различное количество высоко О-гликозилированных tandemных повторов из 20 аминокислот (1).

Цели и задачи. Получение коллекции гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МкАТ) к опухолевому маркеру СА 15–3 с использованием генно-инженерного белка и дальнейший отбор антител для диагностики.

Материалы и методы. Шесть мышей линии BALB/c иммунизировали рекомбинантным белком СА 15–3 (гес СА 15–3), экспрессированным в клетках СНО. ДНК последовательность, кодирующая рекомбинантный белок MUC1, кроме целевой последовательности гена, содержала N-концевой сигнальный пептид для секреции СА 15–3 в средовое пространство и 10-His tag для его эффективной очистки. Был получен пул стабильных клеток-продуцентов. Очистка целевого белка из культуральной среды на смоле Ni-NTA проводилась по стандартному протоколу, молекулярная масса составила около 200 кДа.

Схема иммунизации мышей состояла из трехкратного введения антигена в полном и неполном адьювантах Фрейнда с интервалами 1–2 месяца и дозой 10–15 мкг/мышь, метод введения антигена – внутрибрюшинно или подкожно, общее время иммунизации 5 месяцев. Непрямым твердофазным ИФА сыворотки крови с гес СА 15–3 отобрали двух мышей с высокими титрами АТ. Бустерную дозу (суммарно 770 мкг антигена на мышь) вводили внутрибрюшинно и внутривенно за 1–3 дня до слияния спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышиной миеломы NS-1 с использованием ПЭГ-4000. Культуру после гибридизации вели на селективной среде НАТ. Позитивные гибридомы отбирали в непрямом ИФА по реакции АТ в культуральных супернатантах с гес СА 15–3.

Результаты. В итоге заморожено 279 гибридом с синтезом целевых АТ. Характеристика АТ полученных гибридом включала в себя определение титров методом непрямого ИФА, изотипов набором производства «Bio-Rad», индекса аффинности (ИА) с 6М раствором мочевины. Гибридомы, синтезирующие антитела изотипа IgG1, IgG2a или IgG2b, с высокими ИА и титрами в реакции с гес СА 15–3, клонировали методом лимитирующих разведений. МкАТ отклонированных гибридом нарабатывали в мышах, очищали методом аффинной хроматографии на SpA-сефарозе и синтезировали их конъюгаты с пероксидазой хрена. Пары МкАТ/пероксидазный конъюгат исследованы в качестве компонентов «сэндвич» – варианта ИФА для количественного определения СА 15–3 в сыворотке крови людей. Найдены два МкАТ класса IgG1, позволяющие выявлять СА 15–3 в концентрациях от 0,5 Ед./мл. Данные МкАТ также показали высокую стабильность при хранении.

Выводы. Получена и исследована коллекция гибридом со стабильным синтезом антител к онкомаркеру СА 15–3. Найдены два МкАТ, пригодных для количественного определения содержания СА 15–3 методом «сэндвич» – ИФА.

Литература

1. Chen W., Zhang Z., Zhang S.; Zhu P., Ko J.K. – S., Yung K.K. – L. MUC1: Structure, Function, and Clinic Application in Epithelial Cancers. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 6567.

ОТБОР ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ТЕЙХОВЕВЫХ КИСЛОТ

Н.Г. Сидоров

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Streptococcus pneumoniae – грамположительная условно-патогенная бактерия, которая является возбудителем многих инвазивных заболеваний. Современные методы диагностики не всегда способны обнаружить оптохинрезистентные изоляты или бескапсульные формы пневмококка, которые также играют существенную роль в развитии пневмококковых инфекций [1]. Поиск новых методов для идентификации пневмококка является актуальной задачей. В настоящее время известно о применении иммунохроматографического теста, который использует антитела, специфичные для обнаружения тейхоевых кислот (ТК) *S. pneumoniae* в образцах мочи или цереброспинальной жидкости [2]. Интерес к использованию ТК для идентификации пневмококка остается высоким. При этом для получения ТК необходимо подобрать штамм и оптимальные условия его культивирования. Пневмококк требователен к условиям культивирования, поэтому важно выбрать штамм, способный расти в условиях искусственного выращивания без потери первоначальных биологических свойств, обладающий стабильным ростом и высоким уровнем выхода биомассы.

Цель работы – изучить ростовые свойства ряда штаммов *S. pneumoniae* на полноценных питательных средах с добавлением лецитина и/или глюкозы, и отобрать штамм для выделения ТК.

В ходе исследования использовали штаммы *S. pneumoniae*: № 3391 (K-R), № 3405 (K-4), № 16082 (K-14), № 16010 (K-5), № 16050 (K-9V), полученные из Коллекции микроорганизмов III и IV групп патогенности ЦКП НИИВС им. И.И. Мечникова. Культивирование проводили в сердечно-мозговом бульоне с дополнительным внесением глюкозы и/или лецитина при 37 °C в инкубаторе с 5 % содержанием CO₂, при постоянном перемешивании на шейкере. Процесс осуществляли с постоянным динамическим контролем показателей роста. После получения биомассы штаммов осажденные клетки дезинтегрировали с помощью механического и ультразвукового воздействия. С помощью дифференциального центрифугирования, экстракции раствором 10 % трихлоруксусной кислотой и последующего осаждения спиртом выделяли ТК. Полученные ТК лиофилизировали и идентифицировали с помощью ядерно-магнитной резонансной спектроскопии (ЯМР).

Оценка влияния лецитина и глюкозы на ростовые свойства различных штаммов *S. pneumoniae* показала, что добавление глюкозы оказывало влияние на штамм № 16082 (K-14) и увеличивало выход биомассы на 64 %. Лецитин влиял на штаммы № 3391 (K-R) и № 3405 (K-4), увеличивая выход биомассы на 37,5 % и 10 % соответственно. Добавление лецитина и / или глюкозы не способствовало увеличению выхода биомассы штамма № 16010 (K-5). Совместное добавление этих веществ увеличивало выход биомассы штамма № 16050 (K-9V) на 20 %. Штамм № 16082 (K-14) демонстрировал стабильный рост на протяжении трёх пассажей, при каждом из которых он идентифицировался с высокой степенью достоверности (значение «score value» > 2) при проведении MALDI-TOF масс-спектрометрии. Посредством ЯМР была идентифицирована и подтверждена структура ТК в полученных препаратах. Выход ТК статистически не отличался во всех случаях.

