

Министерство образования и науки РФ
Правительство Иркутской области
Иркутский национальный исследовательский технический университет
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Байкальский биотехнологический центр

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ (Сборник научных трудов)



По материалам Всероссийской
научно-практической конференции
с международным участием
25-27 июня 2015г.

ИРНТУ 85:
Форум науки и инноваций

Иркутск 2015

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
ПРАВИТЕЛЬСТВО ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ
ИРКУТСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ СО РАН
БАЙКАЛЬСКИЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Материалы
Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием

ИРНТУ 85: ФОРУМ НАУКИ И ИННОВАЦИЙ

(Иркутск, 25 – 27 июня 2015 г.)

ИЗДАТЕЛЬСТВО
Иркутского национального исследовательского технического
университета
2015

УДК 66.0+574/577
ББК 35.11+28.0. А 437

Рекомендовано к изданию редакционно-издательским советом ИРНТУ

Напечатано при поддержке научного журнала
«Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология»

Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии: мат-лы Всерос. науч.-практ. конф. (Иркутск, 25–27 июня 2015 г.). – Иркутск : Изд-во ИРНТУ, 2015.– 394 с.

В сборнике опубликованы доклады, представленные на Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии» по направлениям: «Фундаментальная биотехнология. Биоинформатика и биоинженерия», «Пищевая биотехнология. Качество и безопасность продуктов питания», «Биотехнологии для поддержания биоразнообразия. Экологические биотехнологии, биоконверсия и биоэнергетика», «Медицинская и фармацевтическая биотехнологии», «Сельскохозяйственные и ветеринарные биотехнологии», «Биоаналитика и химическая биотехнология».

Сборник предназначен для работников научно-исследовательских институтов, промышленных предприятий, специализирующихся в области биотехнологии и продуктов питания, преподавателей вузов и аспирантов.

Редакционная коллегия:

Евстафьев С.Н. – д-р хим. наук, профессор, директор института пищевой инженерии и биотехнологии;

Филатова Е.Г. – канд. техн. наук, зам. директора института пищевой инженерии и биотехнологии по НИР;

Верхотуров В.В. – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой технологии продуктов питания и химии;

Гусакова Г.С. – к.с.-х.н., доцент кафедры органической химии и пищевой технологии им. проф. В.В. Тутуриной

Вершинина С.Э. – канд. биол. наук, доцент кафедры архитектуры и строительства.

Технический редактор:

Степанова М.В. – специалист по учебно-методической работе кафедры органической химии и пищевой технологии им. проф. В.В. Тутуриной

Материалы конференции размещены в сети интернет по адресу:
<http://www.istu.edu/structure/57/4091/>

СОДЕРЖАНИЕ

I. ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ BIOTEХНОЛОГИЯ.	
БИОИНФОРМАТИКА И БИОИНЖЕНЕРИЯ	11
Ф.С. Ахатова, Г.И. Фахруллина, Р.Ф. Фахруллин	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ	11
А.А. Данилушкина, С.А. Коннова, Р.Ф. Фахруллин ИЗМЕНЕНИЕ	
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДРОЖЖЕЙ <i>S. CEREVISIAE</i> И БАКТЕРИЙ	
<i>E. COLI</i>, ПОКРЫТЫХ СЕРЕБРЯНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ,	
СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ РАЗЛИЧНЫМИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ ..	16
М.В. Дума, А.А. Жгун, М.И. Новак, А.Г. Домрачева,	
М.А. Эльдаров, Ю.Э. Бартошевич ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ	
ЭКСПРЕССИЯ PMA1 В КЛЕТКАХ ПРОДУЦЕНТА ЦЕФАЛОСПОРИНА	
С <i>ACREMONIUM CHRYSOGENUM</i>: ВЛИЯНИЕ НА БИОСИНТЕЗ	
АНТИБИОТИКА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАЛАНС КЛЕТКИ.....	21
А.А. Жгун, С.Г. Калинин, М.И. Новак, А.Г. Домрачева,	
Д.В. Петухов, В.В. Джавахия, М.А. Эльдаров, Ю.Э. Бартошевич	
ВЛИЯНИЕ ПОЛИАМИНОВ НА БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКА	
ЦЕФАЛОСПОРИНА С В ШТАММАХ	
<i>ACREMONIUM CHRYSOGENUM</i>.....	28
С.А. Коннова, Р.Ф. Фахруллин МИКРОИНКАПСУЛЯЦИЯ КЛЕТОК	
ДРОЖЖЕЙ В БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОТРУБКИ ГАЛЛУАЗИТА	35
Ч. Нямсурэн, Л.Р. Валеева, Д.С. Трошагина, Е.В. Шакиров,	
М.Р. Шарипова ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ	
<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>, С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ГЕНОМ ФИТАЗЫ	
<i>PANTOAE AGGLOMERANS</i>.....	40
Н.Л. Рудакова, О.С. Митрофанова, Л. Т. Динь, Н.П. Балабан,	
М.Р. Шарипова НОВЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В ГЕНОМЕ	
<i>BACILLUS PUMILUS</i>.....	44
Р.К. Салаяев, Н.И. Рекославская, А.С. Столбиков, А.В. Третьякова	
БИОТЕХНОЛОГИЯ И НОВЫЕ ВАКЦИНЫ.....	51
Т.А. Степина, Т.Н. Кузнецова, А.А. Косонова, Е.В. Тоцкая,	
О.А. Гусейнов, С.В. Прудникова ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ-	

БИОДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИН ФРАГМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ ПЦР-ПРОДУКТА ГЕНА 16S РРНК	57
А.С. Столбиков, Ю.С. Букин, А.В. Третьякова ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОИНФОРМАЦИОННЫХ РЕСУРСОВ ПРИ СОЗДАНИИ ВАКЦИН ПРОТИВ ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ.....	63
В. Р. Тимербаев, С. В. Долгов АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА АЦК ОКСИДАЗЫ ТОМАТА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ С РЕАЛИЗОВАННЫМ МЕХАНИЗМОМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ.....	66
Т. Фишер, Л.С. Михайлова ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОЗЫ В МЕДЕ С ДЕРИВАТИЗАЦИЕЙ / ТВЕРДОФАЗНОЙ МИКРОЭКСТРАКЦИЕЙ И ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ / МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ.....	72
Хабипова Н. Н., Валеева Л. Р., Нямсурэн Ч., Нигматуллина Л. Р., Шакиров Е. В., Шарипова М. Р. СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА ФИТАЗЫ RANTOEA AGGLOMERANS	78
В.Ж. Цыренов, Н.Г. Дульянинова, А.А. Санданов, Б.Д. Мункуева РЕТРОИНГИБИРОВАНИЕ НИКОТИНАТ ФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ <i>CORYNEBACTERIUM FLAVUM</i> ПРОДУКТАМИ РЕАКЦИИ	81
М.А. Эльдаров, А.В. Складенко, А.В. Марданов, А.В. Белецкий, А.А. Жгун, М.В. Думина, Н.В. Медведева, Д.Э. Сатарова, Н.В. Равин, С.В. Яроцкий РЕКОМБИНАНТНАЯ СИНТЕЗА ЦЕФАЛОСПОРИНОВ КИСЛОТ: ГЕНОМНЫЙ КОНТЕКСТ, КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА И СОЗДАНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ СИНТЕЗА ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ	90
II. ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ. КАЧЕСТВО И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ	98
Е. В. Аверьянова, О. В. Грищенко КОМПЛЕКСНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ СОКОВОГО ПРОИЗВОДСТВА НА ПРИМЕРЕ ЖОМА ЖИМОЛОСТИ	98

А.Г. Еникеев, Ю.В. Нурминская, Т.В. Копытина, Л. А. Максимова О ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ СОХРАНЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ НОРМ МАРКИРОВКИ И СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ ГМИ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ	101
Н.Д.Замбулаева, С.Д.Жамсаранова, О.С. Дансарунова АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА СУХОГО ИЗ ВЫЖИМОК ЯГОД БРУСНИКИ И КЛЮКВЫ.....	106
Е.П. Каменская, Ю.С. Малямова ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЦЕСС ЭКСТРАКЦИИ АНТОЦИАНОВ ИЗ ВЫЖИМОК ЯГОД ИРГИ И ГОЛУБИКИ.....	110
Е.П. Каменская, Н.А Горяева ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЭКСТРАГИРОВАНИЯ ИНУЛИНА ИЗ КОРНЕПЛОДОВ ТОПИНАМБУРА СОРТА «БЕЛЫЙ».....	114
Е.В. Климова ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА МАКРОФИТА LEMNA MINOR И ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕГО НА ПИЩЕВЫЕ ЦЕЛИ	117
С.И. Лукина С.И., А.А. Журавлев, И.П. Пешкина ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА КОРЖИКОВ ПРИ ХРАНЕНИИ	120
Мезенова О.Я., Байдалинова Л.С., Воробьев В.И., Мезенова Н.Ю. БИОПОТЕНЦИАЛ РЫБНОЙ ЧЕШУИ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ТЕХНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ	123
Е.И. Пономарева, Н.Н. Алехина, И.А. Бакаева, А.А. Напрасникова ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ ПОВЫШЕННОЙ ПИЩЕВОЙ ЦЕННОСТИ.....	131
В.В. Потапова, Е.А. Привалова, С.Н. Адамович ВЛИЯНИЕ 2 ГИДРОКСИЭТИЛАММОНИЕВЫХ ИОННЫХ ЖИДКОСТЕЙ НА ПРИРОСТ БИОМАССЫ СПИРТОВЫХ ДРОЖЖЕЙ.....	134
К.П. Седых, О.В. Куприна РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУРЫ БЕЗДРОЖЖЕВОГО ХЛЕБА НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИКА А	138
III. BIOTEХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ .. БИОРАЗНООБРАЗИЯ. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ BIOTEХНОЛОГИИ, БИОКОНВЕРСИЯ И	

БИОЭНЕРГЕТИКА	145
<i>И.В.Митрофанова, О.В. Митрофанова, В.А. Браилко, Н.П. Лесникова-Седошенко</i> РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ НЕКОТОРЫХ СОРТОВ РОЗЫ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ И АНАЛИЗ МОРФО-АНАТОМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РЕГЕНЕРАНТОВ.....	145
<i>Л.А. Беловежец, М.С.Третьякова, Ю.А. Маркова</i> СКРИНИНГ БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ	151
<i>В. В. Тарнопольская, О. В. Киселева, Е. В. Алаудинова, П. В. Миронов</i> ГЛУБИННЫЙ МИЦЕЛИЙ <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> И <i>PLEUROTUS DJAMOR</i> КАК ИСТОЧНИК ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ	154
<i>Г.А. Коваленко, Л.В. Перминова, А.Б. Беклемишев</i> БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ ТРИГЛИЦЕРИДОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ В БИОДИЗЕЛЬ.....	160
<i>Л.А. Ломоватская, О.В. Кузакова, А.А. Симакова, Л.Г. Соколова, А.С. Романенко</i> ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЦАМФ У РАСТЕНИЙ КАК ВОЗМОЖНЫЙ КРИТЕРИЙ УСТОЙЧИВОСТИ КУЛЬТУР К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ПОЧВ ФТОРИДАМИ	168
<i>М.С.Третьякова, Л.А. Беловежец, Ю.А. Маркова, Е.М. Глушень, Н.Г. Клишевич, Г.И. Новик, А.В. Сидоронко</i> КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ –НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ	179
<i>А.В. Третьякова, Е.А. Демина, Н.И. Рекославская, Р.К. Саляев, А.С. Столбиков</i> ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO ПИХТЫ СИБИРСКОЙ <i>ABIES SIBIRICA</i> LEDEB.....	183
IV. МЕДИЦИНСКАЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИИ	186
<i>М.В. Антоньичева, О.А. Волох, К.И. Холматов, Н.Г. Авдеева, Н.И. Вахрушина, С.В. Астафьева, А.К. Никифоров</i> ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФИЛЬТРАЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТА ФИБРИНА ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА	187

А.Ю. Галкин, Ю.В. Горшунов, А.Б. Бесараб СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ IGE АНТИТЕЛ	190
Д.В. Гришин, Е.Ф. Колесанова, О.Ю. Абакумова, М.В. Покровская, Н.Н. Соколов ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИМИКРОБНЫХ АГЕНТОВ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ	196
И.М. Дейген, Е.В. Кудряшова FTIR-СПЕКТРОСКОПИЯ: ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ И СОСТАВА БИОПОЛИМЕРОВ	202
С.Д. Жамсаранова, Г.П. Ламажапова, Э.В. Сынгеева ОЦЕНКА ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОНЦЕНТРАТА ПНЖК	208
А.П. Иванов, Т.Д. Клеблеева, О.Е. Иванова, Л.В. Гмыль, Е.Г. Ипатова, Ю.Х. Халчаев, М.Ф. Ворович, А.А. Ишмухаметов РАЗРАБОТКА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ПОЛИОВИРУСНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ СЭБИНА	215
П.В. Копелев, С.А. Александрова, П.О. Никонов, Ю.А. Нащекина ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИЛАКТИДНЫХ МАТРИЦ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ХРЯЩА	220
Г.И. Пронина, А.О. Ревякин, Н.Ю. Корягина, О.И. Степанов, Ж.О. Курищенко ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА ПЕЧЕНИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПАТОЛОГИИ У РЫБ	228
В.В. Разумов, О.И. Бондарев ЭПИТЕЛИАЛЬНО МЕЗЕНХИМАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАК НОВАЯ ПАРАДИГМА ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР).....	232
Г.Н. Руденская, С.А. Голышев, Н.Н. Костин, В.А. Исаев ПРОТЕИНАЗЫ И ИНГИБИТОР КАМЧАТСКОГО КРАБА «PARALITHODES SAMTCHATICUS» КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА	240
К.В. Суховерков, Е.В. Кудряшова НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ L-	

АСПАРАГИНАЗЫ НА ОСНОВЕ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ.....	245
Л.М. Станевич, В.И. Бахтаирова, В.В. Баяндин, Н.С. Шаглаева ИОНООБМЕННЫЕ МЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА.....	252
Е.Г. Шубенкова ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРО- И НАНОЭМУЛЬСИОННЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ..	255
А.С. Столбиков, Р.К. Саляев, Н.И. Рекославская, А.В. Третьякова БИОБАЛЛИСТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАЛУСОВ РАСТЕНИЙ ТОМАТА.....	260
А.В. Комиссаров, О.А. Волох, А.Ю. Ульянов, О.А. Лобовикова, И.В. Шульгина, А.К. Никифоров НОВАЯ ФОРМА ВЫПУСКА ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ – ТАБЛЕТКИ 100 МГ	265
И.А. Федорова, Н.В. Милованова, М.Н. Гордеева, Ю.В. Рылова, А.М. Савилова ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ИЗ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ПЛАЦЕНТЫ, ЭНДОМЕТРИЯ И ЖИРОВОЙ ТКАНИ	267
П.А. Хватков, А.Н. Шведова, М.А. Чернобровкина, А.С. Пушкин, А.П. Фирсов, Л.А. Шалойко, С.В. Долгов РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ И ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЛИНИЙ ВОЛЬФИИ БЕСКОРНЕВОЙ (<i>WOLFFIA ARRHIZA</i>) СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ БЕЛКОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ.....	270
К.И. Холматов, М.В. Антонычева, А.Д. Белоусов, Н.И. Вахрушина, С.В. Астафьева ОСОБЕННОСТИ ФИЛЬТРАЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА	277
Шевченко М.В., Сукач А.Н ГИПОТЕРМИЧЕСКОЕ ХРАНЕНИЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В СОСТАВЕ АГРЕГАТОВ.....	279
М.А. Шулепко, Е.Н. Люкманова, Р.В. Черткова, П.В. Дубовеский, Д.А. Долгих КАРДИОТОКСИНЫ КОБР: БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ	

ПОЛУЧЕНИЕ.....	286
V. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ И ВЕТЕРИНАРНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ	289
<i>Г. А. Белоголова, М. Г. Соколова, О. Н. Гордеева, М. В. Пастухов</i> БИОГЕОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ «ПОЧВА- РАСТЕНИЕ» ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕНЕЗА	289
<i>Валеева Л.Р., Нямсурэн Ч., Трошагина Д.С., Шарипова М.Р., Шакиров Е.В.</i> РАСТЕНИЯ – ПРОДУЦЕНТЫ МИКРОБНЫХ ФИТАЗ: ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД БИОТЕХНОЛОГИИ	297
<i>С.Г. Долгих, А.Б. Нурдинова</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ.....	303
<i>С.Г. Долгих, Л.Ж. Уранбекова</i> ПРОИЗВОДСТВО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ВИНОГРАДА, ОБЛАДАЮЩЕГО ВЫСОКОЙ АДАПТИВНОСТЬЮ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ.....	310
<i>Р.С. Исхаков, Х.Х. Тагиров</i> БИОКОНВЕРСИЯ ПРОТЕИНА И ЭНЕРГИИ КОРМА В БЕЛОК И ЭНЕРГИЮ ТЕЛА БЫЧКОВ.....	317
<i>А.М. Марданова, М.Т. Лутфуллин, Г.Ф. Хадиева, Л.Ф. Миннуллина</i> ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ РИЗОСФЕРЫ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ АНТАГОНИСТОВ МИКРОМИЦЕТОВ <i>P. FUSARIUM</i>	321
<i>А.И. Перфильева, Е.В. Рымарева, Е.Г. Рихванов</i> ВЛИЯНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ КОЛЬЦЕВАЯ ГНИЛЬ НА ХРАНЕНИЕ И ВЕГЕТАЦИЮ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ ...	327
<i>Н.Н. Терещенко, А.В. Кравец</i> ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ <i>PSEUDOMONAS</i> <i>SP.</i> И ГЛАУКОНИТА ДЛЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН МОРКОВИ.....	331
<i>М.А. Ханадеева, Н.И. Старичкова, Е.Ф. Соболева, Н.В. Евсеева, Л.П. Антонюк</i> СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ ПО ПРИЗНАКУ «СОДЕРЖАНИЕ ЛЕКТИНА В СЕМЕНАХ»	335

М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, А.А. Тойменцева, Д.С. Баранова, А.О. Тихонова БАЦИЛЛЯРНАЯ РИБОНУКЛЕАЗА КАК СРЕДСТВО ПРОТИВ ФИТОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ	341
М.В. Штерншис, В.П. Цветкова, Т.В. Шпатова, Е.И. Шаталова, А.А. Беляев, С.А. Бахвалов ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	347
О.Н. Шуплецова, И.Г. Широких РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ, ПОЛУЧЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ	352
Ф.Ф. Вагапов, Р.С. Юсупов СОСТАВ МОЛОКА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В КОРМЛЕНИИ КОРОВ ПРОБИОТИКА «ВЕТОСПОРИН-АКТИВ»	358
VI. БИОАНАЛИТИКА И ХИМИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ	362
Е.В. Верховзина, В.А. Верховзина, В. В. Верхотуров ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ВОДЫ ПРЕСНОВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ	362
Д.Д. Вилкова, О.В. Астафьева, К.В. Попко ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИСТЬЕВ <i>SOLANUM NIGRUM</i> L. С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ БИОПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ.....	367
О.М. Цивилева, Т.Ф. Нгуен, Л.Н. Ву, М.П. Чернышова, Н.А. Юрасов, А.Н. Петров БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ЛИПИДНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ГРИБНЫХ КУЛЬТУР <i>GANODERMA</i> РАЗНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН	371
К. В. Попко, Д. Д. Вилкова, О. В. Астафьева ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ СОЦВЕТИЙ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ <i>TARGETES PATULA</i> L.....	378
А.В. Третьякова ОСОБЕННОСТИ ПРЕПОДАВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ В ВУЗЕ	381
К.А. Кириченко СОСТАВ ВЫСШИХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ МАКРОФИТОВ РЕКИ АНГАРА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ	384

I. ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ. БИОИНФОРМАТИКА И БИОИНЖЕНЕРИЯ

УДК 579.66

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Ф.С. Ахатова, Г.И. Фахруллина, Р.Ф. Фахруллин

Институт фундаментальной медицины и биологии,
ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет
420021, г. Казань, ул. Парижской коммуны, 9, Farida125@mail.ru

С каждым годом синтезируются и применяются новые наноматериалы, детекция которых в живых организмах очень сложна. Визуализация частиц при помощи обычного светового микроскопа практически невозможна, а методы электронной микроскопии биологических образцов требуют многоэтапной пробоподготовки и дорогостоящих реактивов. На данный момент, метод гиперспектрального анализа является перспективным методом обнаружения и визуализации наночастиц. Спектральные кривые из библиотек могут быть использованы для классификации или автоматической идентификации частиц на гиперспектральном изображении.

Ключевые слова: живые системы, микроорганизмы, многоклеточные организмы, наночастицы, характеристика наночастиц.

В последние годы пристальное внимание многих ученых уделяется проблеме для адресной доставки лекарственных средств к очагу болезни. Решением проблем могут стать наноразмерные частицы. Более подробное изучение свойств и характеристик частиц помогут разобраться в способах доставки частиц в живые клетки.

Цель работы – разработка метода внедрения наноматериалов в различные живые системы (дрожжи, бактерии, почвенные нематоды) и определение их характеристик.

В качестве носителей наночастиц использовали различные живые объекты: бактерии *Escherichia coli*, водоросли *Chlorella pyrenoidosa*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, циклоп из семейства Cyclopidae, почвенная нематода *Caenorhabditis elegans* и клеточные культуры человека A549 и HeB 3b.