Таким образом, изучены ростовые свойства пяти различных штаммов *S. pneumoniae* в условиях добавления глюкозы и/или лецитина. Отобран наиболее продуктивный вариант и выделены препараты ТК для получения антисывороток с целью проведения дальнейшей иммунохимической характеристики.

Литература

1. Jia J. et al. Identification and molecular epidemiology of routinely determined *Streptococcus pneumoniae* with negative Quellung reaction results // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2022. Vol. 36(4). Article 24293. doi: 10.1002/jcla.24293.
2. Song JY, Eun BW, Nahm MH. Diagnosis of pneumococcal pneumonia: current pitfalls and the way forward // *Infect Chemother*. 2013. Vol. 45(4). P. 351–66. doi: 10.3947/ic.2013.45.4.351.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ МИКРОБНЫХ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ ДЛЯ БЫСТРОЙ ОЦЕНКИ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА (БПК)

А.С. Медведева

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Область создания наноматериалов в настоящее время быстро развивается из-за их эффективного применения в нанoeлектронике [1], катализе, при создании биоматериалов [2] и биосенсоров. По химической структуре наноматериалы принято делить на органические и неорганические. Неорганические наноматериалы включают металлы и их оксиды, фуллерены, углеродные нанотрубки (УНТ), графен и оксид графена, каликсарены являются органическими наноматериалами [3]. Неорганические наноматериалы характеризуются относительно простым синтезом; они катализируют некоторые электрохимические реакции [4], и участвуют в ускорении переноса электронов. Органические наноматериалы характеризуются свойствами, которые способствуют усилению электрохимического сигнала и обеспечивают высокую степень биосовместимости. Оба типа наноматериалов очень перспективны для разработки электрохимических сенсоров и биосенсоров [5].

В работе предложен новый способ формирования биосенсора на основе наноструктурированного медного электрода и микроорганизмов для экспресс-оценки индекса биохимического потребления кислорода (БПК).

Электрохимические характеристики редокс-соединений изучали, методами циклической вольтамперометрии. Анализ зависимостей предельных токов от скорости сканирования позволил провести расчет константы скорости гетерогенного переноса электронов для водорастворимых и нерастворимых редокс-соединений на основании констант были сформированы одномедиаторные и двухмедиаторные биоэлектрохимические системы. В ходе исследования показано, что дрожжи *Debaryomyces hansenii* не подвержены токсичному действию меди и могут быть эффективно использованы с наноструктурированным электродом в двухмедиаторной системе «ферроцен-метиленовый синий». Бактерии *Parasoccus uuei* подвержены токсичному воздействию ионов меди при иммобилизации на наноструктурированном электроде, поэтому для их иммобилизации использован редокс-активный полимер поли (нейтральный красный), защищающий микроорганизмы от негативного влияния и позволяющий добиться эффективного сопряжения микроорганизмов с электродом.

Разработанные биоэлектрохимические измерительные системы обладают высокой чувствительностью (нижний предел определяемых значений БПК₅ – 2,0 мг/дм³) и хорошей корреляцией со стандартным методом анализа БПК на пробах поверхностных вод ($R^2 > 0,98$). Таким образом, созданные биосенсорные системы могут служить прототипами коммерчески выпускаемых миниатюрных датчиков для анализа воды.

***Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-13-20021,
<https://rscf.ru/project/23-13-20021> и поддержки правительства Тульской области.***

Литература

1. Xiangming Xu, Tianchao Guo, Mario Lanza, Husam N. Alshareef, Status and prospects of MXene-based anoelectronic devices, *Matter*, Volume 6, Issue 3, 2023, Pages 800–837, ISSN 2590–2385.
2. G. Jamuna, S. Yasodha, P. Thamarai, A.S. Vickram, Pavithra Swaminaathan, A. Saravanan, P.R. Yaashikaa Design strategies, utilization and applications of nano-engineered biomaterials for the enhancement of bioenergy: A sustainable approach, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 200, 2023, 109104.
3. G. Maduraiveeran and W. Jin, Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications // *Trends in Environmental Analytical Chemistry* (2017), 13, 10–23.
4. M.M. Alam, M.A. Rashed, M.M. Rahman, M.M. Rahman, Y. Nagao and M.A. Hasnat. Electrochemical oxidation of As(III) on Pd immobilized Pt surface: kinetics and sensing performance // *RSC Adv.*, 2018, 8, 8071–8079.
5. V. Wang, K. Qu, L. Tang, Z. Li, E. Moore, X. Zeng, Y. Liu and J. Li. Nanomaterials in carbohydrate biosensors // *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2014, 58, 54–70.

ОРМОСИЛ – ФЕРМЕНТНЫЙ МАТЕРИАЛ В КАЧЕСТВЕ МОДИФИКАТОРА ПОВЕРХНОСТИ БИОСЕНСОРА ДЛЯ АНАЛИЗА ГЛЮКОЗЫ В ОБЛАСТИ ХИМИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

Л.С. Кузнецова, В.А. Арлянов

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Аналитические устройства, потенциально имеющие возможность применения в нескольких сферах, являются интересным направлением научных разработок, поскольку являются функциональными и могут решать сразу несколько практических задач.

В функционировании таких устройств особую роль играют материалы, используемые для их создания. В зависимости от сферы применения аналитического устройства помимо основных требований к проводимости материала предъявляются дополнительные, например, биосовместимость и низкая степень набухания. В данном исследовании на примере модельного анализа глюкозы был исследован ряд материалов для формирования биосенсора, способного к определению глюкозы в сфере химии, биотехнологии и медицины.

Для формирования аналитических устройств использовались графитовые печатные электроды. Имобилизация фермента проводилась в редокс-активные полимеры, являющиеся интересным и перспективным материалом для модификации поверхности электродов [1].

В качестве электроактивных соединений редокс-активных полимеров исследовали ряд соединений феназиновго типа. Формирование редокс-активных полимеров проводили путем ковалентного связывания электроактивных соединений с непроводящей подложкой на основе кремнийорганической матрицы.

Подтверждение структуры образовавшихся полимеров проведено методами инфракрасной спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса. С применением подхода, основанного на методах циклической вольтамперометрии, импедансной спектроскопии и компьютерного моделирования структуры установлено наиболее оптимальное соотношение кремнийорганических предшественников тетраэтоксисилана и (3-аминопропил) триэтоксисилана в структуре редокс-активного полимера (80:20 об.%), выбран медиатор электронного транспорта (нейтральный красный) и определено, что расстояние между редокс-активными центрами недостаточно для эффективного переноса и требует наличия вспомогательных компонентов (углеродных нанотрубок).

Биосенсор, модифицированный выбранным материалом, характеризуется диапазоном определяемых концентраций $0,01\text{--}0,92\text{ нА}\times\text{дм}^3/\text{ммоль}$, чувствительностью $(440 \pm 20\text{ нА}\times\text{дм}^3/\text{ммоль})$, пределом обнаружения $0,003\text{ ммоль}/\text{дм}^3$. Созданный на основе выбранного полимера биосенсор применен для анализа глюкозы в области химии, биотехнологии и медицины с высокой корреляцией результатов по сравнению с референтными методами. Материал, используемый для формирования биосенсора, является нетоксичным и обладает низкой степенью набухания, что позволяет использовать для анализа глюкозы в конструкции систем непрерывного мониторинга.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания по теме «Химическая, биологическая и наноструктурная модификация функциональных материалов, как стратегия борьбы, исследования свойств и подходов к практическому применению микробных биопленок» (FEWG-2024–0004).

Литература

1. Estrada-Osorio D.V. et al. Poly-L-lysine-modified with ferrocene to obtain a redox polymer for mediated glucose biosensor application // Bioelectrochemistry. – 2022. – Т. 146. – С. 108147.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ – ОСНОВА ПОЛУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И МЕДИЦИНЫ

В.В. Ревин, Е.В. Лияськина, М.В. Парчайкина, Н.Б. Назарова, А.В. Заварыкина

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

Интерес к бактериальным экзополисахаридам значительно возрос в последние годы, поскольку они являются кандидатами для широкого применения в различных областях медицины, техники и промышленности, включая пищевую промышленность, нефтепереработку, фармацевтику, регенеративную медицину и т. д. [1–4]. На кафедре биотехнологии, биохимии и биоинженерии Национального исследовательского Мордовского государственного университета в течение длительного времени проводятся исследования в области получения бактериальных экзополисахаридов и биокомпозиционных материалов на их основе. В результате исследований из природных источников были выделены новые высокопродуктивные штаммы. Так, впервые из осиных сот выделен новый штамм *Paenibacillus polymyxa* В-3504Д, образующий большее количество полисахарида левана по сравнению с известными в мире штаммами данного вида (до 68 г/л) [5]. Из симбиотических сообществ «Чайный гриб» и "Индийский рис" были выделены новые продуценты бактериальной целлюлозы *K. sucrofermentans* В-11267 и *K. hansenii* В-12950 [6]. Получены высокопродуктивные штаммы бактерий рода *Xanthomonas*, образующие до 28 г/л полисахарида ксантана [7]. Проведен полногеномный анализ полученных штаммов, изучены их культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства. Исследована структура и свойства синтезируемых бактериями биополимеров. Продемонстрирована возможность высокоэффективного производства полисахаридов с использованием полученных штаммов и таких отходов пищевых производств как меласса, барда и молочная сыворотка [8]. На основе полученных полисахаридов созданы функциональные материалы широкого спектра применения. Так разработаны биокомпозиционные материалы медицинского назначения с антибактериальными, гемостатическими и регенерационными свойствами на основе бактериальной целлюлозы в форме пленок, гидрогелей и аэрогелей [9–11]. Также получены новые материалы на основе бактериальной целлюлозы, имеющие трубчатую структуру, с перспективой использования в регенеративной медицине. Изготовлен биокомпозиционный материал с высокой сорбционной способностью по отношению к ионам фтора (80,1 мг/г) на основе бактериальной целлюлозы, модифицированной нанослоем оксида алюминия [12]. Разработаны новые материалы на основе аэрогелей бактериальной целлюлозы, обладающие сверхнизкой плотностью, теплопроводностью, высокими шумопоглощающими и сорбционными свойствами [11, 13]. Изучены структура, физико-химические и физико-механические свойства полученных материалов методами ИК-, ЯМР-спектроскопии, сканирующей электронной микроскопии, рентгено-структурного и термогравиметрического анализа и т. д. Результаты исследований подтверждают высокий потенциал функциональных материалов на основе бактериальных экзополисахаридов для биомедицины и различных отраслей промышленности.

**Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации, грант № ФЗРС-2024-0005.**

Литература

1. Ревин В.В., Лияськина Е.В. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов: учеб. пособие. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2019. 192 с.
2. Revin V.V., Liyaskina E.V., Parchaykina M.V., Kuzmenko T.P., Kurgaeva I.V., Revin V.D., Ullah M.W. Bacterial Cellulose-Based Polymer Nanocomposites: A Review // *Polymers*. 2022. Vol. 14. P. 4670.
3. Netrusov A.I., Liyaskina E.V., Kurgaeva I.V., Liyaskina A.U., Yang G., Revin V.V. Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11. P. 1541.
4. Revin V.V., Liyaskina E.V., Parchaykina M.V., Kurgaeva I.V., Efremova K.V., Novokuptsev N.V. Production of Bacterial Exopolysaccharides: Xanthan and Bacterial Cellulose // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24. P. 14608.
5. Liyaskina E.V., Rakova N.A., Kitykina A.A., Rusyaeva V.V., Toukach P.V., Fomenkov A., Vainauskas S., Roberts R.J., Revin V.V. Production and characterization of the exopolysaccharide from strain *Paenibacillus polymyxa* 2020 // *PLoS ONE*. 2021. Vol. 16. e0253482.

6. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Сапунова Н.Б., Богатырева А.О. Выделение и характеристика штаммов – продуцентов бактериальной целлюлозы // Микробиология. 2020. Том 89, № 1. С. 88–98.
7. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Покидько Б.В., Пименов Н.В., Марданов А.В., Равин Н.В. Характеристика нового штамма *Xanthomonas campestris* М 28 – продуцента ксантана, исследование генома, условий культивирования и физико-химических и реологических свойств полисахарида // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57, № 3. С. 251–261.
8. Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products // Braz. J. Microbiol. 2018. Vol. 49. P. 151–159.
9. Revin V.V., Liyaskina E.V., Bogatyreva A.O., Nazarova N.B., Upyrkina E.S., Kurgaeva I.V., Vasilov R.G. Bacterial cellulose based nanocomposites // Nanobiotechnology Reports. 2023. Vol. 18. № 1. P. 56–63.
10. Revin V.V., Parchaykina M.V., Upyrkina K.S., Liyaskina E.V., Kurgaeva I.V., Gruntyushkin I.P., Novozhilova O.S., Tairova M.R., Devyatkin A.A. Effect of Biocomposites on Bacterial Cellulose-Based Hydrogel and Physiologically Active Compounds on Regeneration Processes in the Skin's Lipid Phase After Burn Injury // Opera Medica et Physiologica. 2022. № 4. P. 72–91.
11. Production of Bacterial Cellulose Aerogels With Improved Physico-Mechanical Properties and Antibacterial Effect // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 8. P. 603407.
12. Revin V.V., Dolganov A.V., Liyaskina E.V., Nazarova N.B., Balandina A.V., Devyataeva A.A., Revin V.D. Characterizing Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter sucrofermentans* H-110 on Molasses Medium and Obtaining a Biocomposite Based on It for the Adsorption of Fluoride // Polymers. 2021. Vol.13. P. 1422.
13. Revin V.V., Pestov N.A., Shchankin M.V., Mishkin V.P., Platonov V.I., Uglanov D.A. Study of the Physical and Mechanical Properties of Aerogels Obtained from Bacterial Cellulose // Biomacromolecules. 2019. Vol. 20 (3). P. 1401–1411.

УДК 632.93

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-1-59-62>

НЕЙРОТОКСИНЫ ИЗ ЯДА ОСЫ-НАЕЗДНИКА *HABROBRACON HEBETOR* И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В СОЗДАНИИ НОВЫХ БИОПЕСТИЦИДОВ

А.Г. Шухалова, С.А. Тимофеев, И.В. Сендерский, В.В. Долгих,

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

Эктопаразитоид личинок чешуекрылых насекомых – оса наездник *Habrobracon hebetor* может быть использована как средство биологической борьбы с вредителями, особенно с южной амбарной огнёвкой *Plodia interpunctella* – опасным вредителем хранилищ зерна и других сухих продуктов. Самки *H. hebetor* находят гусениц чешуекрылых и вводит в их гемолимфу яд, содержащий набор нейропаралитических токсинов, что приводит к парализации жертв. После этого паразитоид откладывает на парализованное насекомое яйца, из которых выходят личинки, питающиеся гемолимфой хозяина вплоть до окукливания, а парализованная гусеница погибает [6]. Однако использование этих насекомых в борьбе с вредителями ограничено. Взрослые особи *H. hebetor* впадают в диапаузу, индуцированную фотопериодом, и не устойчивы к холодной температуре [3]. Поэтому было предложено использовать в биологической защите растений яды ос наездников и их компоненты без участия самих насекомых.

Еще в конце прошлого века из яда *H. hebetor* были выделены 2 нейротоксина, с молекулярной массой 30 кДа (Т30) и 16 кДа (Т16), которые обладали высокой способностью парализовать личинки чешуекрылых. Токсины из яда осы выделяли из целых ос или рассеченных ядовитых желез. Эти структуры гомогенизировали и обрабатывали ультразвуком для растворения биологически активных токсинов. Затем гомогенат центрифугировали из супернатанта выделяли токсины с различной молекулярной массой с помощью аффинной хроматографии с красителем и лигандом, в том числе так были выделены токсины. Небольшое количество высокоочищенной фракции токсина вводилось путем инъекции в брюшную полость личинок табачной совки, что приводило к парализации насекомых. Аминокислотные последовательности и кДНК токсина впоследствии были определены с помощью масс спектрометрии и запатентованы [4, 5]. Однако недавно истек срок действия авторских прав на эти патенты, поэтому данные про токсины Т16 и Т30 стали доступны для свободного использования.

Так как данные нейротоксины поражают нервную ткань и функционируют в гемолимфе жертвы, то оральный способ доставки биопестицидов на их основе невозможен. Для доставки таких токсинов к вредителям могут использоваться различные биологические агенты, например вирусы. Вирусные биопестициды обладают специфичной вирулентностью по отношению к целевым насекомым, при этом они безопасны для теплокровных животных, рыб, птиц и других полезных организмов. Они быстро разлагаются в природе, что делает их более экологически безопасными по сравнению с химическими пестицидами. Наиболее известные и часто используемые вирусы – это бакуловирусы (*Baculoviridae*) из семейства палочковидных. Они заражают преимущественно чешуекрылых и безвредны для

человека [1]. Главным недостатком вирусных препаратов является то, что дикий штамм может иметь относительно не высокую малую вирулентность и вызывать смерть насекомых вредителей лишь через длительный отрезок времени после заражения. Одним из способов решения этой проблемы является генетическая модификация вируса.

За последние три десятилетия были разработаны различные методики по генетической модификации бакуловируса [2].

1. Классический метод

Традиционный подход заключается в котрансфекции клеток насекомых бакуловирусным геномом и специальной плазмидой переносчиком, которая несёт интересные гены. Однако низкая частота рекомбинации в диапазоне от 0,1 % до 1 % приводит к колоссальному содержанию нерекомбинантного вируса дикого типа. Это усложняет процесс выделения и очистки, поскольку требует выполнения множества этапов отбора клонов, что занимает много времени.

2. Линеаризация вируса

Для снижения репродуктивной способности материнского вируса было выполнено линеаризование бакуловирусного генома в специфическом сайте рестрикции (Bsu36I), расположенном в гене *polh*, ответственном за синтез основного белка полиэдрина. Данный ген также содержит сильный промотор бакуловируса для эффективной экспрессии в клетках насекомых. Поскольку линейный геном не способен самостоятельно реплицироваться (неинфекционный), то образуются только те геномы, которые при рекомбинации с вектором-переносчиком образуют кольцевую структуру. В результате данной модификации система может обеспечить частоту рекомбинации в пределах 30 %, но вероятность выделения вируса дикого типа все еще присутствует.

3. Система Bac-to-Bac

Еще один наиболее широко используемый метод сайт-специфической транспозиции в бакмиду, содержащую бакуловирусный геном. Эта технология доступна под названием Bac-to-Bac (Invitrogen). Процесс создания рекомбинантных бакуловирусов заключается в транспозиции интересующую нуклеотидную последовательность в вектор переносчик, который в будущем клонируется в штамм бактерий *Escherichia coli* DH10Bac. Этот штамм *E. coli* содержит вспомогательную плазмиду-бакмиду, которая кодирует образование вирусных частиц. При трансформации происходит сайт-специфическая рекомбинация и образуется рекомбинантный бакуловирусный геном. Отбор осуществляется при помощи метода бело-голубой селекции. Полученной бакмидой трансфицируют клеточную культуру, в которой реплицируется и нарабатывается рекомбинантный бакуловирус.