В качестве исследованных наночастиц выбрали широко применяемые в мировом масштабе наночастицы серебра, золота и магнетита. Также частицы глинистой природы, силику и латекс.

В работе было взято 8 различных наночастиц (серебряные, золотые, магнитные, галлуазит, силика, бентонит, монтмориллонит и каолин), которые отличаются друг от друга природой происхождения, строением, формой, размерами, а также рядом физическим и химических характеристик.

На первом этапе мы визуализировали наночастицы при помощи темнопольной гиперспектральной системы Cyto Viva®. Данный микроскоп позволяет четко увидеть частицы. На рисунке 1 изображены фотографии наночастиц, которые были получены под объективом $\times 100$. На них хорошо видны отдельные частицы. Образцы предварительно разбавлялись до маленьких концентраций (примерно, 1-5 мг/мл) и помещались в ультразвуковую баню для предотвращения образования конгломератов. Все эти манипуляции позволяют визуализировать частицы по-отдельности.

Исследовав количественные и качественные характеристики частиц мы обнаружили, что самыми главными параметрами явились диаметр и поверхностный заряд наночастиц. Так как эти показатели напрямую влияют на проходимость наночастиц внутрь живого организма. У всех частиц было измерены размеры и ζ – потенциал. Также частицы были покрыты полиэлектролитами (PEI, PAH, PDADMAC и PSS) для изменения их поверхностного заряда.

Данные по гидродинамическому диаметру исследуемых частиц и значению ζ -потенциала были представлены в виде графиков. Как пример тому на рисунке 2 изображены графики диаметра и ζ -потенциал галлуазита.

Для контролируемой доставки наноразмерных частиц внутрь или на поверхность живых объектов частицы были модифицированы соответствующими полиэлектролитами (1). Они в свою очередь меняют ζ -потенциал. Клеточная стенка микроорганизмов имеет

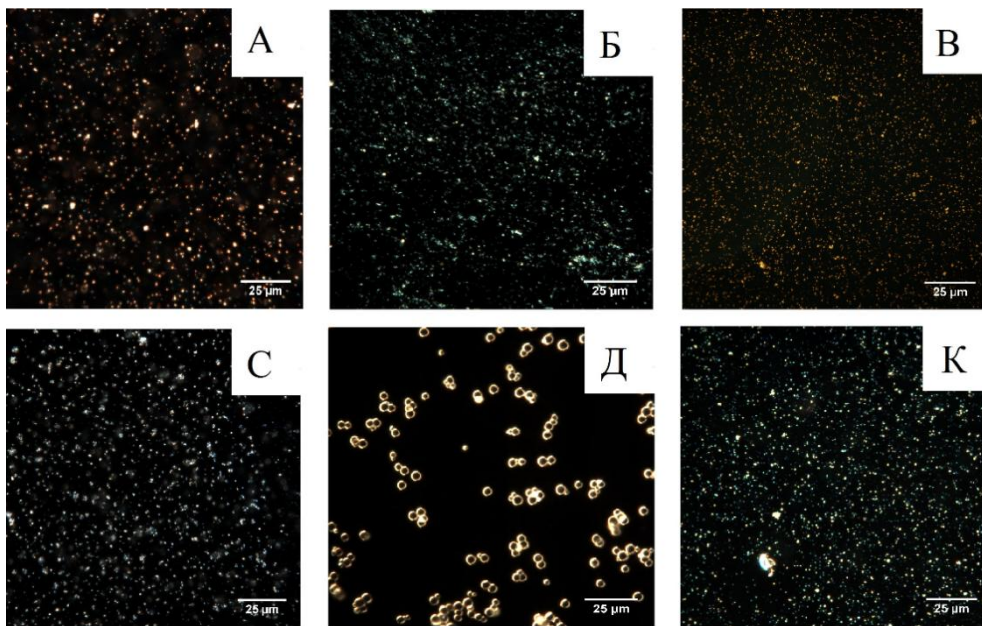


Рис. 1. Различные наночастицы визуализированные при помощи темнопольной микроскопии (увеличение $\times 100$) А – серебряные наночастицы, Б – галлуазит, В – золотые наночастицы, С – латекс, Д - $MnCO_2$, К – магнитные наночастицы смешанные с галлуазитом

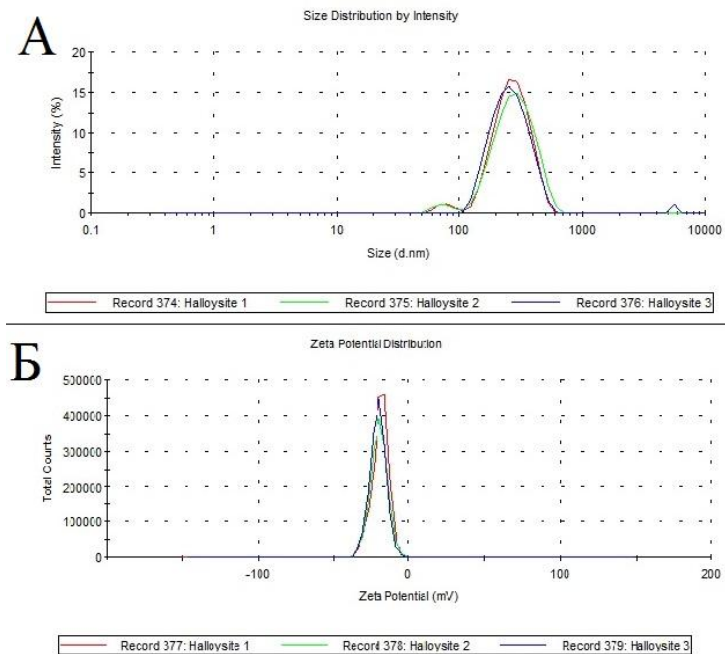


Рис. 2. Графики, отображающие размер и ζ -потенциал галлуазита. А - гидродинамический диаметр наночастиц, Б - значение ζ -потенциала

различный химический состав и обладает определенным поверхностным зарядом. Это свойство делает возможным наслаивать на их поверхность противоположно заряженные полимеры с допированием в них наночастиц или непосредственно наносить полимер-стабилизированные наночастицы. А для доставки наночастиц в многоклеточный организм, как например, *C.elegans*, необходимо прикрепить на поверхность клеток микроорганизмов (бактерий, водорослей, дрожжей), пищевого сырья червей, исследуемые наночастицы. Такие микроорганизмы-носители наночастиц помогут проникнуть частицам внутрь организма нематод.

На примере серебряных наночастиц рассмотрим послойное нанесение наночастиц на клеточную поверхность бактерии *E.coli*. Имобилизацию наносеребра, синтезированного по методике Lee и Meisel (2), на клетки осуществляли путем послойного нанесения противоположно заряженных полиэлектролитов. Для того чтобы усилить отрицательный заряд клеточной стенки в суспензию клеток изначально вносили раствор полианион полистирол сульфоната (PSS, 70 кДа, 5 мг/мл) и инкубировали в течение 15 минут. Для удаления избытка полиэлектролита промывали 3 раза дистиллированной водой с последующим центрифугированием. Аналогично наносили поликатион полиаллиламин гидрохлорид (ПАН, 70 кДа, 5 мг/мл). Для нанесения наночастиц серебра на поверхность клеток добавляли 1 мл синтезированных AgНЧ (0.1 мг/мл) и 25 минут инкубировали на шейкере-ротаторе. Затем, как выше упомянуто, клетки отмывали водой от несвязавшихся наночастиц и закрепляли бислойной пленкой ПАН/PSS. Сборку многослойных полиэлектролитов, легированных AgНЧ, на поверхности бактерий контролировали с помощью ζ – потенциал измерений. Ранее учеными было показано, что полиэлектролитные пленки не воздействуют на жизнеспособность клеток (3). Таким образом, покрытие клеток микроорганизмов была следующей: *E.coli*/PSS/ПАН/AgНЧ/ПАН/PSS.

Подобным образом мы покрывали и одноклеточные водоросли *Chlorella pyrenoidosa*. С клеточной культурой человека оказалось все гораздо проще. Клетки не требовали послойного нанесения полиэлектролитов. Наночастицы мелкого размера проникали внутрь клетки без какого-либо воздействия, особенно хорошо это видно на

культуре *Neb 3b*. Если мы берем многоклеточный организм, например, циклопа *Cyclop sp.*, то проникновение частиц в организм идет через пищеварительный тракт. Кроме яйцевых мешков у самок. Пленка, которая покрывает яйца имеет большие поры, что позволяет наночастицам проникать внутрь без особых усилий.

Для контролируемой доставки наноразмерных частиц внутрь тела нематод *C.elegans* использовались одноклеточные организмы, покрытые частицами (бактерий, дрожжей). Если мы рассматриваем наночастицы глинистого происхождения, то нет необходимости нанесения их на клеточную мембрану пищевого субстрата *C.elegans*, так как их почвенная нематода хорошо заглатывает. Это можно объяснить тем, что по природе *C.elegans* фильтрует через себя почву, таким образом она получает пищу.

Результаты показали, что покрытые наночастицами различных живых объектов можно осуществить различными способами. Но больше частью они проникают самостоятельно. Для того, чтобы определить сколько частиц неконтролируемо проникают в организмы мы брали разные концентрации исследуемых частиц и сравнивали полученные фотографии.

В ходе выполнения работ создан банк различных наноматериалов. Определены их характеристики – гидродинамический диаметр наночастиц и ζ – потенциал наночастиц. Найдены модельные объекты, в которые легко проникают наночастицы. Подобные организмы упрощают доставку наночастиц в цитоплазму клеток или в межклеточное вещество. Также оптимизирован эффективный способ нанесения наночастиц и полимерных пленок на клеточную поверхность различных одноклеточных организмов. При помощи метода темнопольной микроскопии было доказано плотная иммобилизация наночастиц на поверхность бактерий, водорослей, дрожжей и культуру клеток человека. Также получены спектральные фотографии наночастиц на или в живых объектах. Это открывает перспективы в разработке метода детекции наночастиц в живых объектах. Преимуществом данной методики покрытия клеток наноматериалами является сохранение жизнеспособности наномодифицированных клеток, о чем свидетельствуют полученные результаты.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) фе-

дерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров. Так же данное исследование было поддержано грантом Российского Научного Фонда № 14-14-00924.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Fakhrullin R.F. Interfacing living unicellular algae cells with biocompatible polyelectrolyte-stabilised magnetic nanoparticles. / R.F. Fakhrullin, L.V. Shlykova, A.I. Zamaleeva, D.K. Nurgaliev, Y.N. Osin, J.García-Alonso, V.N. Paunov // *Macromol Biosci.* – 2010, V.10, P.1257-1264.

2. Lee P. C. Adsorption and Surface – Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols / P. C. Lee , D. Meisel // *Journal of Physical Chemistry.* – 1982, V. 86, P. 3391–3395.

3. Diaspro A. Single Living Cell Encapsulation in Nano-organized Polyelectrolyte Shells. / A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, A. Gliozzi // *Langmuir.* – 2002, V. 18, P. 5047–5050.

УДК 579.66

ИЗМЕНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE* И БАКТЕРИЙ *E. COLI*, ПОКРЫТЫХ СЕРЕБРЯНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ РАЗЛИЧНЫМИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТАМИ

А.А. Данилушкина, С.А. Коннова, Р.Ф. Фахруллин

Казанский федеральный университет
420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, anchutka124@gmail.com

В настоящее время для покрытия живых клеток существует биосовместимый метод послойного нанесения полиэлектролитов. У данного метода есть два недостатка: длительный процесс нанесения полиэлектролитов, подавление жизнеспособности покрываемых объектов, поэтому для сокращения времени покры-

тия дрожжей S. cerevisiae и бактерий E. coli полиэлектролитами мы предлагаем заблаговременную подготовку (стабилизацию полиэлектролитами) частиц и дальнейшее одноэтапное покрытие стабилизированными частицами клеток. Также мы решили выяснить влияние полиэлектролит-стабилизированных серебряных наночастиц на жизнеспособность дрожжей S.cerevisiae и бактерии E. coli.

Ключевые слова: серебряные наночастицы; одноэтапное покрытие; полиэлектролиты; цитотоксичность.

CHANGING THE VIABILITY YEAST S. CEREVISIAE AND BACTERIA E. COLI, COVERING WITH SILVER NANOPARTICLES STABILIZED WITH VARIOUS POLYELECTROLYTE

A.A. Danilushkina, S.A. Konnova, R.F. Fahrullin
Kazan Federal University, 18 Kremlyovskaya St.,
Kazan 420008, Russian Federation, anchutka124@gmail.com

Currently, coverage of live cells there is biocompatible polyelectrolyte method of layering. In this method has two drawbacks: the long process of applying polyelectrolytes suppression viability covered objects, so to reduce the time coverage of S. cerevisiae and E. coli bacteria polyelectrolytes we offer advance preparation (stabilization polyelectrolytes) particles and a further one-step coating particles stabilized cells. Also, we decided to investigate the effect of polyelectrolyte-stabilized silver nanoparticles on the viability of the yeast S.cerevisiae and the bacteria E. coli. Keywords: silver nanoparticles; one-step coating; polyelectrolytes; cytotoxicity.

Поверхностно-клеточная инженерия является динамично развивающейся междисциплинарной областью исследований, направленная на изготовление искусственных функциональных оболочек на поверхности биологических клеток [1]. Взаимодействие клеток с многослойными полимерами, рассматривается как мощный способ ослабления или усиления внутренних свойств клеток для контроля деления клеток или их сборки в искусственные многоклеточные кластеры [2].

В данной работе мы изготавливаем серебряные наночастицы, покрытые полиэлектролитами, и используем их для прямого одношагового нанесения на поверхность клеток. Далее мы наблюдали изменение жизнеспособности дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *E. coli*.

Для стабилизации серебряных наночастиц мы использовали следующие полиэлектролиты: PAH (polyallylamine hydrochloride), PEI (polyethyleneimine), PDADMAC (poly(diallyldimethylammonium chloride)). Растворы данных полиэлектролитов добавляли к наночастицам серебра, обрабатывали ультразвуком, перемешивали на ротаторе. На последнем этапе проводили отмывку полученных частиц от избытка полиэлектролита. Затем покрывали клетки дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *E. coli* полученными полимер-стабилизированными серебряными наночастицами. Для этого встряхивали клетки и наночастицы на шейкере и промывали дистиллированной водой. Для определения влияния полиэлектролитов и серебряных наночастиц на жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *E. coli* мы использовали следующие тесты на токсичность: окрашивание витальными красителями (Fluorescein diacetate, Propidium iodide) и построение кривой роста.

Серебряные наночастицы были стабилизированы полиэлектролитами: PAH, PDADMAC, PEI [3]. Полученные полимер-стабилизированные серебряные наночастицы были охарактеризованы следующими видами микроскопии: гиперспектральная система CytoViva (рис. 1), атомно-силовая микроскопия (рис. 2), просвечивающая электронная микроскопия. Дрожжи и бактерии были покрыты полимер-стабилизированными серебряными наночастицами. Также были проведены тесты на жизнеспособность (рис. 3).

По полученным данным кривых роста дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *E. coli* следует, что полиэлектролит PAH слабо влияет на их жизнеспособность ($95,9\% \pm 7,8$ живых клеток относительно контроля), полиэлектролит PDADMAC влияет сильнее ($93,6\% \pm 5,2$ живых клеток относительно контроля), а PEI ещё сильнее ($63,3\% \pm 6,1$ живых клеток относительно контроля). Сами серебряные наночастицы мало влияют на жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *E. coli* ($97,9\% \pm 2,1$). Также полимер-стабилизированные

наночастицы серебра значительно упрощают процесс покрытия клеток.

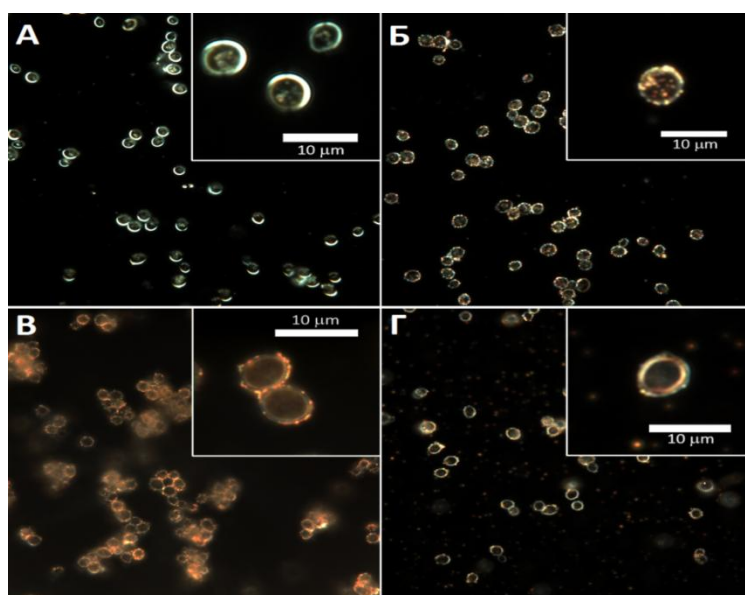


Рис. 1. Изображения гиперспектральной микроскопии. Дрожжи *S.cerevisiae* с полимерными покрытиями, стабилизированные AgNPs: нативные клетки (А), РАН (Б), PDADMAC (В), PEI (Г)

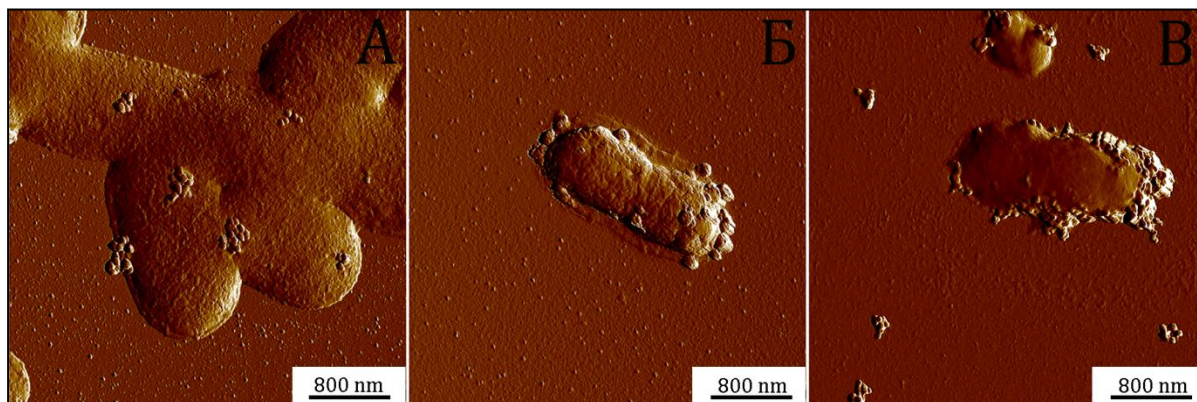


Рис. 2. АСМ изображения клеток *E.coli*, покрытые РАН–AgNPs (А); PDADMAC–AgNPs (Б) и PEI–AgNPs (В) [2]

В данной статье мы описали быстрый метод нанесения серебряных наночастиц, стабилизированных полиэлектролитами, на дрожжи *S. cerevisiae* и бактерии *E. coli*. Также мы выяснили, что наибольшей цитотоксичностью обладают серебряные наночастицы, стабилизированные полиэлектролитами PEI и PDADMAC.

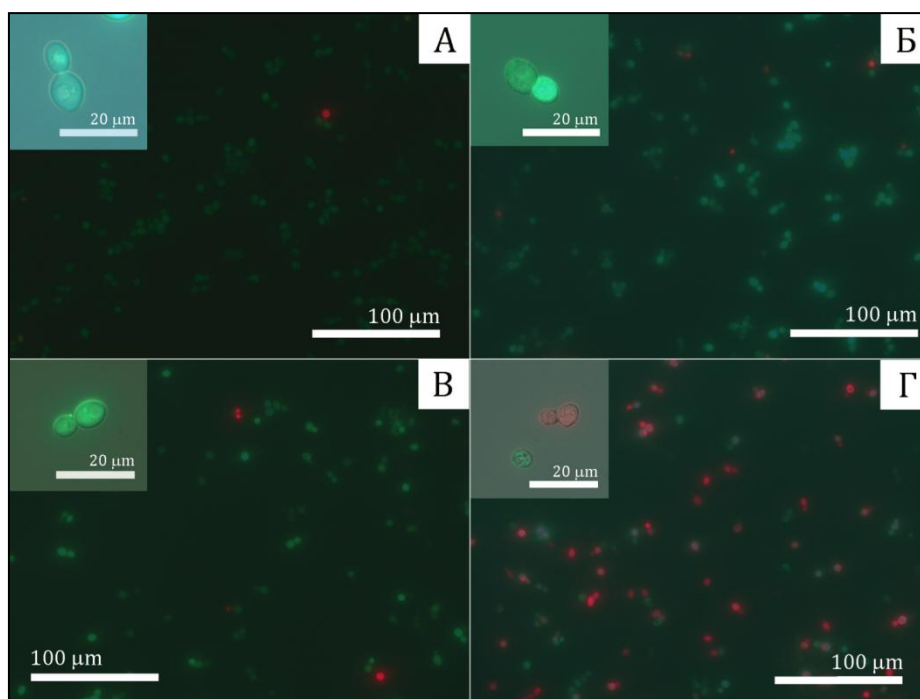


Рис. 3. Тест на жизнеспособность дрожжевых клеток, покрытые AgNPs, стабилизированные разными полиэлектролитами: (А) нативные клетки (98% жизнеспособность); (Б) PAN-AgNPs (97% жизнеспособных); (В) PDADMAC-AgNPs (94% жизнеспособных); (Г) - PEI-AgNPs (63% жизнеспособных) [2]

Данное исследование было поддержано грантом Российского Научного Фонда № 14-14-00924. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Fakhrullin R.F., Choi I., Lvov Y. Cell Surface Engineering: Fabrication of Functional Nanoshells. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2014.
2. Konnova S.A., Danilushkina A.A., Fakhrullina G.I., Akhatova F.S., Badrutdinov A.R., Fakhrullin R.F. Silver nanoparticle-coated “cyborg” microorganisms: rapid assembly of polymerstabilised nanoparticles on microbial cells. RSC Advances, 2015, pp. 13530–13537.