4. Система Flasf BAC

На основе системы Bac-to-Bac компанией Oxford Expression Technologies был разработан другой метод под названием Flasf BAC. Он также включает в себя использование бакмиды, однако в ней частично удалены некоторые гены. Сама гомологичная рекомбинация с вектором переносчиком проходит не в бактериях, а в клетках насекомых. Метод Flash BAC увеличивает выход целевых белков. А в сочетании с системой MultiBac (Geneva Biotech) можно экспрессировать множество пептидов. Эта система позволяет вставлять чужеродные гены в два разных локуса сконструированного генома бакуловируса.

В нашем исследовании мы привели пример использования бакуловирусов для защиты растений, его генетической модификации и экспрессии нейротоксинов осы-наездника *Habrobracon hebetor*. На основе опубликованной информации о 2 токсинах с молекулярной массой 30 кДа (T30) и 16 кДа (T16) их аминокислотная последовательность была модифицирована, были добавлены сайты рестрикции, а также последовательность, кодирующая сигнальный пептид, отвечавший за секрецию данного белка. Если встроить последовательность нейротоксинов в геном вирусов так, чтобы заражаемые ими клетки насекомых продуцировали активный токсин и секретировали его в гемолимфу – также будет происходить парализация вредителей, что может значительно увеличить негативный эффект на их популяцию, по сравнению с заражением не модифицированным бакуловирусом.

В рамках этой работы мы провели первый этап тестирования нейротоксинов, используя модельную систему бакуловирусной экспрессии Bac-to-Bac в культуре клеток насекомых. Клетки насекомых способны распознавать и обрабатывать сигнальные пептиды, поддерживать олигомеризацию и осуществлять посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и образование дисульфидной связи, что позволяет правильное формирование аутентичных эукариотических белков, в отличие от прокариотических систем экспрессии. Так как в

этом случае клеточная культура заражается рекомбинантным бакуловирусом, несущим изучаемый ген так же, как это происходит и при заражении клеток вредителей, то появляется возможность определить, будет ли данная молекула продуцироваться клетками насекомых в активной растворимой форме и далее секретироваться во внешнюю среду. Это необходимо для ее воздействия на нервную систему вредителя.

Для достижения результата модифицированная последовательность T30 и T16 была синтезирована *de novo* в компании Евроген (Россия) в составе плазмиды для бакуловирусной экспрессии pFastBac™ Dual. Для синтеза белка в бактериях и получения к нему антител последовательность T30 выделяли из исходного вектора рестрикцией и клонировали с использованием штамма *E. coli* XL-BLUE MRF в составе плазмиды pRSET A. Данный вектор предназначен для высокоэффективной экспрессии белков в бактериях под контролем промотора Pt7 бактериофага T7. Индукция экспрессии в данной системе происходит изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ).

Экспрессию производили в бактериях *E. coli* штамм C41 (производный из BL21(DE3)). Первоначально экспрессию проводили по стандартному протоколу, в вентилируемых конических колбах (аэробные условия), 15 часов при 37 °C, с добавлением индуктора экспрессии до 1 mM (конечная концентрация). После культивации клетки бактерий разрушали ультразвуком, центрифугированием отделяли растворимую и не растворимую белковые фракции, подвергали их электрофорезу в полиакриламидном геле и анализировали на наличие синтезированного белка с помощью иммуноблотинга с применением антител к полигистидиновой последовательности, которая пришивается к любому продукту, синтезированному с помощью вектора pRSET A. Эксперимент показал накопление искомой молекулы T16 токсина в клетках бактерий в не растворимой форме, однако уровень экспрессии T30 был относительно не высоким и значительную часть белковой фракции составляли примеси других бактериальных белков. Для оптимизации экспрессии были опробованы другие условия культивации бактерий, и наилучшего результата для нейротоксина T30 удалось добиться при экспрессии в невентилируемых конических пробирках (анаэробные условия) при комнатной температуре. Так как не значительный уровень бактериальных примесей не является препятствием для иммунизации животных, полученный препарат был использован для этого без дополнительной очистки. Не растворимую белковую фракцию после экспрессии тщательно отмывали, денатурацию и растворение проводили с помощью 1 % раствора додецилсульфата натрия (SDS). Избыток SDS удаляли из пробы с помощью диализа и измеряли концентрацию белка спектрофотометрическим методом Бредфорда. Мышей иммунизировали 4 раза внутрибрюшными инъекциями по 100 мкг белка с интервалом 10 дней, отбирая кровь спустя 10 дней после последней иммунизации. Для последующих экспериментов использовали иммунную сыворотку крови, содержащую полученные антитела.

Для получения рекомбинантного бакуловируса была проведена химическая трансформация клеток DH10Bac и вектора pFastBac™ Dual. Нуклеотидная последовательность этого штамма называется бакмидой, так как включает в себя не только элементы бактериальной плазмиды ДНК, но и геном вируса ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcNPV). Встраивание фрагмента донорной плазмиды в сайт интеграции бакмиды нарушает рамку считывания гена lacZ. В результате бактерии, несущие рекомбинантные (со вставкой) бакмиды, образуют белые колонии в присутствии IPTG и X-Gal. В наличии вставки клонированного гена после всех этих этапов можно убедиться при помощи ПЦР. Рекомбинантную бакмиду, содержащую ген токсинов нарабатывали в больших количествах и выделяли из клеток бактерий. Трансфекцию клеточной культуры Sf9 проводили с помощью реагента Cellfectin. В результате происходило встраивание генома рекомбинантного вируса с геном T16 или T30 из бакмиды в геном зараженных клеток, в которых за счет этого происходила экспрессия вирусных генов, включая встроенный токсин, и образовывались вирусные частицы.

Зараженную клеточную культуру выращивали в течение недели, используя наработанные вирусные частицы для заражения новых клеток. Было проведено 4 пассажа, что позволило получить большое количество вирусных частиц. После последнего пассажа экспрессия T16 и T30 проходила в клетках Sf9 в течение 2 или 4 дней после финального заражения с последующим анализом накопления токсина как в клетках, так и в культуральной среде с использованием полученных ранее антител. Для этого клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием, разрушали ультразвуком, вновь разделяли центрифугированием не растворимые белки в осадке от растворимых в супернатанте. Иммуноблотинг

продемонстрировал, что уже на 2 сутки экспрессии большая часть Т30 обнаруживалась в нерастворимой части гомогената клеток насекомых, белок обнаруживался также в растворимой (активной) форме и секретировался клетками в культуральную среду, а на 4 сутки количество белка в культуральной среде значительно возрастало. Однако токсин Т16 на 2 сутки не был обнаружен, а на 4 день находился только в нерастворимом осадке.