3. Fakhrullin R.F., Lvov Y.M. Face-Lifting and Make-Up for Microorganisms: Layer-by-Layer Polyelectrolyte Nanocoating. ACS Nano, 2012, pp. 4557–4564.

УДК 577.218

**ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ PMA1
В КЛЕТКАХ ПРОДУЦЕНТА ЦЕФАЛОСПОРИНА
С *ACREMONIUM CHRYSOGENUM*: ВЛИЯНИЕ НА
БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКА И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ
БАЛАНС КЛЕТКИ**

М.В. Думина, А.А. Жгун, М.И. Новак, А.Г. Домрачева, М.А. Эльдаров,
Ю.Э. Бартошевич

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

117312, Россия, г. Москва, пр-т 60-летия Октября 7/1,
DuminaMaria@gmail.com

*Созданы генетические конструкции для экспрессии H⁺-АТФазы плазмалеммы PMA1 в виде гибридного белка, слитого с желтым флуоресцентным белком YFP, в клетках продуцента бета-лактамного антибиотика цефалоспорина C *Acromonium chrysogenum*. Исследован характер субклеточной локализации PMA1-YFP гибрида в *A. chrysogenum*. Методом агробактериального переноса получены трансформанты высокопродуктивного штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D, экспрессирующие ген *pta1-yfp*. Показано, что повышенная экспрессия H⁺-АТФазы в рекомбинантных клонах *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP приводит к снижению внутриклеточного содержания АТФ, что оказывает в целом негативный эффект на биосинтез конечного продукта цефалоспорина C.*

Ил. 3. Табл. 1. Библиогр. 6 назв.

Ключевые слова: антибиотик, биосинтез, генетическая инженерия.

Цефалоспорин С (цефС) – субстанция для получения более 50 наименований полусинтетических антибиотиков 5 поколений. Основными преимуществами данной группы бета-лактамов являются мощный бактерицидный эффект, широкий терапевтический диапазон, низкая токсичность, что определяет их лидерство на современном рынке системных антибиотиков.

Продуцентом цефалоспорина С является аскомицет *A. chrysogenum*. На протяжении последних десятилетий был достигнут значительный прогресс в селекции штаммов *A. chrysogenum* – суперпродуцентов цефС, изучении биохимических путей биосинтеза цефалоспоринов, идентификации генов, контролирующих биосинтез этих бета-лактамов и характера их регуляции [4].

Биосинтез цефС насчитывает 6 ферментативных стадий, катализируемых продуктами генов *pcbAB*, *pcbC*, *cefD1-cefD2*, *cefEF*, *cefG*, а также включает функционирование специфических мембранных транспортеров, кодируемых генами раннего кластера биосинтеза - *cefP*, *cefM*, *cefT*, гена-регулятора *cefR* [5].

Работа по мутагенезу и селекции штамма дикого типа *A. chrysogenum* ATCC 11550 привела к созданию современных высокоактивных продуцентов с уровнем продукции цефС до 30 г/л. Одним из таких штаммов является *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D, для которого, как показали исследования, признак суперпродукции цефС во многом обусловлен многократным увеличением уровня экспрессии генов биосинтетических кластеров [2]. В то же время уровень транскрипции ряда генов «центрального метаболизма» для *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D снижен. Одним из таких генов является *pma*, кодирующий H^+ -АТФазу плазмалеммы, ключевой белок плазматической мембраны грибов. Функцией белка является формирование на плазмалемме градиента протонов. Сформированный градиент энергизует все процессы транспорта метаболитов посредством H^+ /симпортного или H^+ /антипортного механизмов [1].

Для *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D показано также, что на стадии интенсивного антибиотикообразования активность H^+ -АТФазы РМА снижается в отличие от штамма дикого типа ATCC 11550 [6]. Соответственно, роль основного белка плазмалеммы в энергообес-

печении процессов синтеза и транспорта цефС для *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D неясна.

Таким образом, цель данной работы – изучение эффекта конститутивной экспрессии PMA1-YFP на биосинтез цефалоспориноидов С и энергетический баланс клетки для высокопродуктивного штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D.

Кассета экспрессии PMA1-TagYFP для мицелиальных грибов *A. chrysogenum* была сконструирована из промотора гена глицеральдегид фосфат дегидрогеназы *Aspergillus nidulans* (*gpdA*), терминатора гена фосфоглицерат киназы *S. cerevisiae* (*PGK1*), разделенных участком полилинкера, доминантного селективного маркера гена гигромицин-В фосфотрансферазы *E. coli* (*hph*) под контролем промотора *trpC* *A. nidulans*, определяющего устойчивость к гигромицину рекомбинатных штаммов мицелиальных грибов. В качестве вектора-носителя плазмиды pZEN36с, содержащей кассету экспрессии, была выбрана pCAMBIA1300.

Трансформацию *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D осуществляли методом агробактериального переноса (АТМТ) путем кокультивирования препарата мицелия *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D и клеток *A. tumefaciens* AGL0_PMA1-TagYFP.

Молекулярный анализ клонов *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP, проводили методом ПЦР на наличие кассеты экспрессии, отсутствие плазмидной *npt*- и агробактериальной *vir*-контаминации. Хромосомная интеграция кассеты экспрессии была доказана методом Саузерн-гибридизации.

Микрофотографии клонов *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D, экспрессирующих PMA1-YFP, были получены с использованием микроскопа Olympus BX2 при возбуждении 515 нм; эмиссии 530 нм и камеры DP30BW.

Профиль низкомолекулярных метаболитов *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP анализировали методом ВЭЖХ: СТАВ – ацетонитрил – ортофосфорная кислота – вода, хроматографическая колонка YMC-Pack ODS-A, детекция при 254 нм.

Уровень экспрессии генов анализировали методом ПЦР-РВ.

Для изучения влияния работы энерготранспортной системы PMA на уровень биосинтеза цефС в *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D осуществляли экспрессию гена *pma1* из *S. cerevisiae*.

В предварительных экспериментах была исследована экспрессия эндогенного *rta* в *A. chrysogenum* ATCC 11550 и ВКМ F-4081D методом ПЦР-РВ: уровень транскрипции эндогенного *rta* в штаммах закономерно возрастал на протяжении культивирования (рис. 1 А). При этом экспрессия *rta* для штамма дикого типа была существенно выше, чем для высокопродуктивного ВКМ F-4081D: в 11-12 раз на стадии посевной культуры, в 2-3 раза на стадии ферментации. Обнаруженная дефектность высокопродуктивного штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D по синтезу H⁺-АТФазы была скорректирована в *rta1*-клонах, где наблюдали рост экспрессии эндогенного *rta* (рис. 1 А). Экспрессию гена *rta1-tagYFP* в рекомбинантных клонах подтвердили ПЦР-РВ с селективными праймерами на негомологичную зону гетерологичного *rta1* (рис. 1 Б).

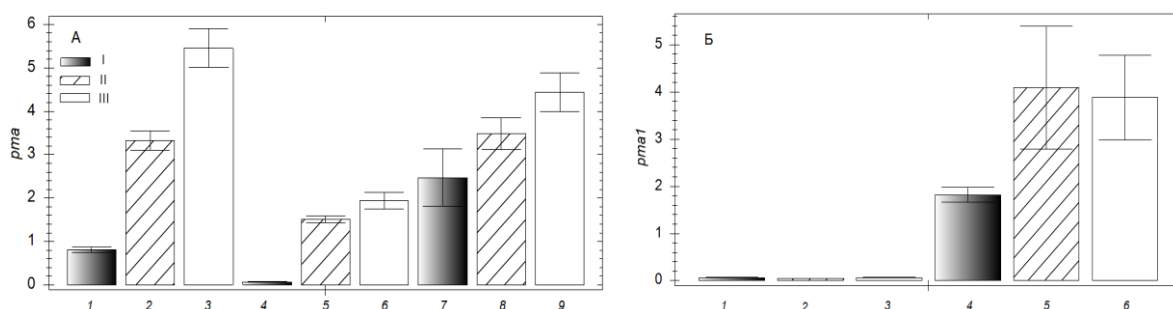


Рис. 1. Экспрессия *rta*, *rta1* в штаммах *A. chrysogenum* в точках 0 (I), 48 (II), 120 ч (III). А – нормализованная экспрессия *rta* в *A. chrysogenum*: 1–3 – ATCC 11550, 4–6 – ВКМ F-4081D, 7–9 – ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP; Б – нормализованная экспрессия *rta1* в *A. chrysogenum*: 1–3 – ВКМ F-4081D, 4–6 – ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP



Рис. 2. Экспрессия PMA1-TagYFP (из *S. cerevisiae*) в *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D. А – фотография в проходящем свете; Б, В – флуоресцентный анализ *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP (зеленый). В – наложение структуры клетки в проходящем свете (рис. А) и флуоресценции PMA1-TagYFP (рис. Б)

Флуоресцентная микроскопия экспрессируемого гетерологичного белка PMA1-TagYFP в рекомбинантных штаммах *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP показала локализацию H⁺-АТФазы в плазматической мембране продуцента (рис. 2).

Функциональную активность гетерологичного белка PMA1-TagYFP в штаммах *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP анализировали по содержанию внутриклеточного АТФ. Все анализируемые клоны показали резкое снижение внутриклеточного содержания АТФ – на 35-65 % относительно контрольного штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D. Полученные результаты говорят об интенсификации гидролиза АТФ при работе дрожжевой H⁺-АТФазы в рекомбинантных клонах (рис. 3).

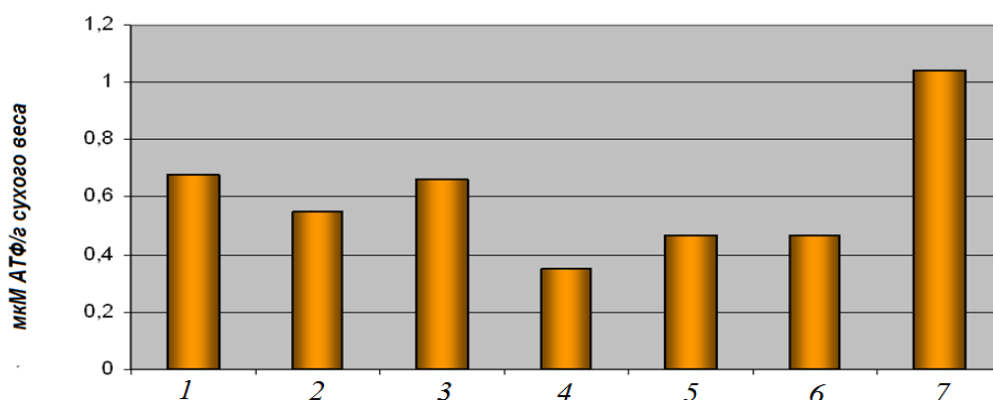


Рис. 3. Внутриклеточное содержание АТФ в штаммах *A. chrysogenum*. 1-6 – рекомбинантные штаммы ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP (клоны № 2, 4, 6, 10, 11, 20 соответственно), 7 – ВКМ F-4081D

ВЭЖХ-анализ супернатантов культуральной жидкости клонов *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP показал снижение уровня биосинтеза цефС относительно контрольного штамма (табл. 1).

Сравнительный анализ уровня транскрипции генов биосинтетических кластеров цефС в *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP и контрольном штамме показал, что для низкоактивного клона с уровнем продукции антибиотика 1222 мг/л их экспрессия снижена, для высокоактивного клона с биосинтезом цефС 3815 мг/л наблюдается колебание экспрессии относительно контрольного уровня.

Таблица 1. ВЭЖХ-анализ супернатантов культуральной жидкости штаммов *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP

Образец <i>A. chrysogenum</i>	Среднее содержание цефС	
	мкг/мл	Отношение к контролю, %
ВКМ F-4081D	4580	100.0
ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP_P2	2589	56.5
ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP_P6(1)	1324	28.9
ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP_P6(2)	1222	26.7
ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP_P20(1)	3815	83.3
ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP_P20(2)	3534	77.2

Биосинтез цефалоспорины С – энергоемкий процесс. Так, для начальной стадии антибиотикообразования – синтеза 1 моля трипептида L- α -аминоадепил-L-цистеинил-D-валина – требуется от 3 до 20 и более молей АТФ в зависимости от условий протекания реакции [3, 6]. Для создания электрохимического протонного градиента через плазматическую мембрану H⁺-АТФазе также необходима энергия гидролиза АТФ. Таким образом, РМА оказывает конкурирующее по отношению к биосинтезу цефС действие, причем не только на стадии синтеза АСV-трипептида. Лимитирующей в метаболическом пути цефС выступает реакция замещения гидроксигруппы дезацетилцефС на ацетильную группу АсКоА под действием ацетил-КоА-DАС-ацетилтрансферазы с образованием продукта реакции – цефС. В то же время АсКоА – стартовое соединение ЦТК для последующего синтеза АТФ клетки.

Повышенная экспрессия H⁺-АТФазы в рекомбинантных клонах *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_PMA1-TagYFP оказала в целом негативный эффект на продукцию цефС, который обусловлен двукратным снижением уровня внутриклеточного АТФ, дополнительно расходуемого на работу гетерологичной H⁺-АТФазы. Нарушение

энергетики биосинтеза цефС дополняется также изменением временной динамики и уровня транскрипции генов биосинтетических кластеров в полученных штаммах.

Таким образом, в ходе работ по мутагенезу и селекции штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D был получен характерный профиль уровня транскрипции не только генов биосинтетических кластеров, но также генов «центрального метаболизма», отвечающий признаку суперпродукции цефС.

Авторы выражают благодарность за содействие в работе Валиахметову А.Я., Кнорре Д.А., Северину Ф.Ф.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-31515.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ambesi, A. et al.: Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H(+)-ATPase. *Journal of Experimental Biology*. 203, Pt 1, 155–160 (2000).

2. Dumina MV, B.I.: Comparative gene expression profiling reveals key changes in expression levels of cephalosporin C biosynthesis and transport genes between low and high-producing strains of *Acremonium chrysogenum*. *World J Microbiol Biotechnol*. 30, 11, 2933–41 (2014).

3. Kallow, W. et al.: Penicillin biosynthesis: energy requirement for tripeptide precursor formation by delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Acremonium chrysogenum*. *Biochemistry*. 37, 17, 5947–5952 (1998).

4. Martín, J.F. et al.: Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. *Microbial biotechnology*. 3, 3, 285–299 (2010).

5. Teixeira, F. et al.: CefR modulates transporters of beta-lactam intermediates preventing the loss of penicillins to the broth and increases cephalosporin production in *Acremonium chrysogenum*. *Metabolic Engineering*. 13, 5, 532–543 (2011).

6. Валиахметов, А.Я. et al.: Динамика содержания неорганических полифосфатов при синтезе цефалоспорина с у *Acremonium chrysogenum*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 46, 2, 198–204 (2010).

УДК 577.218

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИАМИНОВ НА БИОСИНТЕЗ
АНТИБИОТИКА ЦЕФАЛОСПОРИНА С
В ШТАММАХ *ACREMONIUM CHRYSOGENUM***

А.А. Жгун, С.Г. Калинин, М.И. Новак, А.Г. Домрачева, Д.В. Петухов,
В.В. Джавахия, М.А. Эльдаров, Ю.Э. Бартошевич

Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Россия, г. Москва, Проспект
60-летия Октября, д.7, корп.1, zzhgun@mail.ru

*Изучено влияние 1,3-диаминопропана (ДАП) и спермидина (СПД) на рост и уровень продукции антибиотика цефалоспорина С в штаммах *Acremonium chrysogenum* ATCC 11550 и ВКМ F-4081D. Добавление 5 мМ ДАП и 5 мМ СПД приводит к стимулированию роста *A. chrysogenum* ATCC 11550 и ВКМ F-4081D на плотной питательной среде. Ферментация штамма ВКМ F-4081D с 5 мМ СПД приводит к повышению продукции цефалоспорина С на 10-15% после 144 ч культивирования. Показано, что 5 мМ СПД активирует экспрессию регуляторных генов биосинтеза цефалоспорина С (*laeA* и *adoMetDC*) и экспрессию ранних биосинтетических генов (*psbAB*, *psbC*, *cefD2*) на начальных этапах (24 ч) культивирования *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D.*

Ил. 3. Библиогр. 8 назв.

*Ключевые слова: *Acremonium chrysogenum*; цефалоспорин С; полиамины; *LaeA*.*

Алифатические полиамины широко распространены в природе. Их концентрация в микроорганизмах может достигать 5-10 мкМ и составлять свыше 20% от небелкового клеточного азота. Наиболее изученные функции полиаминов связаны со стимуляцией роста микроорганизмов, увеличением стабильности мембран, взаимодействием с нуклеиновыми кислотами и регуляцией уровня гетерохроматина в клетке. Известно, что продолжительность жизни ряда модельных объектов (микроорганизмы, нематоды, плодовые мухи, клетки млекопитающих) может быть повышена путем добавления экзогенных полиаминов [1]. В недавних исследованиях показано, что

ДАП и СПД являются индукторами биосинтеза бета-лактамных антибиотиков в клетках нитчатых грибов *Penicillium chrysogenum* и *A.chrysogenum* [2,3]. Экзогенно-добавленные полиамины приводят к увеличению как экспрессии генов биосинтеза, так и выхода конечного вторичного метаболита [3]. Известно, что эффекты полиаминов могут опосредоваться действием S-аденозил-L-метионин (SAMe) - зависимой метилазой гистонов *LaeA* [4], одним из универсальных транскрипционных регуляторов путей биосинтеза в нитчатых грибов [5,6]. Показано, что *LaeA* эпигенетически регулирует в грибах экспрессию генов дифференцировки и вторичного метаболизма через реорганизацию гетерохроматина [7]. В клетках *P.chrysogenum* уровень экспрессии *laeA* возрастает под действием экзогенных полиаминов, а нокадаун по этому гену приводит к значительному снижению продукции пенициллина [3]. Концентрация SAMe является центральной точкой регуляции при поддержании гомеостаза полиаминов и уровня метилирования в клетке. Эта регуляция обеспечивается, в том числе, работой фермента S-аденозин-L-метионин декарбоксилазы (*AdoMetDC*), концентрация которого у микроорганизмов, в свою очередь, регулируется по механизму отрицательной обратной связи спермидином и спермином. Таким образом, цель данной работы – изучение влияния полиаминов на биосинтез антибиотика цефалоспорина С в штаммах *A.chrysogenum*.

В работе использовали штаммы *A.chrysogenum* дикого типа (ATCC 11550) и полученный на его основе продуцент цефалоспорина С (VKM F-4081D) [8]. Влияние полиаминов на метаболизм *A.chrysogenum* оценивали тремя основными методами: 1) сравнение микро- и макроморфологии штаммов в ходе культивирования на твердой и жидких питательных средах; 2) определение уровня продукции цефалоспорина С в штамме VKM F-4081D. Профиль низкомолекулярных метаболитов анализировали после культивирования на ферментационной среде методом ВЭЖХ: СТАВ – ацетонитрил – ортофосфорная кислота – вода, хроматографическая колонка YMC-Pack ODS-A, детекция при 254 нм; 3) оценка уровня экспрессии генов регуляции и биосинтеза цефалоспорина С в клетках VKM F-4081D после культивирования на ферментационной среде методом ПЦР-РВ.

Влияние ДАП и СПД на рост и морфологию колоний штамма ATCC 11550. Чашечный тест показал, культивирование *A.chrysogenum* ATCC 11550 на плотной питательной среде (ППС) с 5 мМ полиаминами (как ДАП, так и СПД) оказывает стимулирующий эффект на скорость роста и пигментацию штамма ATCC 11550. Колонии гриба на средах с этим индуктором больше по размеру. При этом наблюдается более раннее образование характерной пигментной окраски по сравнению с ростом культуры в среде без индуктора. Наряду с этим добавление ДАП или СПД в концентрациях 0,25 мМ, 0,5 мМ и 1 мМ приводит к снижению числа колоний по сравнению с контролем.

Влияние ДАП и СПД на рост и морфологию колоний штамма ВКМ F-4081D. Посевной материал штамма ВКМ F-4081D представляет гетерогенную популяцию мицелия, находящегося на различных этапах жизненного цикла и обладающего различной степенью жизнеспособности (проростки молодого мицелия, фрагменты зрелого и отмирающего мицелия, отдельные микроколонии), также возможно присутствие конидий и артроспор. Соотношение этих морфологических форм определяется возрастом посевного материала и характеристикой питательного субстрата. После инкубации при 28°С в течение 12 дней среди выросших колоний наблюдается характерный полиморфизм (рис. 1).