Таким образом, мы продемонстрировали, что нейротоксин Т30 будет более перспективным по сравнению с Т16. При заражении клеток насекомых рекомбинантным вирусом с геном Т30, данный токсин может эффективно синтезироваться в активной форме и секретироваться во внешнюю среду. При заражении непосредственно вредителей, а не клеточных культур, это приведет к попаданию нейротоксина в гемолимфу насекомого, где белок сможет воздействовать на его нервную систему, что делает данную молекулу перспективной для создания биопестицидов на основе рекомбинантных бакуловирусов.

На данный момент проводятся биотесты по заражению гусениц Пчелиной огневки (*Galleria mellonella*) для определения эффективности рекомбинантных бакуловирусов, как инсектицида. Заражение осуществляется с помощью инъекций шприцем Гамильтона. В качестве контроля используется вирус, секретирующий светящийся белок GFP. Оценка экспрессии в клетках насекомого будет осуществляться такими методами, как электрофорез и ПЦР в реальном времени.

Работа выполнена при поддержке РНФ, грант 23–26–00039.

Литература

1. Хасанов Ш.Ш., Сасмаков С.А., Абдурахманов Ж.М., Азимова Ш.С. Бакуловирусовая система экспрессии, как безопасная и эффективная система для получения рекомбинантных белков: «Universum: химия и биология», 2019. С. 13.
2. Fabre ML, Arrias PN, Masson T, Pidre ML, Romanowski V. Baculovirus-Derived Vectors for Immunization and Therapeutic Applications. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*. 2020;197–224. doi: 10.1016/B978-0-12-814966-9.00011-1.
3. Huang Y., Liu W., Lü J., Wang W., Guo Y. Temperature Effect on the Growth and Development of *Habrobracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) Reared on *Ephestia elutella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. *Insects*. 2024 May 7; 15(5):336. doi: 10.3390/insects15050336. PMID: 38786892; PMCID: PMC11122503.
4. Johnson J.H., Kral R.M., Krapcho K. Insecticidal toxins from bracon hebetor. Patent WO1996025429 WIPO (PCT). 1996.
5. Johnson J.H., Kral R.M., Krapcho K. Insecticidal toxins from Bracon hebetor nucleic acid encoding said toxin and methods of use. Patent US5874298 United States. 1999.
6. Mbata G.N., Warsi S. *Habrobracon hebetor* and *Pteromalus cerealellae* as Tools in Post-Harvest Integrated Pest Management. *Insects*. 2019 Mar 27; 10(4):85. doi: 10.3390/insects10040085.

СОСТАВ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ МЕТАБОЛИТОВ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *B. SUBTILIS* 3Н

С.А. Лазарев, Н.А. Михайлова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Введение. Бактерии *B. subtilis* известны широким спектром антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. При изучении пробиотических свойств метаболитов штамма *B. subtilis* 3Н установлено, что противомикробная активность проявлялась во фракции с молекулярной массой <5 кДа [1]. Представляло интерес идентифицировать вещества, обуславливающие данную функцию.

Цель работы – исследовать состав низкомолекулярной фракции метаболитов *B. subtilis* 3Н.

Материалы и методы. В работе использовали штамм *B. subtilis* 3Н из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Для получения метаболитов проводили глубинное периодическое культивирование. Полученную биомассу отделяли центрифугированием с последующей микрофильтрацией супернатантов [1]. Для проведения эксперимента готовили опытные пробы, содержащие метаболиты *B. subtilis*, полученные в разные периоды культивирования (8; 24; 30; 48 ч). В качестве контроля использовали стерильную питательную среду. ВЭЖХ-МС анализ проводился на квадрупольно-времетраплетном масс-спектрометре высокого разрешения Bruker Impact Пс ионизациятq электрораспылением на обращённо-фазовой колонке Waters Acquity HSS T3 1,8 мкм 2,1 × 100 мм с автоматической регистрацией спектров фрагментации.

Результаты. При помощи ВЭЖХ-МС анализа в составе низкомолекулярной фракции метаболитов *B. subtilis* 3Н выявлено более 300 соединений. Наибольший интерес вызывали 23 вещества, которые отсутствовали в контроле и накапливались в культуральной жидкости в процессе выращивания штамма. Из них удалось идентифицировать 11, включая 2 антибиотика (*Mycinamicin VI* и *Laurenobiolide*). *Mycinamicin VI*, макролидный антибиотик с молекулярной массой 667,3932 Да, действующий в отношении грамположительных бактерий [2], отсутствовал на 8 ч. роста культуры, проявлялся на 24 ч. и накапливался до 30 ч. выращивания, о чем свидетельствовала интегральная интенсивность сигнала 15135 ед. и 39685 ед., соответственно. *Laurenobiolide*, антибиотик, с молекулярной массой 290,1518 Да, активный в отношении *S. aureus* [3], постепенно накапливался до завершения культивирования. Интегральная интенсивность сигнала соответствовала 238 ед. для 8 ч., 3428 ед. для 24 ч., 8722 ед. для 30 ч., 15131 ед. для 48 ч.

Заключение. Таким образом, в результате проведенного эксперимента установлено, что пробиотический штамм *B. subtilis* 3Н в процессе роста продуцирует 23 низкомолекулярных соединений, из которых удалось идентифицировать 2 антибиотика – *Mycinamicin VI* и *Laurenobiolide*. Полученные данные открывают перспективу дальнейшего изучения противомикробных метаболитов, способов их выделения и очистки.