Предполагается, потомки молодого мицелия, микроколоний, спор формируют полноценные колонии размером 1,5-2 мм; фрагменты зрелого и отмирающего мицелия формируют колонии размером 0,1-0,5 мм.

К 20-ти дням инкубации при 28°С все проросшие колонии достигают характерных размеров (5-7 мм) и морфологической формы (выпуклые с неровным краем, вершина в виде кратера, консистенция – рыхлая).

Добавление стимулирующей концентрации ДАП и СПД (5 мМ) приводит к увеличению числа колоний, вырастающих после 12 дней инкубации. Кроме того, практически отсутствует морфологическая гетерогенность популяции (рис. 1). При добавлении ДАП все колонии имеют размер 1,5-2 мм с характерной для контрольных образцов морфологией. Отсутствует популяция мелких колоний,

размером 0,1-0,5 мм. Добавление 5мМ СПД приводит к значительному увеличению размера всех колоний (до 5-7 мм).

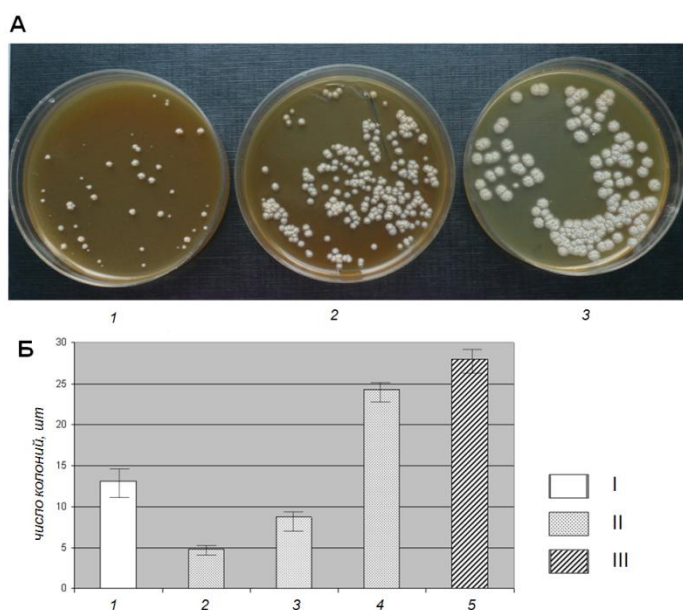
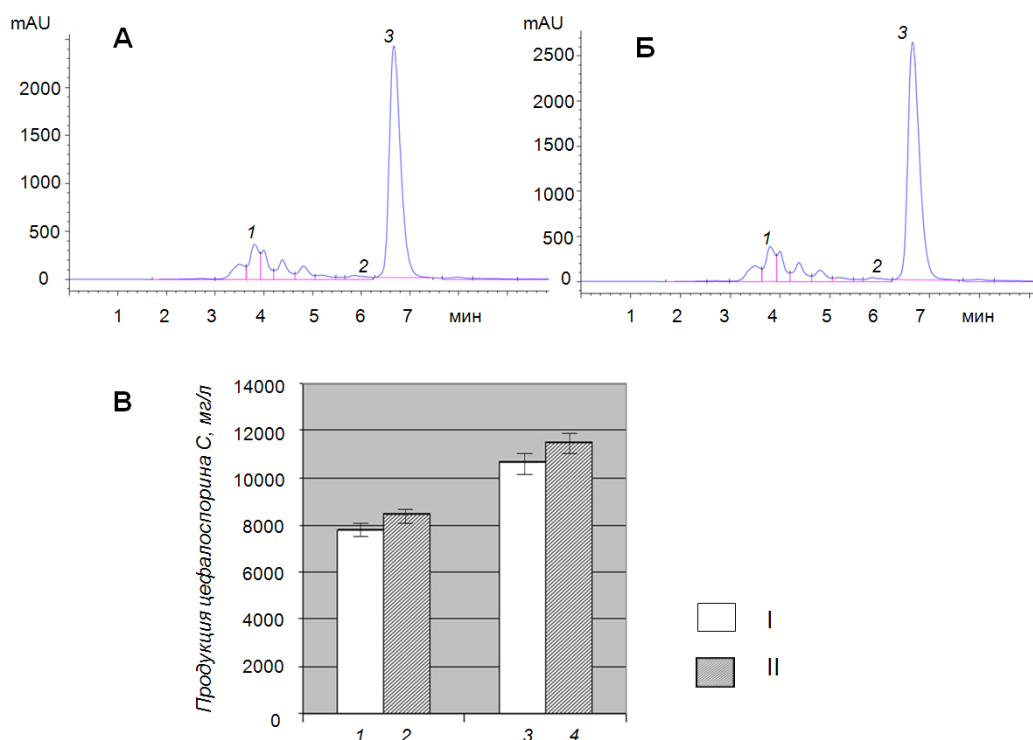


Рис. 1. Влияние полиаминов на рост *A. chrysogenum* VKM F-4081D после 12 дней культивирования при 28°C на твердой питательной среде без добавок (I), с добавлением ДАП (II) и спермидина (III). А – колонии VKM F-4081D на твердых питательных средах: 1 – без добавок, 2 – с добавлением 5мМ ДАП, с добавлением 5мМ СПД; Б - количество выросших колоний VKM F-4081D на среде: 1 - без добавок, 2 – 0.25мМ ДАП, 3 – 1 мМ ДАП, 4 – 5 мМ ДАП, 5 – 5 мМ СПД

Одновременно с этим существенно меняются их морфологические характеристики (форма колоний округлая с неровным краем, колонии кратерообразные, имеют бугристую поверхность, по консистенции колонии сухие, рыхлые); к 20-ти дням роста колонии существенно увеличиваются в размере (до 10-15 мм). Такой размер характерен только для штаммов *A. chrysogenum* дикого типа, и никогда ранее не наблюдался для его высокопродуктивного аналога. Выявленное стимулирующее действие полиаминов в концентрации 5мМ может быть связано с повышением прорастания мало-жизнеспособных форм *A.chrysogenum*. В результате число выросших колоний увеличивается на 60-120%, исчезают «мелкие», отстающие в

развитии колонии. Одно из возможных объяснений подобной активации связано со стимуляцией автофагии полиаминами, которая может приводить к «омолаживанию» мало-жизнеспособных посевных форм [1].



*Рис. 2. Влияние 5 мМ СПД на продукцию цефалоспорина С в клетках *A. chrysogenim* ВКМ F-4081D. А, Б - ВЭЖХ-анализ супернатантов культуральной жидкости после ферментации в течение 144 ч на среде без добавок (А) и с 5 мМ СПД (Б): 1 – дезацетилцефалоспорин С, 2 дезацетоксицефалоспорин С, 3 – цефалоспорин С. В – уровень продукции цефалоспорина С после культивирования на жидкой питательной среде без добавок (I) и в присутствии 5 мМ СПД (II): 1,2 – продукция цефалоспорина С после 96 ч культивирования, 3-4 - продукция цефалоспорина С после 144 ч культивирования*

Ферментация штамма ВКМ F-4081D с 5 мМ СПД приводила к повышению продукции цефалоспорина С на 6-8% после 96 ч и на 10-15% после 144 ч культивирования (рис. 2). При этом выход цефалоспорина С достигал 12000 мг/л.

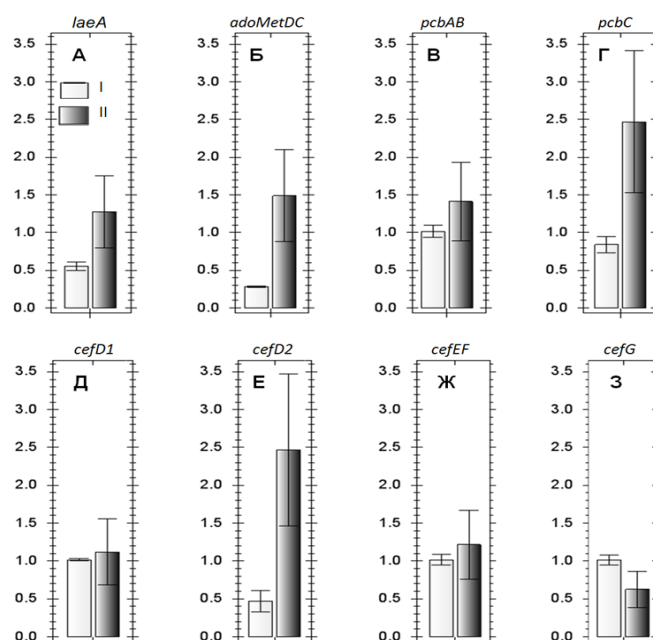


Рис. 3. Нормализованная экспрессия генов регуляции и биосинтеза цефалоспорина С в клетках *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D после 24 ч культивирования на ферментационной среде без индукторов (I) и содержащей 5 мМ СПД (II). А – нормализованная экспрессия гена *laeA*; Б - гена *adoMetDC*; В - гена *pcbAB*; Г - гена *pcbC*; Д – гена *cefD1*; Е – гена *cefD2*; Ж - гена *cefEF*; З - гена *cefG*

Алифатические полиамины (ДАП и СПД) способны оказывать стимулирующее воздействие на рост и прорастание штаммов *A. chrysogenum* различного происхождения на ППС. Ферментация штамма продуцента *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D с 5 мМ СПД приводит к повышению продукции цефалоспорина С на 10-15%. Этот эффект сопряжен с повышением уровня экспрессии регуляторных и биосинтетических генов метаболизма антибиотика цефалоспорина С.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-08-03672.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Kaeberlein M. Spermidine surprise for a long life. // Nat. Cell Biol. 2009. Vol. 11, № 11. P. 1277–1278.
2. Martín J. et al. The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine produce a drastic increase in the expression of the penicillin biosynthetic

genes for prolonged time, mediated by the *laeA* regulator. // *Fungal Genet. Biol.* 2012. Vol. 49, № 12. P. 1004–1013.

3. García-Estrada C. et al. The inducers 1,3-diaminopropane and spermidine cause the reprogramming of metabolism in *Penicillium chrysogenum*, leading to multiple vesicles and penicillin overproduction. // *J. Proteomics.* 2013. Vol. 85. P. 129–159.

4. Kosalková K. et al. The global regulator *LaeA* controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. // *Biochimie.* 2009. Vol. 91, № 2. P. 214–225.

5. Bok J.W., Keller N.P. *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. // *Eukaryot. Cell.* 2004. Vol. 3, № 2. P. 527–535.

6. Perrin R.M. et al. Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by *LaeA*. // *PLoS Pathog.* 2007. Vol. 3, № 4. P. e50.

7. Brakhage A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. Vol. 11, № 1. P. 21–32.

8. Патент RU2426793 C12P35/06, C07D501/02, C12R1/75. Способ биосинтеза цефалоспоринона С с использованием нового штамма *Acremonium chrysogenum* ВКМ F-4081D. 2011.

УДК 579.66

МИКРОИНКАПСУЛЯЦИЯ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ В БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОТРУБКИ ГАЛЛУАЗИТА

С.А. Коннова, Р.Ф. Фахруллин

Институт фундаментальной медицины и биологии, ФГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет
420021, г. Казань, ул. Парижской коммуны, 9, Svetaka14@gmail.com

Инкапсуляция индивидуальных живых клеток на сегодняшний день привлекает большое внимание, так как в дальнейшем возможно использование микроинкапсулированных клеток при создании клеточных биосенсоров, биореакторов, в биоэлектронике, тканевой инженерии, биоаналитической химии, а также в фундаментальных исследованиях клеточной биологии. Анализ литературы показал, что существуют исследования по микроинкапсуляции клеток микроорганизмов различными наноматериалами: полиэлектролитами, углеродными нанотрубками, наночастицами, неорганическими оболочками, например, фосфат кремния или карбонат кальция.

Наличие уникальных физико-химических свойств у нанотрубок галлуазит обуславливают их широкое практическое применение, в качестве контейнера для загрузки и высвобождения лекарственных веществ, нанореактора, антикоррозийного покрытия, сорбента (2). Биосовместимость и отсутствие цитотоксичности позволяют использовать нанотрубки галлуазит при создании гибридных систем на основе клеток и наночастиц.

Целью настоящей работы является разработка метода эффективной микроинкапсуляция клеток микроорганизмов нанотрубками галлуазит с помощью полиэлектролитных пленок.

Галлуазит – слоистый алюмосиликатный минерал. При микроскопическом наблюдении по структуре похож на полые трубки с внешним диаметром 50-80 нм, диаметр внутренней полости 1-30 нм и длина 100-2000 нм (4). Химическая формула нанотрубок: $Al_2Si_2O_5(OH)_4 \cdot nH_2O$, где $n < 4$. Химический состав галлуазита: Al_2O_3 – 34.7 %, SiO_2 – 40.8 %, H_2O – 24.5 % (1).

Одним из важных практических применений нанотрубок галлуазита является загрузка внутренней полости различными веществами: антикоррозийными соединениями, ферментами, антибиотиками и др. В статье Abdullayev и др. использовали серную кислоту (H_2SO_4) для увеличения диаметра внутренней полости. Серная кислота выборочно вытравляет слой алюминия внутри полости, используя разную химическую природу внешней и внутренней поверхности. В работе были определены условия реакции (температура, концентрация кислоты и галлуазита), которые позволяют выборочно вытравить внутреннюю часть трубок и приводящие к увеличению диаметра с 10-15 нм до 25-30 нм, сохраняя форму трубок и внешний диаметр. Увеличению диаметра полости нанотрубок приводит к увеличению количества загружаемых веществ (2).

Для микроинкапсуляции нами в качестве биологического объекта была использована культура пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* XII (коллекция кафедры микробиологии КФУ).

Модификацию клеток проводили парой стандартных противоположно заряженных ПЭ: положительно заряженным полиаллиламин гидрохлоридом (PAH) и отрицательно заряженным полистиренсульфонатом натрия (PSS), и нанотрубками галлуазит. В эксперименте качественной оценки эффективности микроинкапсуляции клеток использовали FITC-меченный PAH. Микроинкапсуляцию проводили методом послойного нанесения. Краткая схема метода представлена на рисунке 1.

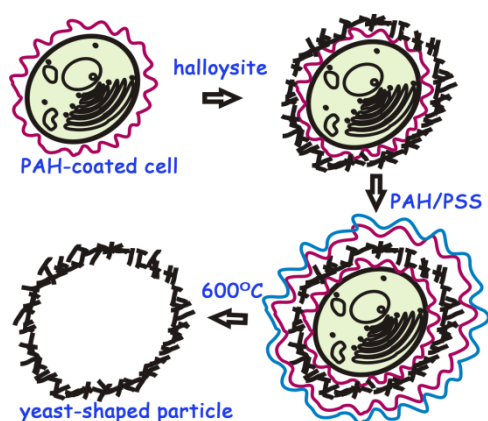


Рис. 1. Схема микроинкапсулирования клеток нанотрубками галлуазит и дальнейшее получение капсул путем термической обработки (5)

Микроинкапсулированные клетки дрожжей были охарактеризованы разными типами микроскопии: оптической и электронной (Рис. 2).

Первоначально характеристику инкапсулированных клеток проводили с помощью оптической микроскопии. На оптических микрофотографиях заметна шероховатая поверхность микроинкапсулированных клеток дрожжей по сравнению с интактными клетками. Для более детального исследования клеточной поверхности, модифицированной нанотрубками галлуазит, был применен метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). СЭМ позволяет исследовать поверхность образцов с высоким разрешением. На микрофотографиях (рис. 2) показано, что нанотрубки галлуазит равномерно покрывают поверхность клеток дрожжей *S. cerevisiae*.

На рисунке 2 (Б) очень хорошо видно, что нанотрубки галлуазита покрывают монослоем клеточную стенку дрожжей и водорослей. Возможно, это связано с тем, что полиэлектролитные слои обеспечивают эффективное и равномерное осаждение нанотрубок на поверхности клеток.

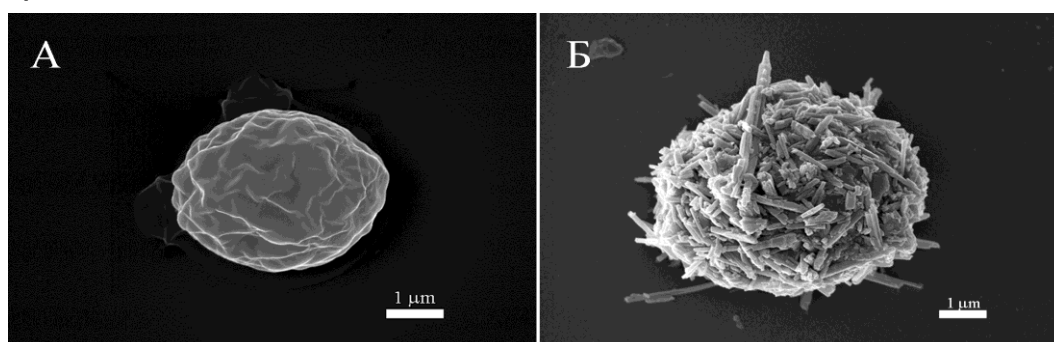


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия: клетки дрожжей А. интактная клетка и Б. модифицированная клетка

Для изучения распределения галлуазита внутри клетки нами был использован метод просвечивающей электронной микроскопии. Микрофотографии тонких срезов представлены на рис. 3.

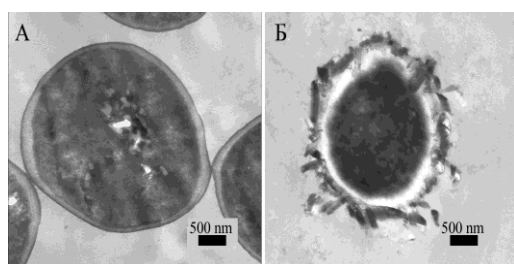


Рис. 3. Микрофотографии клеток дрожжей *S. cerevisiae*, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии: А. интактная клетка и Б. микроинкапсулированная

На основе микроскопических исследований можно сделать предварительный вывод о том, что метод послойного нанесения может рассматриваться в качестве эффективной методики микроинкапсуляции живых клеток в нанотрубки галлуазит.

Кроме выше описанных методов (микроскопия и измерение ζ -потенциала) для визуализации и характеристики инкапсулированных клеток использовали цитофлуориметрический анализ. Для проведения анализа получали микроинкапсулированные во флуоресцентно-меченые нанотрубки галлуазит клетки.

Из результатов проведенного цитофлуориметрического анализа (рис. 4) следует, что около 3% клеток остаются непокрытыми FITC-мечеными нанотрубками галлуазит после проведения микроинкапсуляции клеток дрожжей нанотрубками галлуазита.

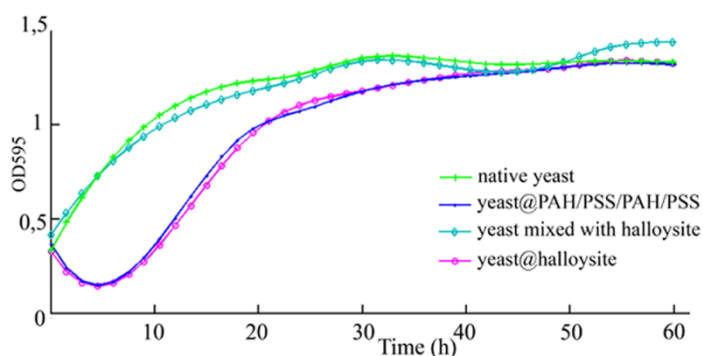


Рис. 4. Кривая роста S.cerevisiae. А. интактные клетки, Б. клетки, модифицированные PAH/PSS/PAH/PSS, В. смесь клеток и галлуазита, Г. клетки, модифицированные PAH/галлуазит/PAH/PSS

Для дальнейшего практического применения микроинкапсулированных клеток очень важно сохранение жизнеспособности, поэтому нами было дополнительно использовано еще несколько методов для характеристики физиологического состояния клеток. Один из таких методов – построение кривой роста, для исследования динамики роста клеток.

Из кривой роста (рис. 4) можно сделать вывод о наличии более продолжительной лаг-фазы у клеток, микроинкапсулированных

в нанотрубки галлуазит и в полиэлектролитные пленки PAH/PSS/PAH/PSS по сравнению с интактными клетками. Интересно, что дрожжи с интактной поверхностью, растущие в присутствии нанотрубок галлуазит по характеру роста не отличались от интактных клеток.

Это позволяет заключить, что нанотрубки не оказывают токсичного влияния на клетки, а причиной продления лаг-фазы у микроинкапсулированных дрожжей являются многослойные ПЭ-пленки на поверхности клеток. Вероятно, полиэлектролитные пленки являются преградой для транспорта веществ через мембрану и задерживают первое деление клеток, что ведет к удлинению лаг-фазы.

Количественный подсчет клеток, окрашенных FDA (флюоресцеиндиацетат) и PI (пропидий йодид), по оптическим микрофотографиям показал, что около 81% микроинкапсулированных в нанотрубки галлуазит клеток дрожжей *S. cerevisiae* остаются живыми.