Литература

1. Лазарев С. А, Михайлова Н.А. Противомикробные и ферментативные свойства метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* 3Н и *Bacillus subtilis* 1719. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2023, 4:29–33. DOI: 10.14427/jipai.2023.4.29
2. Späth G, Fürstner A. Total Synthesis of Mycinamicin IV as Integral Part of a Collective Approach to Macrolide Antibiotics. Chemistry. 2022 Feb 19; 28(11):e202104400. DOI: 10.1002/chem.202104400.
3. Kirk RD, Rosario ME, Oblie N et al. Screening the PRISM Library against *Staphylococcus aureus* Reveals a Sesquiterpene Lactone from *Liriodendron tulipifera* with Inhibitory Activity. ACS Omega. 2022 Sep 30; 7(40):35677–35685. DOI: 10.1021/acsomega.2c03539.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕФЕНСИНА ТАБАКА NaD1 С КОНВЕНЦИАЛЬНЫМИ АНТИМИКОТИКАМИ И ЭНДОГЕННЫМИ АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ

О.В. Шевченко^{1,2}, С.И. Фатеева^{2,3}, С.В. Баландин², Т.В. Овчинникова^{1,2,3}, Е.И. Финкина²

¹ Московский физико-технический институт, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Candida albicans является частой причиной развития грибковых заболеваний у человека. В норме этот дрожжеподобный грибок является частью микробиома человека. Однако снижение иммунитета может привести к неконтролируемому росту гриба, формированию устойчивых биопленок и развитию местного или опасного для жизни системного кандидоза. Ввиду распространенности резистентных штаммов грибов рода *Candida* и ограниченности списка применяемых препаратов растет потребность в поиске новых антимикотиков, прототипами которых могут быть растительные дефенсины. Представляется актуальным поиск эффективных комбинаций растительных дефенсинов не только с конвенциональными антимикотиками, но и с эндогенными антимикробными пептидами (АМП), имеющими иной механизм противогрибкового действия. Объектом нашего исследования являлся дефенсин табака NaD1, обладающий противогрибковой активностью в микромолярных концентрациях. Основной мишенью его действия является компонент клеточной мембраны грибов фосфатидилинозитол – 4,5-бисфосфат (PI(4,5) P2). Однако NaD1 взаимодействует также с β -глюканом клеточной стенки грибов, а, проникая внутрь грибной клетки, вызывает окислительный стресс.

В экспериментах использовались коллекционные штаммы *C. albicans* ATCC 18804 и ATCC 10231, а также клинические изоляты 1.1, 8.2, 9.1 и 14.1, выделенные от пациентов с ВИЧ-инфекцией. *C. albicans* ATCC 10231, а также все использованные клинические изоляты характеризовались пониженной чувствительностью к производным триазолов. Рекомбинантный NaD1 был получен путем гетерологичной экспрессии в клетках *Escherichia coli* по разработанной ранее схеме. На первом этапе исследование проводили методом «шахматной доски», используя антимикотики трех групп: полиены (амфотерицин В); производные триазола (вориконазол); эхинокандины (каспофунгин, анидулафунгин и микафунгин). Для оценки типа совместного действия веществ рассчитывали индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК). NaD1 и амфотерицин В, связывающий эргостерол клеточной мембраны грибов, в комбинации действовали независимо ($1 < \text{иФИК} \leq 2$). В смеси NaD1 с вориконазолом, ингибирующим биосинтез эргостерола, наблюдалось аддитивное действие веществ ($0,5 < \text{иФИК} \leq 1$). В комбинации NaD1 с каспофунгином, который ингибирует биосинтез β -глюканов клеточной стенки грибов, наблюдалось аддитивное или синергическое действие веществ ($\text{иФИК} \leq 0,5$) в случае различных штаммов гриба. Иная картина наблюдалась для анидулафунгина и микафунгина, имеющих тот же механизм действия, но отличающихся по химическому строению от каспофунгина. Комбинации дефенсина с анидулафунгином характеризовались аддитивным действием. NaD1 и микафунгин в комбинации действовали независимо друг от друга.

На втором этапе работы исследовались комбинации NaD1 с эндогенными АМП человека – дефенсином HBD2 и кателицидином LL-37, которые синтезируются различными клетками, обладают антикандидозной активностью и характеризуются преимущественно мембранотропным действием. HBD2, также как и NaD1, обладает сродством к PI(4,5) P2. LL-37 взаимодействует не только с клеточной мембраной грибов, но и с ферментом, участвующим в биосинтезе β -глюкана. Рекомбинантные HBD2 и LL-37 были получены схожим с NaD1 биотехнологическим способом. Интересно, что комбинации NaD1 с обоими эндогенными пептидами, как с HBD2, так и с LL-37, в зависимости от штамма *C. albicans* характеризовались аддитивным или синергическим действием.

Таким образом, нами были выявлены комбинации дефенсина табака NaD1 с конвенциональными антимикотиками и эндогенными пептидами, способные эффективно подавлять рост чувствительных и резистентных штаммов *C. albicans*.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00482).

БИОТЕХНОЛОГИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ**О.В. Бондарева, Г.П. Шуваева, О.С. Корнеева***Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

В настоящее время молочная кислота является промышленно важным продуктом с большим и быстро расширяющимся рынком потребления. По данным DISCOVERY Research Group, объем рынка молочной кислоты в России в 2023 г. составил порядка 7 млрд тонн, а лидером на отечественном рынке стал китайский производитель HENAN JINDAN LACTIC ACID CO LTD, доля которого на рынке составила 49,8 %. Большая часть молочной кислоты в настоящее время осуществляется микробиологическим методом, суть которого основана на способности молочнокислых бактерий сбраживать сахаросодержащие субстраты с образованием молочной кислоты. Данный процесс является актуальным на сегодняшний день, так как позволяет не только обеспечивать рынок ценным продуктом, но и значительно снижать его себестоимость.

Спрос на молочную кислоту растет главным образом в пищевой промышленности, где добавка используется как консервант, регулятор кислотности, в качестве буферной субстанции и для придания кислого привкуса, улучшения вкуса, запаха и структуры продуктов, улучшение микробиологического качества при производстве широкого ассортимента продукции. В последнее десятилетие отмечаются высокие темпы развития молочной промышленности в РФ, также увеличиваются объемы отходов молочной промышленности. Объем основного отхода – молочной сыворотки в 2023 году составляет порядка 6,5 млн т в год. Согласно данным объединения «Союзмолоко», в России с каждым годом увеличиваются объемы производства творога (до 900 тыс. т в год), и, соответственно, увеличивается объем творожной сыворотки. Промышленная переработка её, в настоящее время, осуществляется для получения лактозы, молочной сыворотки, концентратов молочной сыворотки [1].

Наиболее актуален и экономически выгоден способ переработки молочной сыворотки в молочную кислоту, спрос на которую растет из года в год в среднем на 4,2 %. В связи с чем, актуальным на сегодняшний день является разработка биотехнологии получения молочной кислоты, внедрение которой не только снизит долю импорта молочной кислоты, но и существенно уменьшит нагрузку на окружающую среду [2].