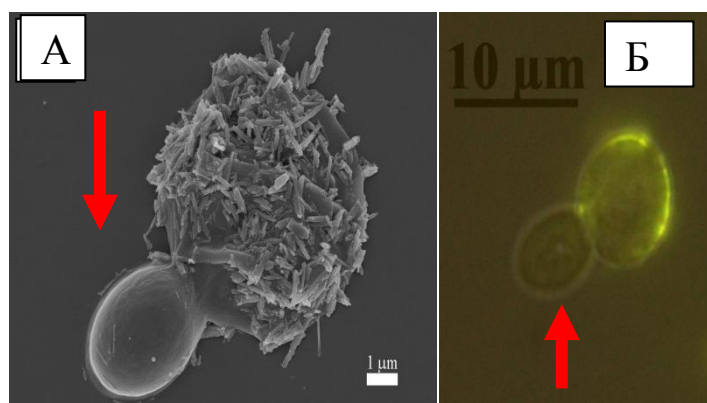


Рис. 5. А. микрофотография делящейся клетки дрожжей *S. cerevisiae*, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа, Б. наложение светлого поля и флуоресцентного изображения клеток дрожжей, покрытых FITC-меченым галлуазитом

На рис. 5 показано деление микроинкапсулированных клеток (стрелки указывают на новую дочернюю клетку). Клетки, покрытые нанотрубками галлуазит, имеют зеленую флуоресценцию на поверхности, обусловленную FITC-мечеными нанотрубками, дочерняя же клетка не флуоресцирует и, следовательно, на своей поверхности не имеет нанотрубок галлуазит.

В ходе проведения данной работы были микроинкапсулированы в нанотрубки галлуазит клетки дрожжей *S. cerevisiae*. Показано, что метод послойного нанесения является эффективной методикой для микроинкапсуляции живых клеток в нанотрубки галлуазит, а также показано, что микроинкапсуляция не влияет на рост и размножение клеток.

Работа поддержана фондом РФФИ 14-14-00924. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бетехтин, А. Г. Курс минералогии / А. Г. Бетехтин; Москва : КДУ, 2008. – 619с.
2. Abdullayev, E. Enlargement of halloysite clay nanotube lumen by selective etching of aluminum oxide / E. Abdullayev, A. Joshi, W. Wei, Y. Zhao, Y. Lvov // ACS nano. – 2012. – V.6. – P. 7216–7226.
3. Abdullayev, E. Clay nanotubes for corrosion inhibitor encapsulation: release control with end stoppers / E. Abdullayev, Y. Lvov // J. Mater. Chem. – 2010. – V.20. – P. 6681–6687.
4. Du, M. Newly emerging applications of halloysite nanotubes / M. Du, B. Guo, D. Jia // Polymer Intern. - 2010. - V.59. – P. 574-595.
5. Konnova, S.A Biomimetic cell-mediated three-dimensional assembly of halloysite nanotubes / Konnova, S.A., Sharipova I. R., Demina T., Osin Y. N, Yarullina D. R., Ilinskaya O. N., Lvov Y. M., Fakhrullin R. F. // Chem Commun.- 2013. – v. 49. – P. 4208-4210.

УДК 601.4 579.64

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *ARABIDOPSIS THALIANA*, С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ГЕНОМ ФИТАЗЫ *PANTOAE AGGLOMERANS*

Ч. Нямсурэн¹, Л. Р. Валеева¹, Д. С. Трошагина²,
Е.В.Шакиров², М. Р.Шарипова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет
420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская 18, *Chuka_ch@mail.ru*

²University of Texas at Austin, Section of Integrative Biology, Austin,
TX, 78712 USA

Получена новая гетерологичная система экспрессии гена фитазы *Pantoea agglomerans* для тканеспецифической экспрессии в эпителиях корней растений. Вектором трансформировали модельное растение *Arabidopsis thaliana*. Получены независимые гомозиготные линии, содержащие в геноме ген фитазы *P. Agglomerans* под контролем индуцибельного промотора *Pht1;2*.
Ключевые слова: бактериальная фитаза, *Pht1;2* промотор, *Arabidopsis thaliana*.

Одним из важных макроэлементов, необходимым для жизнедеятельности растений, является фосфор. Он играет ключевую роль в фотосинтезе и процессах, связанных с восстановлением энергии. В сельском хозяйстве широко применяют фосфорные удобрения, однако растения усваивают только 10-20% фосфатов, большая часть почвенного фосфора находится в недоступном для растений состоянии (Holfold, 1997). Поэтому важной проблемой для сельского хозяйства является возможность утилизации труднодоступных соединений почвы, обогащенных фосфором, таких как фитат. Растения самостоятельно не способны утилизировать фитаты до легко усваиваемых компонентов - остатков фосфорной кислоты и мио-инозитола. [Ma *et al.*, 2012; Singh, Satyanarayana, 2011]. Ферменты фитазы микробного происхождения способны переводить фосфор из фитатов в доступные неорганические соединения. Поэтому поиск микроорганизмов, гены фитаз, которых будут использованы для создания трансгенных растений с улучшенными свойствами, является актуальным. Целью работы явилось получение генетически модифицированных растений *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующих бактериальный ген фитазы *Pantoea agglomerans*.

Нуклеотидную последовательность гена бактериальной фитазы *phyCg* оптимизировали для повышения уровня экспрессии в растениях *A. Thaliana* (<http://www.jcat.de/>). Оптимизированный ген бациллярной фитазы клонировали в бинарный вектор *pCBK05* под контролем растительного промотора *Pht1;2*. Экспрессия промотора *Pht1;2* происходит в эпителиальных клетках корней *A. thaliana* и индуцируется недостатком неорганического фосфора в ризосфере (Mudge *et al* 2002). Рекомбинантная конструкция содержала последовательности, кодирующие сигнальный пептид растительного

белка экстенсина AtExt3, необходимого для секреции фермента в ризосферу, и 3'-концевые His- и Strep- последовательности для эффективной детекции и очистки белка (рис. 1).

Полученную конструкцию клонировали в вектор pCBK05 по сайтам рестрикции *Pst*I и *Spe*I и вектор трансформировали в агро-бактерии методом электропорации.

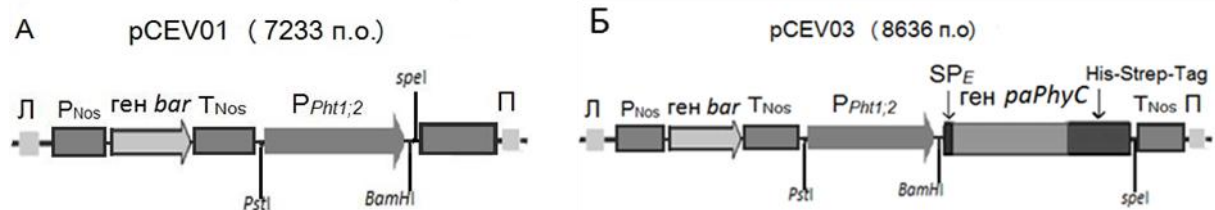


Рис. 1. Бинарные T-ДНК плазмиды для трансформации растений *Arabidopsis*. А – pCEV01 с растительным промотором *Pht1*; Б – pCEV03 с промотором *Pht1;2* и геном фитазы *P. agglomerans*. *Ppht1;2* – промотор *Pht1;2* эпителиальных клеток корней растений *A. thaliana*; *SPE* – последовательность сигнального пептида растительного гена экстенсина; *Tnos* - терминатор гена нопалинсинтазы; *His-Strep-Tags* – 3'-концевые последовательности пептидных тегов; ген *bar* – ген устойчивости к селективному гербициду BASTA под контролем *Pnos* промотора и *Tnos* терминатора гена нопалинсинтазы; П и Л – правая и левая фланкирующие последовательности T-ДНК, соответственно; *Pst*I, *Bam*HI, *Spe*I – сайты рестрикции

Проводили трансформацию *A. Thaliana* рекомбинантными бактериями *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Clough and Bent, 1998). Селекцию трансформантов проводили на среде MS (Murashige-Skoog) с добавлением гербицида BASTA. Из семян растений, трансформированных вектором с бактериальной фитазой *P. agglomerans*, получили 36 трансгенных растений (G2 линия), для 12 из которых наличие гена фитазы подтверждено методом ПЦР (рис. 2). У 5 из 12 линий растений второго поколения (T2), несущих ген *P. agglomerans*, расщепление по селективному признаку составило 3:1 (единичная вставка) (таблица 1). В поколении T3 получили 3 линии растений, гомозиготных по гену микробной фитазы (линии G2-5-1, G2-1-4, G2-19-1). Также получено в качестве нулевого контроля 3 гомозиготных растения, несущих про-

мотор Pht1;2 (A1-1-1, A1-2-5 A1-4-12).

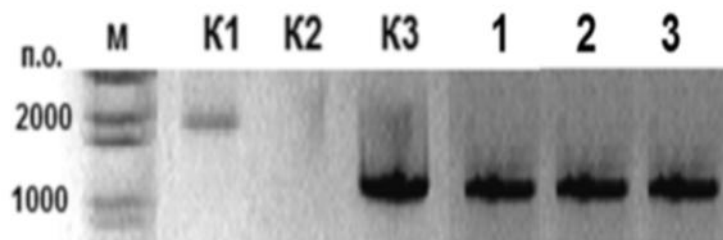


Рис. 2. Электрофорез продуктов амплификации ДНК трансгенных растений T1 поколения с геном бактериальной фитазы под управлением промотора Pht1;2. М -маркер; К1 -ДНК WT с праймерами к промотору Pht1;2 (положительный контроль); К2 -ДНК WT с праймерами к гену фитазы (отрицательный контроль); К3 - ДНК плазмиды rCEV03 с праймерами к гену фитазы (положительный контроль); 1-3 ДНК трансгенного растения с праймерами к гену фитазы *P. agglomerans*. Ожидаемые размеры продуктов ПЦР с праймерами к генам фитаз около 1300 п.о.

Таблица 1. Анализ устойчивости к гербициду BASTA трансгенных растений, трансформированных вектором на основе промотора Pht1;2

Трансгенные растения первого поколения T1	Соотношение устойчивых/чувствительных к гербициду растений в T2	Предполагаемое количество копий Т-ДНК в геноме каждой линии
G2-5	131/39 (3:1)	1
G2-1	58/17 (3:1)	1
G2-19	61:26 (3:1)	1
A1-1	67/24 (3:1)	1
A1-2	213/72 (3:1)	1
A1-4	55/19 (3:1)	1

G2 – линии трансгенных растений, несущих гены фитазы *P. agglomerans*;

A1 – линия трансгенных растений, не несущих гена фитазы.

Таким образом, нами получены гомозиготные трансгенные растения с геном микробной фитазы. Биотехнология, основанная на

экспрессии бактериальных фитаз в растениях, может играть существенную роль для решения проблемы фосфорного питания растений в условиях ограниченного применения минеральных фосфорных удобрений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Clough, S.J. Floral dip: a simplified method of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* / S.J. Clough, A. F. Bent // *The Plant Journal* – 1998. – V.16(6). – P. 735-743.
2. Ma, X.-F. Transgenic expression of phytase and acid phosphatase genes in alfalfa (*Medicago sativa*) leads to improved phosphate uptake in natural soils / X.-F.Ma, S. Tudor, T. Butler, Y. Ge, Y. Xi, J. Bouton, M. Harrison, Z.-Y. Wang // *Mol. Breeding*. – 2012. – V. 30. – P. 377–391.
3. Mudge S.R. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis* / S.R. Mudge, A.L. Rae, E. Diatloff, F.W. Smith // *Plant J.* – 2002. – V. 31(3). – P. 341 – 353.
4. Singh, B. Satyanarayana, T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion / B. Singh, T. Satyanarayana // *Physiol. Mol. Biol. Plants*. – 2011. – V. 17. – P. 93–103.

УДК 57.052

НОВЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В ГЕНОМЕ *BACILLUS PUMILUS*

Н.Л. Рудакова, О.С. Митрофанова, Л. Т. Динь, Н.П. Балабан,
М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, г. Казань, ул. Кремлевская,18, natalialrudakova@mail.ru

В геноме B. pumilus 7P идентифицированы 2 гена металлопротеиназ: секретуемой (mprBp) и мембраносвязанной (ptbBp). Секретуемая металлопротеиназа относится к семейству адамализиноподобных металлопротеиназ клана метцинкинов (AN EU

678894). На основании конвертированной аминокислотной последовательности мембранос-вязанная металлопротеиназа отнесена к семейству M50 (MEROPS), представители которого являются регуляторными белками. Предполагается, что обе металлопротеиназы, *MprVp* и *PtbVp*, выполняют регуляторные функции в клетках бацилл и, по-видимому, относятся к одному оперону.

Ключевые слова: металлопротеиназа, секвенирование, структура гена, семейство M50

Адаптация микроорганизмов к внешним условиям – сложно координированный процесс. В него вовлечено множество ферментов, действующих как снаружи, так и внутри клетки. Многие из регуляторных белков, вовлеченных в общие глобальные процессы клетки, такие как споруляция или вирулентность, работают в тесной связи друг с другом, что может обеспечиваться их совместной экспрессией на уровне оперона. Такие группы регуляторных белков прокариот могут являться удобными моделями для изучения путей регуляции, сравнительных исследований гомологичных генов других микроорганизмов, а также для медицински значимых эукариотических гомологов.

Штаммы бактерий, векторы и среды культивирования. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, приведены в табл.1. Клетки *B. pumilus* и *B. subtilis* выращивали на среде LB при 37 °С.

Анализ промоторной области гена *pmbVp* проводили с помощью программы BPRM (<http://linux1.sotberry.com/berry.phtml>).

Протеолитическую активность металлопротеаз по гидролизу азоказеина, а также **локализацию ферментов** в клетке проводили по методикам, описанным в [Sabirova et al, 2010].

Выравнивание аминокислотных последовательностей ферментов семейства M50 проводили по помощи NCBI BLAST сервера (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Фрагмент геномной ДНК *B. pumilus* 7P длиной в 6 кБ, клонированный на плазмиде pCM4 в протеазодефицитный штамм *B. subtilis* BG 2036 содержал 6 генов, два из которых - металлопротеиназы: *mprVp* и *pmbVp* (рис 1) [Сабилова с соавт., 2010].

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Штамм или плазмида	Характеристика	Источник
<i>Bacillus pumilus</i> 7p	Штамм дикого типа, Str ^R	Коллекция К(П)ФУ
<i>Bacillus subtilis</i> BG 2036	Протеазодефицитный штамм	Е. Феррари (E. Ferrari), Genencor Int. Inc. USA
pCM4	Фрагмент ДНК <i>B. pumilus</i> 7p длиной 6 т.п.н. на плазмиде pCB22	С.В. Костров, ИМГ РАН



Рис. 1. Схема расположения открытых рамок считывания, идентифицированных во фрагменте геномной ДНК *B. pumilus*.

Рамки считывания обозначены стрелками

Анализ протеолитической активности рекомбинантного штамма в присутствии специфических ингибиторов сериновых и металлопротеиназ в культуральной жидкости и в мембранной фракции показал, что в обеих фракциях присутствует металлопротеазная активность (табл. 2). Максимумы активностей приходятся на 28-32 часа роста культуры рекомбинантного штамма.

Таблица 2. Протеолитическая активность рекомбинантного штамма *B. subtilis* (pCM4) в присутствии специфических ингибиторов на 30 ч роста

Клеточная фракция	Активность, ед/мг	Остаточная активность в присутствии ингибиторов, %	
		PMSF, 10 мМ	Офенантролин, 10 мМ
Культуральная жидкость	1,324	99,2	0,1
Мембранная фракция	0,0087	87	12

```

1  tgctacggcatagtggtctttttcatttcttcaataatgacagagacttttctgcacc
61  tgcgcctgtgtttcaacaacagcatcagtgactttctccacaagagctctttctgctc
121 gtcgttcttccttctagcatttgaacggtgacaatcggcaatgcgaaaacctctttt
181 cctttctgtctacgcttcccttgagtttaagggacttcttatagtataatgaatgaagt
                                -35                                -10
241 aaatcattgtatagaaagaaagaggggattatgcctttggaccaatttctgtgtatcca
      +1      RBS      M P L D Q F L V Y P
301 ttagaactgattccatatgtcgccattacactgtgttgctattacgatgcacgagctg
      L E L I P Y V A I T L V V A F T M H E L
361 gcgcatgcatatgttgcgtatcgtttcggagacccgacagctaagaaccaagggagactc
      A H A Y V A Y R F G D P T A K N Q G R L
421 acgctaaatccactgaagcatctcgatatattcgggacgattttaatctttgtcgctggg
      T L N P L K H L D I G T I L F I F V A G
481 tttgctgggcgaaacctgtgccggtgaatcgataaccattttaaaaaaccgcgcttagca
      F G W A K P V P V N R Y H F K K P R L A
541 ggaatctgcgtctcgattgctggcccattaagtaacttggtgtggcgtttctaggcttt
      G I C V S I A G P L S N L V L A F L G F
601 ttcgtgtacgtgcttctcagaaattggcggggagtcgctcatgcgctttgagccggggc
      F V Y V L L Q K F G G E S L M R F E P G
661 gtcgataatttttcttaatctttattaactgaatgtcattttgttctatttaaccta
      V D N F F L I F I N L N V I L F L F N L
721 ttgccactccgcccgtggatgggtatcgattattgaggacgtcgtcagctccccgatc
      L P L P P L D G Y R I I E D V V S P R I
781 cgggcgaaaatgacgcaattcgaacaatatgggatcattattttctcatattcgtgatt
      R A K M T Q F E Q Y G I I I F L I F V I
841 acgccgctaggacagttgttttggtccattgatcggaatgcgggatcaaatcatatac
      T P L G Q F V F G P L I G M R D Q I I Y
901 tggtttaatcttattttgaaaccgctgctttaggagggtctaatgaatggaaggtaaaaaa
      W F N L I L K P L L *
961 aagaaaccaattggttttaacatcattaaaaaacagatgcaaccgacggttacggggggc
1021 tttggagcgggtgcgctcagccttgataaacatttcgccagtgatcattgacgtagaggaa

```

*Рис. 2. Нуклеотидная последовательность гена *rtbVp*. Области -10, -35 обозначены курсивом, последовательность Шайна-Дальгарно обозначена RBS и подчеркиванием. Звездочкой отмечен стоп кодон. Предположительные терминаторы транскрипции подчеркнуты*

Последовательность нуклеотидов гена мембраносвязанной металлопротеиназы *rtbVp* представлена на рис. 2. Старт-кодон гена *rtbVp* отстоит от стоп-кодона предыдущего гена *mprVp* на 333

н.о. Анализ промоторной области гена *pmbBp* показал наличие основных сайтов регуляции: области -10 и -35, последовательность Шайна-Дальгарно и RBS. Однако предварительные эксперименты по субклонированию гена без подстановки чужого промотора показали отсутствие экспрессии *pmbBp*. Этот факт указывал, что ген этой протеиназы экспрессируется в составе оперона, включающего протеазу *mprBp*.

В конвертированной аминокислотной последовательности белка PmbBp мы идентифицированы консервативные последовательности, свидетельствующие, что фермент является мембрано-связанной металлопротеиназой семейства M50 (MEROPS). Мембрано-связанные металлопротеиназы M50 – это белки, состоящие из трансмембранных сегментов, пронизывающих цитоплазматическую мембрану. Гомология первичных последовательностей представителей данного семейства крайне низкая (рис. 3). Высокой гомологией характеризуются только консервативные области структурных доменов. В структуре фермента они обладают высокой гидрофильностью и являются классификационно значимыми регионами.

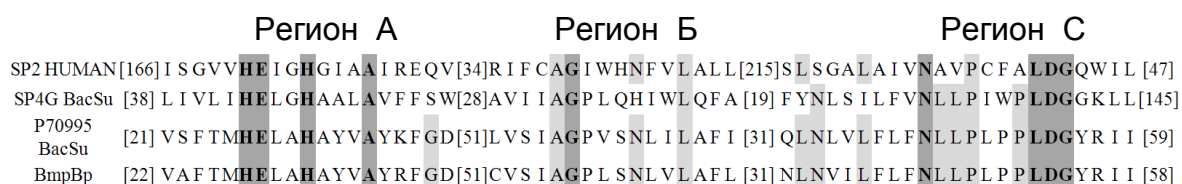


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей металлопротеиназ семейства M50. Консервативные домены, присутствующие у всех представителей семейства M50, обозначены как регионы А, Б и С. Высококонсервативные аминокислоты доменов выделены жирным шрифтом на темно-сером фоне, аминокислоты с высокой гомологией – на светло-сером фоне. Аминокислотные последовательности выровнены относительно региона А, числами указаны расстояния от региона Б до региона С и до С-конца молекулы белка [Lewis et al., 1999]

Семейство M50 объединяет регуляторные белки. Одним из бациллярных гомологов PmbBp является металлопротеиназа SpoIVFB. Продукт гена *spoIVFB* участвует в споруляции у бацилл. Он инициирует протеолитический процессинг предшественника σ^K -фактора транскрипции – регуляторного белка, обеспечивающего

строгую очередность процессов дифференцировки материнской клетки и проспору [Kinch et al., 2006].

Широкое распространение белков семейства M50 в бактериях, включая патогенные микроорганизмы, предполагает участие регуляторных мембраносвязанных протеаз в микробном патогенезе. Имеются данные, свидетельствующие о взаимосвязи этих ферментов у *V. cholera* и *M. tuberculosis* с механизмом патогенеза этих бактерий. Установлено, что протеазы YaeL (*V. cholera*) и Rv2869c (*M. tuberculosis*) контролируют экспрессию генов вирулентности [Bhatt et al., 2005; Rachman et al., 2006], что представляет практический интерес к этим белкам.

В геноме *B. pumilus* идентифицированы две последовательно расположенные металлопротеиназы. Первая (*mprBp*) является секретрируемой и относится к семейству адамализиноподобных метцинкинов. Прокариотических гомологов этот фермент не имеет, а эукариотические гомологи являются в большинстве регуляторными белками, отвечающими в организме высших млекопитающих за дифференцировку тканей, эмбриогенез и метастазирование [Gomis-Rüthet et al., 2003; Walasek et al., 2005; Ge et al., 2006; Sterchi et al., 2008]. Вторая металлопротеиназа (*pmbBp*) является мембраносвязанной и относится к семейству M50, представленному регуляторными белками, участвующими в дифференцировке, патогенезе и формировании факторов вирулентности [Makinoshima et al., 2005; Matson et al., 2005]. Экспрессируются гены обоих ферментов одновременно и, по-видимому, составляют единый оперон.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Балабан Н.П., Рудакова Н.Л., Сабирова А.Р., Шарипова М.Р. Новая адамализиноподобная микробная металлоэндопептидаза // Биоорганическая химия. – 2012. – Т.38, № 4. – С.1-8.

2. Сабирова А.Р. Шарипова М.Р. Структурная организация гена металлоэндопептидазы *Bacillus intermedius* // Уч. зап-ки Каз. ун-та., 2010, Т.152, кн 2, С. 155-165.
3. Bhatt A., Kremer L., Dai A.Z., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. Jr. Conditional depletion of KasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis // J. Bacteriol., 2005, V.187,(22), P.7596-7606.
4. Ge G., Greenspan D.S. Development roles of the BMP1/TLD metalloproteinases // Birth Defects Research (Part C), 2006, V.78, P.47-68.
5. Gomis-Rüth, F.-X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases // Mol. Biotechnology, 2003, V.24, P.157-202.
6. Kinch L.N., Ginalski K., Grishin N.V. Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: Sequence homologs suggest an ancient signaling cascade // Protein Sci., 2006, V15,(1), P.84-93.
7. Lewis A.P., Thomas P.J. A novel clan of zinc metallopeptidases with possible intramembrane cleavage properties // Protein Sci., 1999, V.8,(2), P.439-442.
8. Makinoshima H., Glickman M.S. Regulation of Mycobacterium tuberculosis cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis // Nature, 2005, V.436,(7049), P. 406-409.
9. Matson J.S., DiRita V.J. Degradation of the membrane-localized virulence activator TcpP by the YaeL protease in Vibrio cholera // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, V.102,(45), P.16403-16408.
10. Rachman H., Strong M., Ulrihs T., Grode L., Schuchhardt J., Mollenkopf H., Kosmiadi G.A., Eisenberg D., Kaufmann S.H. Unique transcriptome signature of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary tuberculosis // Infect. Immun., 2006, V.74,(2), P.1233-1242.
11. Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Il'inskaya O.N., Demiduyk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. A novel secreted metalloproteinase *Bacillus intermedius* – the first adamalysin-like enzyme from bacilli // FEBS letters, 2010, V.584, №21, P. 4419-4425.
12. Sterchi E.E., Stöcker W., Bond J.S. Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinase // Molecular Aspects of Medicine, 2008, V.29, P.309-328.

13. Walasek P., Honek J.F. Nonnatural amino acid incorporation into the methionin 214 position of the metzincin pseudomonas aeruginosa alkaline protease // BMC Biochemistry., 2005, V.6,№21, doi:10.1186/147-2091-6-21.

УДК 57.084.1 578.74

БИОТЕХНОЛОГИЯ И НОВЫЕ ВАКЦИНЫ

Р.К.Саляев¹, Н.И.Рекославская^{1,2}, А.С.Столбиков^{1,2},
А.В.Третьякова^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, Россия, г.Иркутск, улица Лермонтова, 132 salyaev@sifibr.irk.ru

телефон: 8-(3952)-424658

факс: 8-(3952)-510754

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение Иркутский государственный университет
664003, Иркутская область, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1

В докладе рассмотрены современные представления об индукции мукозального ответа при вакцинации инновационными пероральными профилактическими и терапевтическими вакцинами на основе трансгенных растений против опасных инфекционных заболеваний. Приведены результаты, полученные авторами, по созданию кандидатных профилактических вакцин: бивалентной вакцины против ВИЧ-СПИДа и гепатита В, вакцины против гепатита В и цервикального рака. Рассмотрены вероятные механизмы индукции иммунного ответа при превентивной (профилактической) и терапевтической вакцинации.

Библиогр. 4 назв.

Ключевые слова: профилактические и терапевтические вакцины, индукция иммунного ответа, высокоонкогенные типы папилломавируса, инновационные вакцины на основе растений

Начиная с 1796 года, когда Э.Дженнеру удалось впервые осуществить вакцинацию против оспы, более двух веков человечество использует вакцины против многих опасных заболеваний. Сами вакцины постоянно совершенствуются с целью повышения их эффективности, безвредности для здоровья и уменьшения побочных эффектов. С развитием молекулярной биологии и современных биотехнологических методов интенсивность работ над новыми вакцинами все возрастает.

Для производства вакцин широко применяются различные экспрессирующие системы, в которые вводятся генетические конструкции с целевыми генами, кодирующими синтез специфических антигенных белков. В качестве экспрессирующих систем используют дрожжевые клетки, бактерии, клетки насекомых и некоторые другие. Успешно развивается использование растительных экспрессирующих систем, на базе которых можно создавать вакцины перорального применения, которые обещают быть более безвредными и не требующими инъекционного введения.

В первые годы разработки такие вакцины назывались «съедобными», теперь все чаще называются «мукозальными», так как первичное взаимодействие антигенных белков вакцины осуществляется через специфические структуры слизистых оболочек кишечника (так называемые Пейеровы бляшки), имеющих достаточно сложную тканевую и клеточную структуру, включающую ряд специализированных М-клеток, содержащих дендритные клетки, воспринимающие антигены и презентующие их к Т хелперам, которые запускают как мукозальный через Th1 хелперы, так и общий гуморальный ответ путем выделения клетками Th2 группы цитокинов, обуславливающих этот процесс. Происходит также «созревание» В-лимфоцитов в антителообразующие клетки, при этом синтезируется как иммуноглобулин А, так и IgG.

Ряд мукозальных вакцин уже разработан, в частности, против пандемического и сезонного гриппа, вируса Норволка, гепатита В, вируса бешенства, холеры и некоторых других, проходящих в настоящее время испытания.

Нашей группой в 2004 году совместно с ГНЦ «Вектор», Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также лабораторией патологии (США) была впервые разработана

бинарная кандидатная вакцина одновременно против ВИЧ-СПИДа и гепатита В на основе химерного гена TBI-HBs [4], затем была разработана кандидатная вакцина против гепатита В на основе трансгенных растений томата [1]. На рисунках 1 и 2 показан иммунный ответ мышей после перорального введения вакцин против ВИЧ и гепатита В. Видно, что, как в фекалиях (рис. 1), так и в сыворотке мышей (рис. 2) наблюдается четкий иммунный ответ.

В настоящее время нами разрабатывается еще одна кандидатная вакцина на основе трансгенных растений против онкогенных серотипов вируса папилломы человека (ВПЧ), вызывающих цервикальный рак.

Нужно сказать, что к настоящему времени уже разработаны две вакцины против цервикального рака. Одна из них «Гардасил» создана на основе экспрессирующей системы дрожжей (компания MSD). Вакцина применяется путем трехкратной инъекции в дельтовидную мышцу. Она несколько лет проходит клинические испытания и уже находит применение в ряде стран.

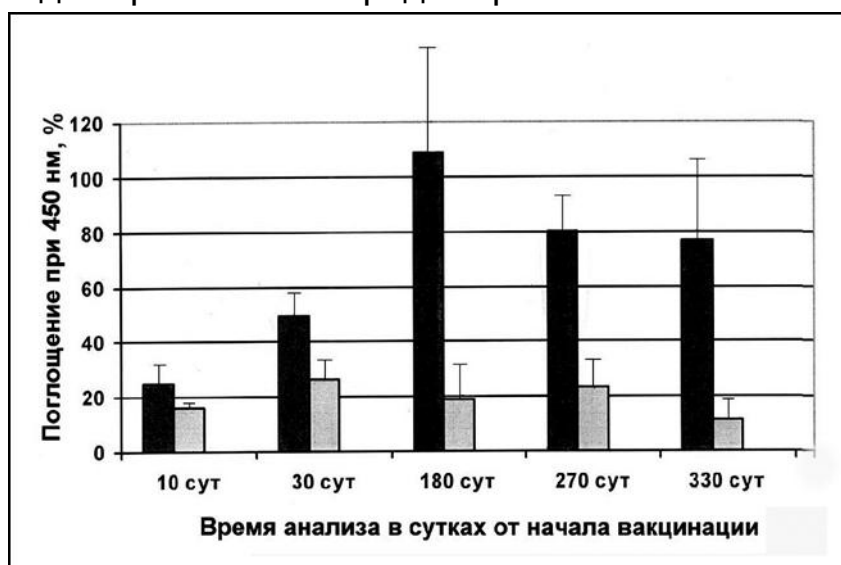


Рис. 1. Динамика содержания антител к HBs в образцах фекалий вакцинированных TBI-HBs из плодов трансгенного по гену TBI-HBS томата и контрольных мышей.

Чёрные столбцы – вакцинированные мыши, серые столбцы – контрольные мыши

Вторая вакцина «Церварикс» (компания GSK) также проходит широкие клинические испытания. Вакцина бинарная инъекционного

типа, создана на основе экспрессирующей системы клеток насекомых. Схема вакцинации также трехкратная.

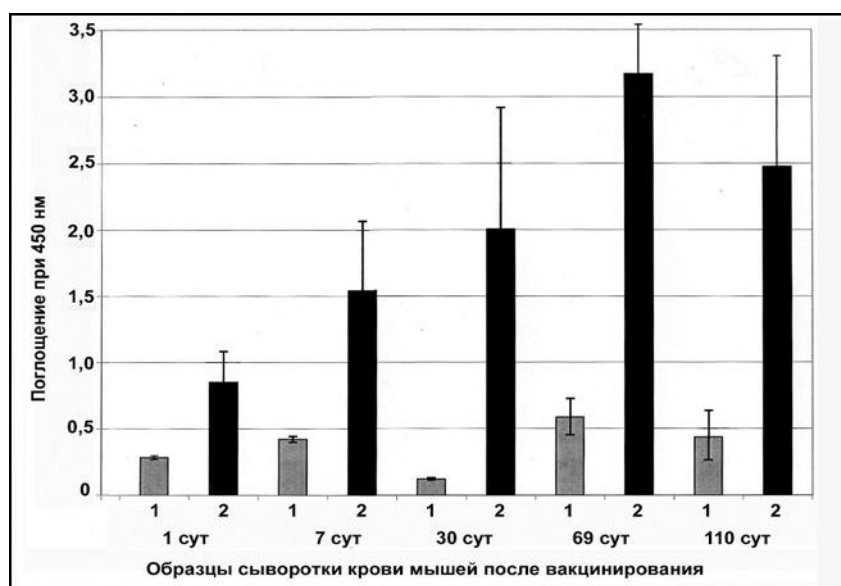


Рис. 2. Динамика содержания антител к PreS2-S ВГВ в сыворотке крови контрольных мышей (1) и в сыворотке крови вакцинированных мышей (2).

Указано время в сутках от первого вакцинирования

Создание указанных вакцин вселяет надежду, что в относительно близком времени будет создано эффективное профилактическое средство против онкогенных папилломатозов. Однако использование экспрессирующих систем на основе дрожжей и клеток насекомых, а также введение путем инъекции, возможно, обуславливает появление некоторых побочных эффектов, которые выявляются после вакцинирования.

По этой причине, используя ранее накопленный опыт создания кандидатных вакцин на основе трансгенных растений, мы приступили к разработке мукозальной вакцины перорального применения против цервикального рака. Вакцина разрабатывается на основе «позднего» гена *hvp16 L1*, помещенного в генетическую конструкцию плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. В генетическую конструкцию целевой ген *hvp16 L1* помещен под промотор *p35SCaMV*, также в регуляторную часть конструкции помещена последовательность омега лидера вируса табачной мозаики 5'НТО Ω ВТМ, являющаяся эффективным усилителем (энхансером) транс-

ляции [2, 3]. В качестве терминатора использовали tocs гена октопинсинтазы из ТДНК агробактерии, а также присутствовал поли (А) сигнал в 3' регуляторной области.

Используя эту конструкцию для генетической трансформации растений за счет последовательности омега лидера 5' НТО Ω ВТМ удалось повысить выход антигенного белка HPV16 L1 до 700-1500 нг на 1 мг общего растворимого белка, что является вполне достаточным для дальнейших испытаний иммуногенности вакцины на подопытных животных.

В последние годы особое внимание в вакцинологии уделяется созданию «терапевтических» типов вакцин, которые могли бы наряду с профилактическими применяться как терапевтические средства против различных, в том числе онкологических, заболеваний. В этих исследованиях используются различные подходы, от облученных аутологичных раковых клеток до фрагментов ДНК патогена, введения синтетической ДНК вирусов и использования синтетических пептидов, характерных для опухолевых клеток.

Однако, несмотря на интенсивно ведущиеся разработки, стабильные результаты при использовании терапевтических вакцин, очевидно, следует ожидать в ближайшем или более отдаленном будущем. Это объясняется тем, что работы над терапевтическими вакцинами начались сравнительно недавно – в 2006 - 2008 годах, а также недостаточной изученностью самого механизма действия терапевтических вакцин при разных заболеваниях.

Из наиболее вероятных механизмов воздействия на раковые клетки терапевтических вакцин при пероральном введении можно считать их действие на увеличение количества активированных Т лимфоцитов - киллеров, избирательно уничтожающих опухолевые клетки (рис. 3).

Как видим из рисунка 3, вначале на поверхности дендритных клеток происходит презентация антигенов с помощью главных комплексов гистосовместимости I и II Т киллерам и Т хелперам. Праймированные CD8+ Т лимфоциты киллеры, активированные CD4+ Т лимфоцитами хелперами, уничтожают опухолевые клетки.

В нашем случае при работе с онкогенным вирусом папилломы человека для создания терапевтической вакцины чаще всего используются ранние гены вирусной ДНК - ген *hpv16 E7* и ген *hpv18*

E7, кодирующие соответствующие онкогенные белки, а также гены, кодирующие белки E6 и E2.

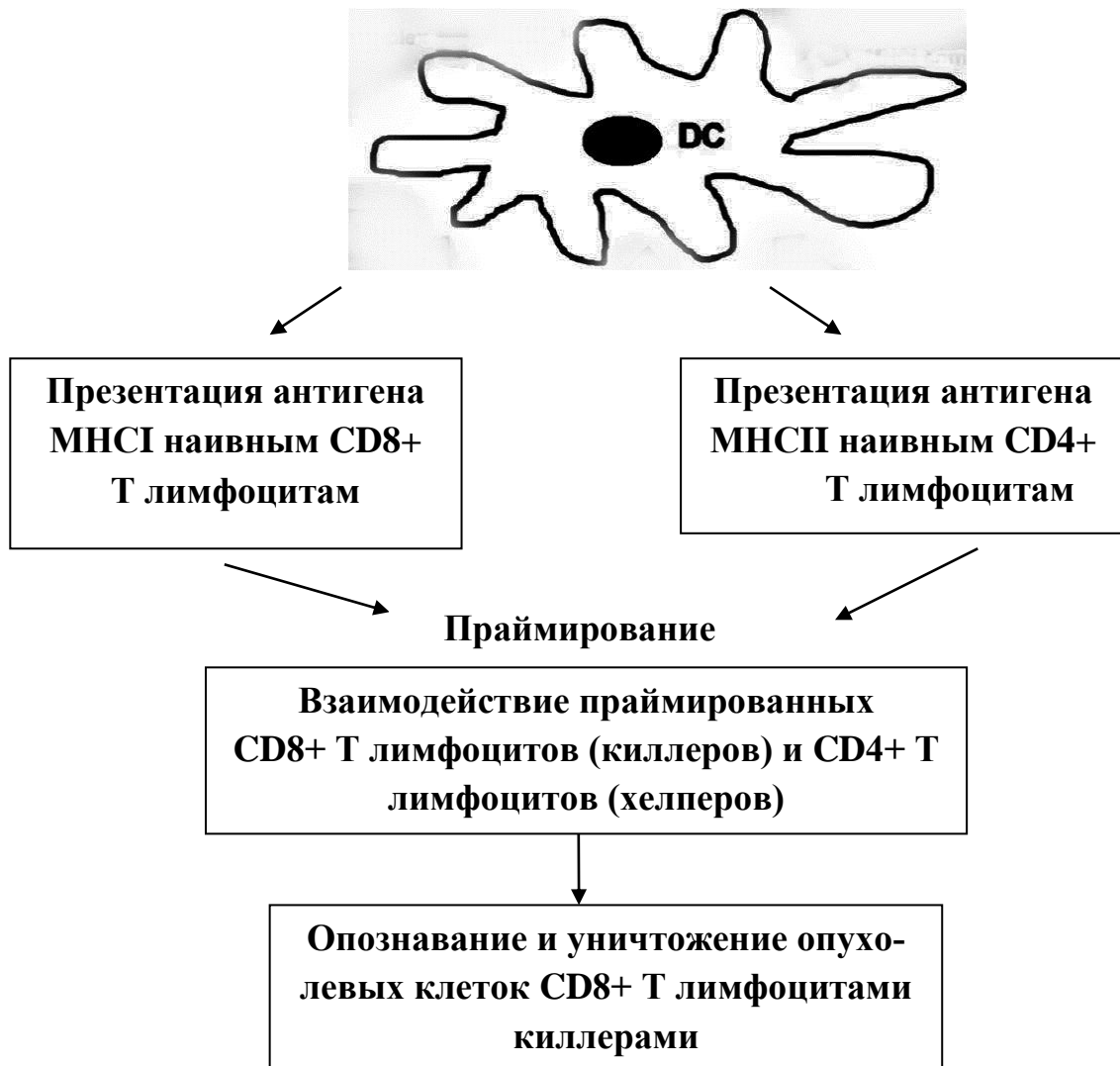


Рис. 3. Схема уничтожения опухолевых клеток CD8+ Т лимфоцитами киллерами. Обозначения: МНС I – главный комплекс гистосовместимости I. МНС II – главный комплекс гистосовместимости II. CD8+ Т лимфоциты – киллеры. CD4+ Т лимфоциты – хелперы. CD8+ и CD4+ – соответствующие корцепторы. DC – дендритная клетка

В 2014 году мы начали работу с геном *hprv16* E7, кодирующим ранний белок E7. К настоящему времени разработана генетическая конструкция, пригодная для пероральной доставки плазмиды, содержащей целевой ген E7, в растительные экспрессирующие системы через *A.tumefaciens*.

Первые эксперименты показали, что созданная генетическая конструкция обеспечивает экспрессию целевого гена *hprv16 E7* и синтез антигенного белка HPV16 E7 в трансгенных растениях приагробактериальной трансформации.

Подводя итог всему изложенному, можно сделать вывод о том, что новые биотехнологии, использующие методы молекулярной биологии и генной инженерии, открыли новые возможности в создании новых типов профилактических и терапевтических вакцин, работа над которыми интенсивно ведется во многих странах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Салаяев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С., Третьякова А.В. // Доклады Академии наук. 2012. Т. 446. № 5. С. 583-586.
2. Agalarov S.C., Sogorin E.A., Shirokikh N.E., Spirin A.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 404. № 1. P. 250-253.
3. Gallie D.R. // Nucleic Acid Research. 2002. V. 80. № 25. P. 3401-3411.
4. Shchelkunov S.N., Salyaev R.K., Pozdnyakov S.G., Rekoslavskaya N.I., Nesterov A.E., Ryzhova T.S., Sumtsova V.M., Pakova N.V., Mishutina U.O., Kopytina T.V., Hammond R.W. // Biotechnology Letters. 2006. V. 28. № 13. P. 959-967.

УДК 57.088.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ-БИОДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИН ФРАГМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ ПЦР-ПРОДУКТА ГЕНА 16S РРНК

Т.А. Степина, Т.Н. Кузнецова, А.А. Косогова, Е.В. Тоцкая,
О.А. Гусейнов, С.В. Прудникова

Сибирский федеральный университет
660041, Россия, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, oguseynov@mail.ru

Методом анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции ПЦР-продукта гена 16S рРНК была идентифицирована видовая принадлежность 5 штаммов бактерий-биодеструкторов полигидроксиалканоатов. Два штамма являются представителями вида *Bacillus pumilus*, остальные три принадлежат к видам *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*.

Библиогр. 4 назв.

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты; видовая принадлежность бактерий, полиморфизм длин фрагментов рестрикции, база данных GenBank.