Суть данного способа получения молочной кислоты основывается на процессе культивирования *Lactobacillus casei* ВКПМ В-5726 на питательной среде на основе творожной сыворотки с добавлением дрожжевого автолизата и минеральных солей. Предварительно творожную сыворотку освобождают от белков пастеризацией и центрифугированием в изoeлектрической точке 6,7. В ходе культивирования ведут контроль за pH среды и поддерживают с помощью 20 % гидроксида кальция на уровне 6,7. Через 72 ч культивирования биомассу отделяют центрифугированием, а культуральную жидкость содержащую лактат кальция отправляют на очистку.

Таким образом, биотехнология получения молочной кислоты из творожной сыворотки позволяет повысить выход целевого продукта с использованием дешевого сырья, а также снизить нагрузку на окружающую среду.

Литература

1 Подбор оптимальных условий биосинтеза молочной кислоты / О.В. Бондарева, А.А. Толкачева, Н.А. Некрасова [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2022. – Т. 84, № 1(91). – С. 112–117. – DOI 10.20914/2310-1202-2022-1-112-117. –

2. Патент No 2779113 C1 Российская Федерация, МПК C12P 7/56, C12R 1/245. Способ получения молочной кислоты из творожной сыворотки : No 2021139602 : заявл. 29.12.2021 : опубл. 31.08.2022 / О.С. Корнеева, Г.П. Шуваева, О.В. Бондарева [и др.]; заявитель "Воронежский государственный университет инженерных технологий".



Уважаемые коллеги!
Дорогие друзья!

Мы выражаем большую и искреннюю благодарность всем участникам XII 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.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ
журнала «Актуальная биотехнология»

Приглашает к публикации студентов, аспирантов и научных работников по следующим тематикам:

1. ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ

1.5. Биологические науки

1.5.4. Биохимия

1.5.6. Биотехнология

1.5.7. Генетика

1.5.11. Микробиология

1.5.15. Экология

2. ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

2.7. Биотехнологии

2.7.1. Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ

4. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

4.3. Агроинженерия и пищевые технологии

4.3.3. Пищевые системы

Требования к оформлению статей

1. Материалы представляются в двух видах: на электронном носителе и распечатанные на одной стороне листа белой бумаги формата А4 (1 экз.) на лазерном принтере. Они должны быть набраны в редакторе MSWord версия не ниже 6.0 (Office не выше 2007) и напечатаны через одинарный интервал в две колонки шрифтом:

- основной текст – TimesNewRomanCyr 11 с полями: левое 22 мм, правое 18 мм, верхнее и нижнее 25 мм;
- колонтитулы от края – верхний и нижний 18 мм;
- заголовки по центру – TimesNewRomanCyr 11, жирный;
- красная строка -1 см;
- перенос слов – автоматический.

Со смещением на 5 см от рамки текста в начале статьи набираются:

- УДК– Times New Roman Cyr 12;
- должность, степень И. О. Ф. авторов – TimesNewRomanCyr 12;
- название статьи – TimesNewRomanCyr 16, жирный, строчной (без переноса);
- аннотации– Times New Roman Cyr 9;
- ключевые слова – TimesNewRomanCyr 9, до 10 слов;

2. Объем для статьи – 3-8 с. Структурно статья должна иметь четко выраженное *введение*, в котором ставится задача (описывается решаемая проблема), *основную часть*, где излагаются используемые авторами пути решения поставленной задачи, приводятся и обсуждаются результаты, и *заключение*, в сжатой форме подводящее итог работы. Повторение одних и тех же данных в статье, таблице и графике не допускается. Размерность всех характеристик приводится в системе СИ.

3. К каждой статье под заглавием дается аннотация (объем до 600 печатных знаков) на русском и английском языках через 1 строку друг от друга. Название статьи, фамилия и инициалы приводятся отдельно на английском языке.

4. Название статьи или краткого сообщения должно быть лаконичным и точно отражать содержание.

5. Иллюстрации в формате jpeg или gif:

должны быть расположены после ссылки на них в тексте;

должны выполняться на компьютере с обозначением всех необходимых букв и символов в соответствии с ЕСКД и Р 50-77-80. Все буквенные и цифровые обозначения, приведенные на рисунках, поясняются в основном или подрисуночном тексте. Подрисуночные подписи даются TimesNewCyr 10, на формат рисунка.

Графические объекты (диаграммы, графики) должны быть активными (т.е. подлежать редактированию стандартными средствами, например, MSExcel).

6. Формулы и буквенные обозначения:

- × буквы латинского алфавита, используемые в индексах, набирают курсивом;
- × буквы русского и греческого алфавита – прямым шрифтом; знак вектора – полужирным;
- × нумерация формул в тексте сквозная. Нумеруются только те формулы, на которые есть ссылки в тексте.

Формат формул (стандартный редактор) :

× стиль – «математический»;

× размер символа — 11

Sizes (Размеры)	
Full (Обычный)	11 – 10
Subscript/Superscript (Крупный индекс)	7
Sub-subscript/Superscript (Мелкий индекс)	5
Symbol (Крупный символ)	12
Subsymbol (Мелкий символ)	9

7. Таблицы (слово печатается вразрядку) должны быть с заголовками и обязательно располагаться после ссылки на них в тексте. Графы в таблицах должны иметь краткие заголовки. Упоминаемые в заголовках величины сопровождаются соответствующими единицами измерений.

8. Литература (слово печатается: TimesNewRomanCyr 11, жирный, прописной) включает источники, использованные автором при написании статьи, и должна содержать не более 10 наименований. Ссылки в тексте даются в квадратных скобках: [1], помещаются в конце статьи и оформляются согласно ГОСТ 7.1-2003.

В журнале публикуются оригинальные научные статьи теоретического и экспериментального характера. Автор указывает рубрику (в сопроводительном письме), в которой он хотел бы разместить свою статью:

Статья должна быть тщательно проверена и подписана всеми авторами.

На отдельном листе авторы указывают название статьи на русском и английском языке, ФИО полностью, адрес, ученую степень, должность, место работы, контактный телефон, e-mail, а также отмечают автора для переписки.

К статье должны прилагаться сопроводительные документы:

- сопроводительное письмо;
- выписка из протокола заседания кафедры (лаборатории) с рекомендацией статьи к печати;
- положительная рецензия ведущего ученого в данной области или члена редакционной коллегии, заверенная подписью и печатью.

•