Технический прогресс приводит к широкому внедрению целевых продуктов, синтезируемых микроорганизмами. Ценным продуктом бактерий являются микробные полигидроксиалканоаты (ПГА), полимеры гидроксипроизводных жирных кислот (т.н. биопластики). Полигидроксиалканоаты перспективны в качестве разрушаемой упаковки пищи и напитков, предметов гигиены и санитарии. Они не выделяют в окружающую среду вредных веществ, при их разрушении не образуются токсических продуктов. Увеличение объемов выпуска и расширение сфер применения ПГА делают необходимым изучение способности окружающей среды к самоочищению от этих продуктов. Разрушаемость ПГА определяется многими условиями, включая собственно химический состав и структуру полимера, а также микробную составляющую среды как главного агента их биодеградации. Возрастающие требования к охране окружающей среды делают этот класс биополимеров одним из востребованных материалов XXI века. Помимо термопластичности, аналогично полипропилену и полиэтилену, и разрушаемости в природных условиях, ПГА обладают антиоксидантными и оптическими свойствами и характеризуются высокой биосовместимостью [1]. Впервые микроорганизмы, разрушающие ПГА, были выделены более 40 лет назад [2]. Среди них было идентифицировано несколько таксонов, в частности – *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*.

Целью представляемой нами работы было определение видового состава бактерий-биодеструкторов полигидроксиалканоатов. В работе представлены результаты сравнительного анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции (ПДФР) ПЦР-продукта дли-

ной около 900 пар нуклеотидов (пн) для 5 штаммов бактерий-биодеструкторов полигидроксиалканоатов. На основании данных результатов сделан вывод, что исследованные штаммы относятся к видам *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilius*.

В процессе исследования была выделена ДНК из каждого из 5 образцов бактерий-деструкторов ПГА. Затем из выделенной ДНК были получены 500L–1350R ампликоны гена 16S рРНК. Каждый из полученных ампликонов был последовательно подвергнут гидролизу с использованием 7 эндонуклеаз рестрикции: BspFN I, Msp I, Rsa I, Tag I, BstHI I, Sse9 I, Bst MB I НПО «СибЭнзим». Разделение полученных продуктов рестрикции и анализ распределения их длин проводили методом гель-электрофореза с последующим использованием геледокументирующей системы. Далее на основе фенотипических признаков данных микроорганизмов для подходящих по свойствам бактерий был проведён поиск последовательностей гена 16S рРНК в базе данных секвенированных последовательностей GenBank. С помощью компьютерного моделирования были получены теоретически рассчитанные картины электрофоретического разделения рестриктопродуктов амплификации генов 16S рРНК (500L–1350R ампликонов), предложенным нами набором рестриктаз. Полученные практические и теоретические картины электрофоретического разделения рестриктопродуктов 500L–1350R ампликонов сравнивали для каждой из рестриктаз. Проверялось соответствие между результатами, полученными для исследуемых штаммов деструкторов и образцов из базы GenBank.

Бактерии-деструкторы ПГА (штаммы 1-5) и *E. coli* K-12 были взяты из музея кафедры биотехнологии СФУ. Выделение ДНК бактерий проводили по методу [3]. Амплификацию гена 16S рибосомальной РНК проводили как описано в работе [4]. Использовали стандартные праймеры 500L (cgtgccagcagccgcgtaa) и 1350R (gacgggscggtgtgtacaag) ЗАО Евроген Ру; ожидаемый размер ПЦР-фрагментов – около 900 пн. Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 4 ч. при определенной температуре для каждой рестриктазы (BspFN I, Msp I, Rsa I – 37°C; Tag I, BstMB I – 65°C; BstHI I – 50°C; Sse9 I – 55°C) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 единиц активности рестриктазы производства НПО

«СибЭнзим», в соответствующем буфере. Электрофоретическое разделение продуктов рестрикции амплифицированной ДНК проводили в 1,7% агарозе (Helicon) в трис-боратном буфере с этидиум бромидом (0,5мг/л) при 85 V в течение 2 ч. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярной массы ДНК (100 пн и 100 пн +50 пн, ДНК маркеры, НПО «СибЭнзим»). Электрофорез фрагментов ДНК проводили в камере для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad. Анализ гидролиза ампликонов гена 16S РНК проводили с использованием геледокументирующей системы Bio-Rad Gel Doc XR.

В представленной ниже таблице представлены результаты теоретического расщепления рестриктазами 500L–1350R ампликонов для *E. coli* K-12 и штаммов бактерий из базы GenBank, которые дают аналогичную картину разделения с изучаемыми штаммами. В 4-5 столбцах таблицы указаны размеры рестриктов (в пн) для рестриктаз BspFN I, Msp I, BstHI I.

Штамм бактерий	Идентификатор в GenBank	Размеры рестриктов (пн) для разных рестриктаз		
		Bsp FN I	Msp I	BstHI I
<i>E. coli</i> K-12	NR.102804	340 295 141 104 14	280 162 137 106 101 81 23 4	531 164 136 63
<i>Klebsiella pneumoniae</i> str. B8.1.2	KJ725222	340 295 141 104 14	284 162 137 106 101 81	531 300 63
<i>Bacillus cereus</i> str. 55-3	KM187654	294 209 186 87 50 39 15 14	606 211 43 23 11	346 299 182 63 4
<i>Bacillus amylo-liquefaciens</i> Ab-525	KJ879953	446 294 87 39 15	540 211 59 43 23 11 9	597 299
<i>Bacillus pumilius</i> GR36	KC771051	445 381 39 15 14	538 211 59 43 3 11 9	595 299

На рис. 1-6 представлены практические и теоретические картины электрофоретического разделения рестриктов 500L–1350R ампликонов гена 16S рРНК для рестриктаз BspFN I, Msp I, BstHI I.

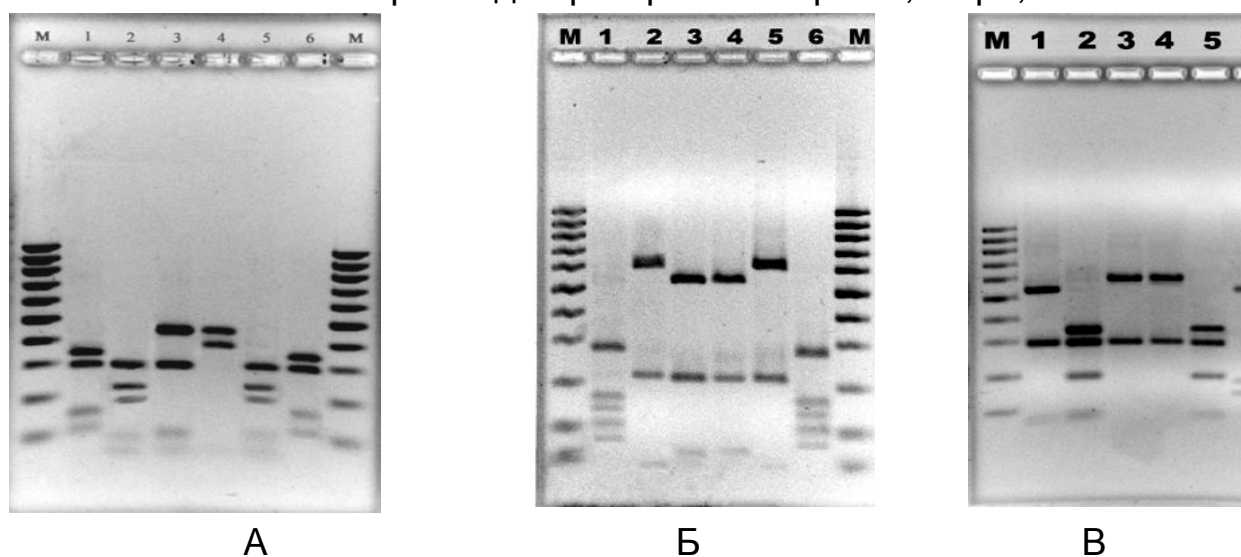


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации гена 16S рРНК бактерий-деструкторов ПГА после обработки рестриктазами: А – BspFN I; Б – Msp I; В – BstHI I. М – Маркер 100 пн; 1-5 – штаммы бактерий-деструкторов ПГА; 6 – E. coli K-12

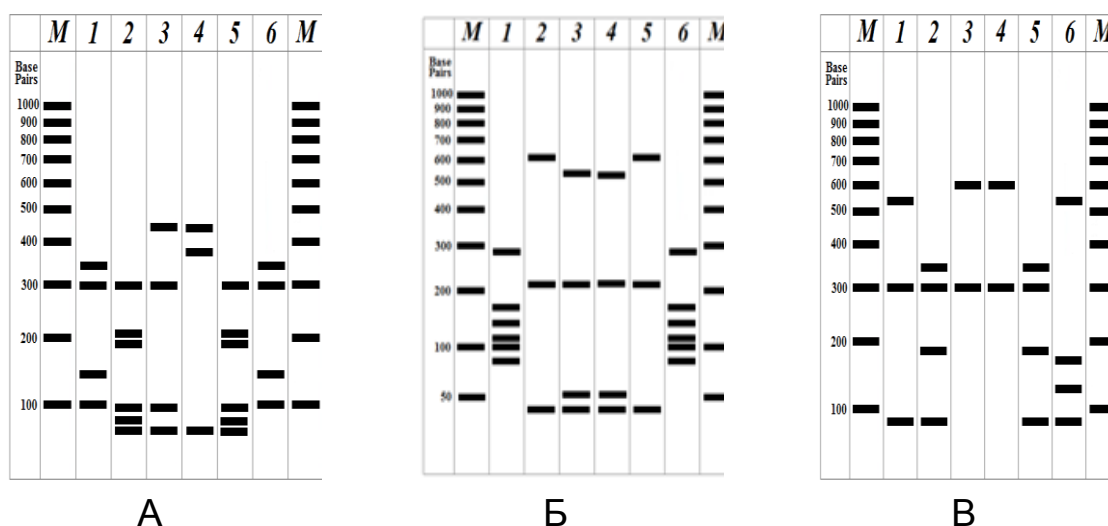


Рис. 2. Теоретические картины электрофоретического разделения продуктов амплификации генов 16S рРНК после обработки рестриктазами: А – BspFN I; Б – Msp I; В – BstHI I. М – Маркер 100 пн; 1 – Klebsiella pneumoniae str. B8.1.2; 2 – Bacillus cereus str. 55-3; 3 – Bacillus amyloliquefaciens Ab-525; 4 – Bacillus pumilus GR36; 5 – Bacillus cereus str. 55-3; 6 – Escherichia coli K-12

Из сопоставления теоретических и практических электрофоретических картин разделения рестриктов на рис. 1-2, можно сделать следующий вывод о видовой принадлежности идентифицируемых штаммов. Штамм 1 является представителем вида *Klebsiella pneumoniae*, штаммы 2 и 5 принадлежат к виду *Bacillus cereus*, штамм 3 – к виду *Bacillus amyloliquefaciens*, штамм 4 – к виду *Bacillus pumilius*. Результаты полученные для рестриктаз Tag I, Rsa I, Sse9 I, Bst MB I подтверждают данную видовую принадлежность штаммов бактерий-деструкторов.

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов в совокупности с использованием генетической базы данных секвенированных последовательностей ДНК (GenBank) может служить достаточно простым способом идентификации микроорганизмов. Метод рестрикционного анализа не так чувствителен к наличию примесей в ДНК по сравнению с полимеразной цепной реакцией, используемой для секвенирования последовательности продукта амплификации гена 16S РНК. Данный метод можно использовать для быстрого и малозатратного контроля наличия конкретных микроорганизмов в исследуемой среде.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. (2011) Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение. Красноярск: Красноярский писатель, 392 с.
2. Chowdhury, A.A. (1963) Poly-b-hydroxy buttersaure abbauende Bakterien und Exoenzyme. In: Arch. Mikrobiol. , V. 47, p. 167-200.
3. Метод выделения ДНК – [Электронный ресурс] – Режим доступа http://www.serva.de/www_root/documents/02-AxyPrep%20Bacterial%20genomic%20DNA%20Miniprep%20Kit%207%20pages12%2011_1.pdf (дата обращения 2.02.15).
4. Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Sasaki, M., Kaneko, M. (1997) Identification of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva* by 16S rRNA gene PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. In: J. Clin. Microbiol. , V. 35, p. 2458-2463.

УДК: 578.74

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
БИОИНФОРМАЦИОННЫХ РЕСУРСОВ
ПРИ СОЗДАНИИ ВАКЦИН ПРОТИВ
ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

А.С. Столбиков^{1,2}, Ю.С. Букин³, А.В.Третьякова^{1,2}

¹ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений»
Сибирского отделения РАН, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
matmod@sifibr.irk.ru

²ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», 664003, г.
Иркутск, ул. К. Маркса, 1, rector@isu.ru

³ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Иркутский государ-
ственный технический университет» Минобрнауки России, 664074, г.
Иркутск, ул. Лермонтова 83, info@istu.edu

*В данной работе с помощью бионформационных технологий про-
веден анализ аминокислотных последовательностей основной
антигенной детерминанты различных штаммов вируса гепати-
та В.*

Ключевые слова: антигенная детерминанта, ВГВ, Genbank.

Заболевания, вызываемые опасными вирусными инфекциями, представляют собой серьезную угрозу здоровью и жизни людей во всем мире. Основным видом противодействия этой группе вирусов является вакцинопрофилактика человека, которая представляет собой наиболее эффективную, доступную и дешевую систему организационных, медицинских и противоэпидемических мероприятий, обеспечивающих предупреждение возникновения, распространения и ликвидацию инфекционных заболеваний. Однако в ряде случаев применение вакцин или вовсе не приводит к иммунизации организма, или же вызывает лишь частичную иммунизацию. Это отчасти связано с тем, что в основе создания большинства вакцин использованы антигенные детерминанты наиболее распространенных штаммов, и не всегда учитывались вариации в строении антигенных белков у редких разновидностей вирусов.

Достаточно хорошо известно, что некоторые вирусы обладают широкой вариабельностью, связанной с дрейфом генов и с антигенной изменчивостью, что дает им потенциальную возможность “ускользнуть” от иммунного ответа, формирующегося при стандартном вакцинировании. Исходя из вышесказанного, можно заключить, что необходимо разрабатывать поливалентные вакцины, способные давать защиту против максимального количества штаммов вирусов.

Создание новых вакцин очень долгий и трудоемкий процесс, нуждающийся в оптимизации, которая позволила бы сократить время и затраты. Такая оптимизация возможна за счет использования бionформационных технологий, позволяющих при относительно малых затратах и в сжатые сроки структурировать, проанализировать, оценить огромный массив информации по тем или иным вариантам вирусов, и на основе полученных данных предложить конструкции для создания новых вакцин.

Целью данной работы было на примере вируса гепатита В (ВГВ) показать возможность использования различных биоинформационных ресурсов (программ, баз данных) для анализа различий в строении α -антигенной детерминанты белка S у разных штаммов вируса.

ВГВ – очень распространенная и опасная вирусная инфекция, обладающая значительной вариабельностью [1].

Аминокислотные последовательности интересующих нас белков были получены из международной базы данных "GenBank Home-National Centerfor Biotechnology Information". Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили с помощью пакета программ BioEdit. В качестве эталонного образца при выравнивании использовалась последовательность основного антигенного белка вируса ВГВ субтипа ауw, являющегося наиболее распространенным в России (75 - 95%) [2].

С помощью программы SPDBV_4.1.0 были смоделированы третичные структуры белков. Был проведен сравнительный анализ третичных моделей белков, у которых есть отличия в аминокислотной последовательности α -детерминанты с целью выявления конформационных изменений. Отличия в конформации α -детерминанты с большой долей вероятности свидетельствуют о различии в степени узнавания эпитопов антигенного белка антите-

лами или вовсе о потере данной способности. Были проведены 861 вариант попарного компьютерного моделирования. Моделирование показало, что практически все варианты α -детерминанты, у которых произошли аминокислотные замены, имеют отличие в строении электронных облаков. Исходя из этого можно предположить, что все аминокислотные последовательности, имеющие отличия в α -детерминанте, обладают разными иммуногенными свойствами. Но так как таких уникальных последовательностей оказалось 42 варианта, то использование их всех для создания кандидатной вакцины представляется очень громоздкой задачей, поэтому было решено уменьшить их количество. Сокращение количества вариантов аминокислотных последовательностей не должно было сказаться на широте иммуногенных свойств вакцины. Для решения этой задачи был проведен филогенетический анализ аминокислотных последовательностей с целью разбить их на близкие по структуре группы.

Для классификации выделенных последовательностей был применен метод кластерного анализа UPGMA, реализованный в программном пакете PHYLIP. Для такого рода кластерного анализа мы решили использовать матрицу Dayhoff M. PAM (1978), реализованную в программе «protldist» пакета PHYLIP. Используя данную матрицу, мы смогли по характеру замен определить эволюционное расстояние между последовательностями. Для этого мы с помощью программы «protldist» рассчитали матрицу дистанций для всех 42 последовательностей. После расчета дистанций строили фенограмму. Для этого обрабатывали данные матрицы дистанций программой neighbor. После чего их визуализировали программой njplot. Анализ филогенетического древа показал, что при дистанциях замен больших, чем 0.04, в сравниваемых последовательностях обнаруживаются замены, приводящие либо к изменению зарядовых свойств аминокислот, либо к изменению их полярных свойств, либо происходит замена аминокислоты, способной образовывать водородные связи, на аминокислоту, неспособную к образованию водородных связей. Таким образом, число аминокислотных последовательностей, которые можно использовать при создании вакцины против ВГВ, сократилось до 34 вариантов.

Выявленные мутантные варианты α -антигенной детерминанты ВГВ необходимо исследовать в эксперименте на предмет связыва-

ния с антителами к «дикому» типу вируса с целью возможного использования их для получения перспективных вакцинных конструкций, которые с большой долей вероятности будут индуцировать формирование иммунного ответа организма по отношению к максимальному числу генетических вариантов вируса, циркулирующих в человеческой популяции.

Результаты данной работы свидетельствуют о возможности успешного применения биоинформационных ресурсов в анализе вирусов, характеризующихся высокой генетической изменчивостью.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Wilson J.N., Nokes D.J., Carman W.F. The predicted pattern of emergence of vaccine-resistant hepatitis B: A cause for concern? *Vaccine*. 1999; 17: 973–978.

2. Крымский М.А., Крымский Р.М., Буданов М.В., Борисова В.И. Соответствие вакцин против гепатита В типу вируса, превалирующего на территории Российской Федерации. *Биофармац. журн.* 2010; 2 (5): 8-15.

УДК 577.21

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА АЦК ОКСИДАЗЫ ТОМАТА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ С РЕАЛИЗОВАННЫМ МЕХАНИЗМОМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

В. Р. Тимербаев, С. В. Долгов

Филиал Института биоорганической химии имени академиков М. М. Шенякина и Ю. А. Овчинникова,

142290, Московская обл., г. Пущино, пр-т Науки, 6.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,

127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42.

E-mail: timerbaev@gmail.com

В ходе выполнения научно-исследовательской работы получены следующие результаты: 1) проведен анализ экспрессии генов се-

действия АЦК оксидазы томата в трансгенных растениях с модифицированным процессом созревания плодов методом полуколичественной ОТ-ПЦР, показано, что в растениях с конститутивным промотором происходит ингибирование экспрессии 4 из 5 генов мультигенного семейства АЦК-оксидазы томата; 2) в растениях с тканеспецифичным промотором гена полигалактуроназы ингибирования экспрессии генов АЦК-оксидазы не обнаружено; 3) продемонстрирована возможность посттранскрипционного ингибирования семейства генов при использовании нуклеотидной последовательности одного из его членов; 4) получены данные о степени нуклеотидной гомологии необходимой для супрессии генов методом РНК-интерференции.

Ключевые слова: АЦК оксидаза, LeACO, этилен, РНК-интерференция, плодоспецифичная экспрессия, полигалактуроназа, ОТ-ПЦР.

Ранее в нашей лаборатории были получены трансгенные растения томата с модифицированным процессом созревания плодов. В них был успешно реализован подход РНК-интерференционного ингибирования ключевого гена биосинтеза этилена – АЦК оксидазы [1]. Результаты тепличного эксперимента и анализ лежкости выявили, что плоды таких растений не созревали без обработки экзогенным этиленом и не портились в течение 3-4 месяцев хранения (в плодах нетрансгенных растений развивались гнилостные процессы в среднем к 40 дню хранения после сбора на бланжевой стадии спелости).

В настоящей работе для анализа профиля экспрессии гена *LeACO1*, а также других членов мультигенного семейства АЦК оксидазы, нами была проведена полуколичественная ПЦР, сопряженная с обратной транскрипцией (рис. 1). В плодах контрольных растений и линии с ориентацией фрагментов гена sense-antisense (прямая-обратная, далее SA) мРНК гена *LeACO1* детектируется на всех стадиях созревания с максимумом на стадии бланжевая +3 суток. В плодах линии с ориентацией фрагментов гена antisense-sense (обратная-прямая, далее AS) в условиях данного эксперимента продукты ПЦР детектируются на стадиях от зеленой спелости до бланжевая +10 суток, однако, как видно на рисунке уровень мРНК значительно снижен.

Профили экспрессии генов *LeACO3* и *LeACO4* в плодах линии SA и контрольных растений схожи с таковым для гена *LeACO1*. В плодах линии AS мРНК генов *LeACO3* и *LeACO4* не детектируется на всех стадиях развития. мРНК гена *LeACO2* не детектируется ни в плодах контрольных, ни в плодах трансгенных растений. Это согласуется с данными, что экспрессия гена *LeACO2* наблюдается только в цветах с максимальным уровнем на стадии увядания. Однако в цветах трансгенных линий AS детектировался лишь транскрипт гена *LeACO5* (также как и в плодах), что позволяет сделать вывод об ингибировании экспрессии с высокой эффективностью 4 из 5 членов семейства генов АЦК оксидаз томата, при запуске механизма РНК-интерференции с помощью инвертированных фрагментов гена *LeACO1* в ориентации AS. Мы предположили, что это связано с разной степенью нуклеотидной гомологии между генами *LeACO*.

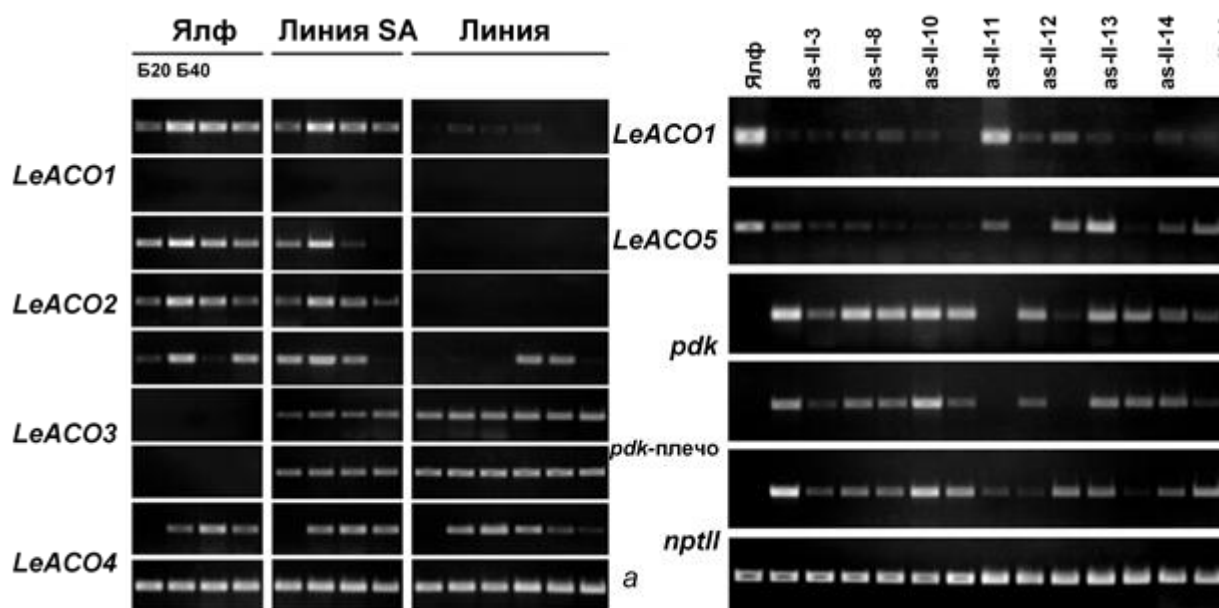


Рис. 1 Полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ РНК плодов трансгенных растений томата, полученных с помощью векторов *pARTLeACOsa* (линия SA) и *pARTLeACOas* (линия AS), а также из плодов нетрансформированных растений: а – на разных стадиях созревания, б – на стадии бланжевая +3 суток. ЗС – стадия зеленой спелости, Б – бланжевая стадия спелости, число указывает на количество дней после ее наступления

Кодирующие области мРНК всех генов АЦК оксидазы, кроме *LeACO5*, высококонсервативны, в то время как нетранслируемые регионы (НТР) уникальны для каждого гена. Поскольку в состав инвертированных повторов входит как кодирующая область, так и НТР, логично предположить, что ингибирование экспрессии других генов *LeACO* происходит за счет консервативного участка дцРНК. В семействе генов *LeACO* гомология между участками генов *LeACO2*, 3, 4, 5 и плечом «шпильки» составляет 85.3%, 78.8%, 72.1% и 50.8% соответственно, и, исходя из наших результатов, для проявления эффекта супрессии гена значение нуклеотидной гомологии должно составлять не менее 72%, а уровень в 51% недостаточен для пострранскрипционного ингибирования экспрессии.

Предполагается, что использованная в работе векторная система рHANNIBAL/KANNIBAL обеспечивает посттранскрипционный сплайсинг *pdk*-интрона, являющегося спейсером между самокомплементарными последовательностями [3]. Многочисленными исследованиями показано, что замена спейсера на последовательность функционального интрона приводит к увеличению доли трансгенных линий с эффектом ингибирования экспрессии гена приблизительно с 55 до 90-100%. В нашем же исследовании ПЦР-сигнал на *pdk*- детектировался во всех тканях трансгенных растений AS и SA (рис. 1).

Причины, по которым не происходит сплайсинг интрона, пока не ясны, однако значительно более важным результатом является то, что, несмотря на это эффективность подавления экспрессии генов АЦК оксидазы томата для линий AS осталась очень высокой.

Основным недостатком конститутивных промоторов, является экспрессия контролируемых ими генов во всех тканях растений в течение всей жизни, поэтому следующим этапом нашей работы явилось создание растений томата с тканеспецифичным промотором, обеспечивающим экспрессию целевой последовательности в зрелых плодах. Для этого инвертированные повторы фрагмента гена *LeACO1* в ориентации AS были поставлены под контроль укороченной формы (1,1 тыс. п. н.) промотора гена полигалактуроназы томата – фермента, отвечающего за деполимеризацию пектина клеточных стенок [2]. В результате агробактериальной трансформации томата линии Ялф созданным нами вектором

pARTPGLeACOas (рис. 2) получено 24 трансгенные линии.

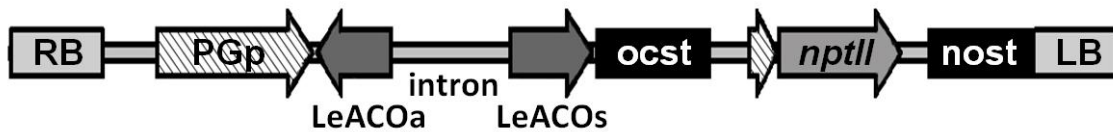


Рис. 2 Схематическое изображение Т-ДНК бинарного вектора pARTPGLeACOas

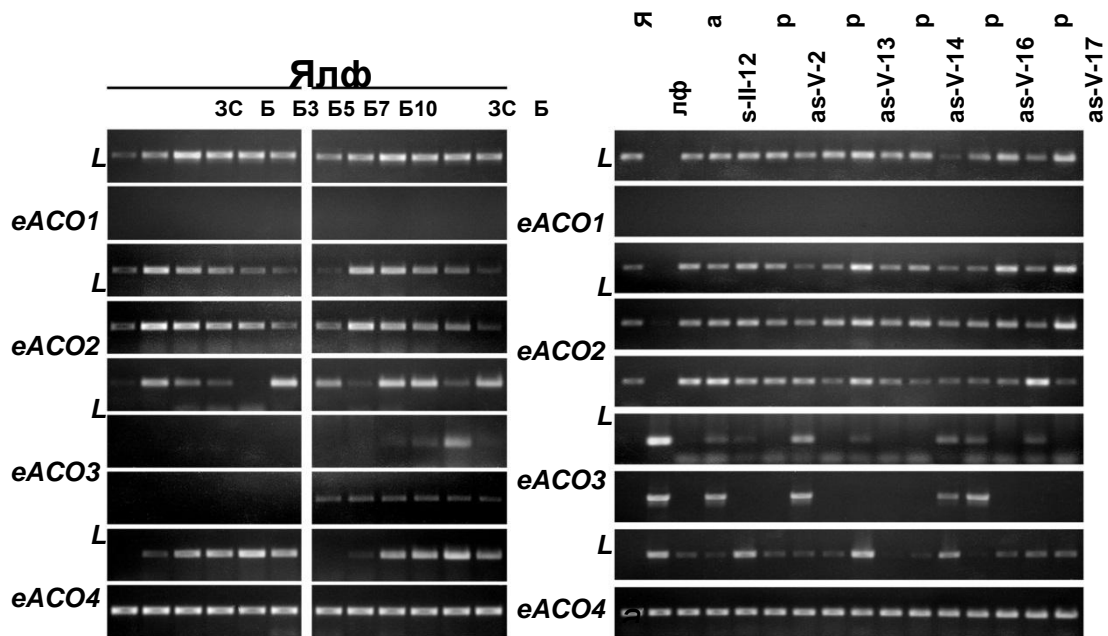


Рис. 3 Полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ РНК плодов трансгенных растений томата, полученных с помощью вектора pARTPGLeACOas, содержащего тканеспецифичный промотор гена полигалактуроназы томата, а также из плодов нетрансформированных растений: а – на разных стадиях созревания, б – на стадии бланжевая +3 суток. 3С – стадия зеленой спелости, Б – бланжевая стадия спелости, число указывает количество дней после ее наступления

Проведенный тепличный эксперимент не выявил визуальных различий между трансгенными линиями PAS и контрольными растениями ни на стадии цветения, ни на стадии созревания плодов. Увеличения лежкости собранных плодов также обнаружено не было. Проведенный полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ выявил, что про-

фили накопления мРНК всех генов семейства *LeACO* для плодов линий PAS соответствовали данным полученным в первых экспериментах для линий SA и контрольных растений Ялф – мРНК генов *LeACO1*, -3, -4 детектировалась на всех стадиях созревания, максимум приходился на стадии бланжевая – бланжевая +3 суток, ПЦР-сигнал для гена *LeACO2* отсутствовал, а закономерности изменения уровня мРНК гена *LeACO5* в процессе созревания обнаружить не удалось (рис. 3, а).

Для подтверждения функциональности сконструированного вектора путем детекции «шпилечной» РНК под контролем ПГ промотора мы использовали праймеры как на *pdk*-интрон, так и на последовательность захватывающую интрон и плечо *LeACO1*. Выяснилось, что клонированная последовательность плодоспецифичного промотора обеспечивает экспрессию самокомплементарных последовательностей на очень низком уровне, она детектируется в плодах линий PAS лишь в половине растений (рис. 3, б). Предположительно, столь слабая активность промотора ПГ не способна вызвать запуск механизма РНК-интерференции, как следствие этого – отсутствие физиологических изменений в растениях. Несмотря на слабую силу клонированной формы промотора, его тканевая и временная специфичность сохранилась – максимум накопления «шпилечного» транскрипта, также как и транскрипта нативного гена ПГ наблюдается в плодах на стадии созревания бланжевая +7 дней (рис. 3, а).

Таким образом, в нашей работе показана возможность замалчивания близкородственных генов путем использования последовательности одного из них, а также получены данные о степени гомологии и протяженности комплементарного участка гена плечу «шпильки» при которых возможен запуск механизма РНК-интерференции. Рассмотрены возможные причины отсутствия эффекта замедления созревания. Данные результаты позволяют лучше понять механизм посттранскрипционного ингибирования экспрессии растительных генов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Тимербаев В. Р., Долгов С. В. Использование механизма РНК-интерференции для ингибирования экспрессии гена АЦК-

оксидазы томата с целью увеличения лежкости плодов // Биотехнология. – 2009. – №1. – С. 11-22.

2. Тимербаев В. Р., Шестибратов К. А., Долгов С. В. Клонирование и функциональный анализ трех форм промотора полигалактуроназы томата // Биотехнология. – 2008. - № 6. – С. 23-30.

3. Wesley S. V., Helliwell C. A., Smith N. A., Wang M. B., Rouse D. T., Liu Q., Gooding P. S., Singh S. P., Abbott D., Stoutjesdijk P. A., Robinson S. P., Gleave A. P., Green A. G., Waterhouse P. M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants // Plant J. – 2001. – V. 27. – P. 581-590.

УДК 543.544.3

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОЗЫ В МЕДЕ С
ДЕРИВАТИЗАЦИЕЙ / ТВЕРДОФАЗНОЙ МИКРОЭКСТРАКЦИЕЙ
И ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ / МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ**

Т. Фишер, Л.С. Михайлова

Brandenburgische Technische Universität Cottbus-Senftenberg, Zentral-
es Analytisches Labor,
Konrad-Wachsmann-Allee 6, 03046, Cottbus, Германия,
thomas.fischer@tu-cottbus.de

Разработан новый метод определения сахарозы в меде с применением твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) с дериватизацией и газовой хроматографии (Д-ТФМЭ/ГХ-МС). Метод включает в себя дериватизацию образца с уксусным ангидридом с использованием в качестве катализатора N-метилимидазола и последующее обогащение аналита в полиакрилатном ТФМЭ-волокне. Результаты показали, что 100 мл N-метилимидазола и 800 мл уксусного ангидрида достаточно для завершения ацетилирования сахарозы в 100 мл водного образца при комнатной температуре. Достаточным временем для обогащения в ходе ТФМЭ было 30 мин. ТФМЭ проводили путем погружения волокна в раствор с дополнительной вибрацией. Затем аналит десорбировали в течение 5 мин при 280 °С в ГХ-МС инъекционный порт с режимом без

деления потока газа-носителя. Данный метод имеет хорошую линейность в диапазоне концентраций от 0,3-8% сахарозы в меде с высоким коэффициентом корреляции ($R=0,9993$). Метод был успешно применен для контроля фальсификаций сахарозы в меде. Ключевые слова: твердофазная микроэкстракция, ацелирование сахаров.

Мед — это перенасыщенный природный раствор сахаров, в котором наиболее распространенными моносахаридами являются фруктоза и глюкоза (как правило, 80-85% твердых веществ в меде). Другие дисахариды (сахароза, трегалоза, изомальтоза и т. д.), трисахариды и олигосахариды также присутствуют, однако в достаточно небольших количествах.

Сахароза присутствует в меде в концентрации 1% от сухого веса. Тем не менее, данный показатель может быть увеличен, если весной пчеловод обильно кормил пчел сахаром. Согласно британским и немецким нормативам качества и безопасности для меда, содержание сахарозы, как правило, не должно превышать 5%.

Содержание сахарозы в меде может быть определено с помощью спектроскопических, электрофоретических и хроматографических методов: инфракрасной Фурье-спектроскопии (FTIR), тонкослойной хроматографии, капиллярного электрофореза, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии и газовой хроматографии-массовой спектрометрии (ГХ-МС).

Определение сахаров с применением FTIR была выполнена с целью обеспечения надежных результатов для фруктозы, глюкозы, сахарозы, туранозы, мальтозы, трегалозы, изомальтозы, эрлозы, а также для ряда физических свойств меда с использованием многомерных хемометрических методов (напр. PLS, Partial Least Squares calibration). Тем не менее, для PLS-калибровки необходимо иметь в распоряжении большое количество образцов с известными концентрациями компонентов. Например, Lichtenberg-Kraag и др. (2002) использовали FTIR-спектры 1600 образцов меда для PLS-калибровки, охарактеризованные ранее с помощью ВЭЖХ и других методов. При ВЭЖХ дериватизация сахаров не является обязательной, однако они не могут быть детектированы в спектральном

диапазоне ультрафиолетового или видимого света (UV/VIS), а требуют фотодетекторов рефракции (RI) или светового рассеяния. С другой стороны, обычная ГХ-МС сахаров сопровождается трудоемкой дериватизацией, несущей высокий риск ошибок, и требующей дополнительных мер по контролю качества. Таким образом, целью данного исследования являлась разработка ГХ-МС метода, преодолевающего данные недостатки и делающего анализ сахаров доступным для лабораторий, где требования к ИК-Фурье спектроскопии или ВЭЖХ не достигаемы.

С целью минимизации времени подготовки проб для ГХ-МС, мы предлагаем новый метод с дериватизацией/твердофазной микроэкстракцией (Д-ТФМЭ). Твердофазная микроэкстракция была впервые описана в 1997 году Pan & Pawlyszin (1997), а затем применялась для обнаружения альдегидов, аминов, фенолов, стероидов, тиолов, органических кислот и аминокислот. По нашим сведениям, мы впервые представляем исследование, демонстрирующее метод Д-ТФМЭ для определения углеводов (Wang и др., 2015).

В исследованиях использовали сахарозу, фруктозу, глюкозу, уксусный ангидрид и N-метилимидазол производства фирмы Sigma-Aldrich (Штейнгейм, Германия). Смеси стандартных рабочих растворов были приготовлены разбавлением водой, очищенной в системе очистки воды фирмы Seral Reinstwassersysteme GmbH (Германия). ГХ-МС-анализ выполняли с применением газового хроматографа VARIAN 450-GC в сочетании с масс-спектрометром VARIAN 300MS TQ. Газовой хроматограф был оснащен капиллярной колонкой VARIAN FactorFour (30 м * 0.25 μм толщина пленки * 0.25 мм внутренний диаметр). Инъекции проводили в режиме без деления потока газа-носителя. В качестве газа-носителя использовали гелий высокой чистоты (99,999%) при расходе 1,0 мл мин⁻¹. Программирование температуры печи было следующим: начальная температура печи составляла 50 °С (в течение 1 мин), а затем увеличивалась до 300 °С со скоростью 30 кельвин мин⁻¹ и сохранялась в течение 4 мин. Температура ионного источника и интерфейса составляла 200 °С. Все образцы анализировали в режиме селективного мониторинга ионов (сахароза: RT=11,81 мин, m/z=331 для количественного определения, m/z=169 и 221 для подтверждения компонента).

Мед был предоставлен местным поставщиком и собран летом 2014 года в регионе Шпреевальд в Германии. Пробоподготовка выполнялась путем смешивания 1 г меда с 20 мл деионизированной воды. Стандартные растворы сахарозы были изготовлены в водном растворе фруктозы и глюкозы, предварительно приготовленном путем растворения 20 г фруктозы и 17,5 г глюкозы в 1 л деионизированной воды и с последующим добавлением 10-400 мг сахарозы к 100 мл данного раствора. Это соответствовало 0,2 -8% сахарозы в меде.

Коммерчески доступные полидиметилсилоксан (ПДМС)-, полиакрилат (ПА)- и полидиметилсилоксан-дивинилбензол (ПДМС/ДВБ) волокна были приобретены у фирмы Supelco (Беллефонт, США). Перед использованием волокна были кондиционированы путем их помещения в горячий инъектор газового хроматографа в атмосферу гелия, согласно указаниям изготовителя. 100 мкл водного образца меда или стандартного раствора помещали в виалу объемом 20 мл, затем добавляли 100 мкл N-метилимидазола и 800 мкл уксусного ангидрида. Для достижения полной дериватизации смесь тщательно перемешивали вручную и отстаивали в течение 10 мин. Степень дериватизации была проверена с помощью ЯМР-спектроскопии. Затем добавляли 10 мл деионизированной воды и герметично закрывали виалы тефлоновыми крышками. ТФМЭ проводили путем погружения полиакрилатного волокна в раствор на 30 мин с дополнительной вибрацией волокна с перемешивающим устройством Varian 8200 ТФМЭ. Время десорбции и температура составляли 5 мин и 280 °С соответственно.

С целью повышения эффективности дериватизации объем уксусного ангидрида, количество N-метилимидазола и время дериватизации были оптимизированы. С этой целью различные объемы уксусного ангидрида были добавлены в 100 мкл стандартного раствора и в 100 мкл N-метилимидазола, реакцию проводили при комнатной температуре в течение 10 мин. Площадь пика заметно увеличилась при объеме уксусного ангидрида в пределах от 200 до 800 мкл. При объеме свыше 800 мкл, эффективность дериватизации в дальнейшем не увеличивались. Таким образом, объем 800 мкл уксусного ангидрида рассматривался в качестве оптимального количества. Затем к 100 мкл стандартного раствора и 800 мкл уксусного

ангидрида были добавлены различные объемы N-метилимидазола. Реакция проходила при комнатной температуре в течение 10 мин. Площадь пика не возрастала при объеме свыше 100 мкл N-метилимидазола. Таким образом, объем 100 мкл N-метилимидазола рассматривался как оптимальное количество, которое также корреспондирует с выводами Wu и др. (2011).

Для дальнейшей оптимизации времени реакции смешивали 100 мкл стандартного раствора, 100 мкл N-метилимидазола и 800 мкл уксусного ангидрида. Реакцию проводили при комнатной температуре от 5 до 15 мин. Установлено, что время реакции 10 мин является достаточным для полной дериватизации.

Лучшая эффективность извлечения была достигнута с ПДМС/ДВБ волокном. Полидиметилсилоксановые (ПДМС) и полиакрилатные (ПА) волокна извлекли всего 2% и 18% деривата, соответственно. С целью предотвращения возможных последствий дискриминации в связи с высокой концентрацией фруктозы и глюкозы, для дальнейшего исследования были использованы волокна ПА. Далее было установлено, что 30-минутное обогащение на волокне являлось оптимальным. Калибровка и проверка метода проводились в соответствии с немецким стандартом DIN 32645.

ТФМЭ является быстрой, портативной, надежной и свободной от растворителей техникой экстрагирования и концентрирования, широко используемой в аналитической химии на протяжении почти 20 лет, преимущественно для определения неполярных веществ. Обогащение полярных метаболитов в относительно неполярных коммерчески доступных ТФМЭ-волокнах недостаточно и требует использования дополнительных аналитических методов дериватизации.

Дериватизация сахаров в летучие ацетаты является одним из наиболее широко используемых методов для их ГХ-анализа. При использовании N-метилимидазола в качестве катализатора реакция протекает очень быстро даже при комнатной температуре, также возможно использование воды в качестве растворителя. С помощью ^1H -ЯМР было показано, что реакция полностью протекает уже через 10 мин без побочных продуктов реакций. MS-спектр октаацетата сахарозы не показал молекулярный пик ($m/z=678$) при иониза-

ции электронным ударом, поэтому для количественного определения сахарозы мы использовали фрагмент $m/z=331$.

Разработан простой и быстрый метод Д-ТФМЭ/ГХ-МС для определения сахарозы в меде. Перед ГХ анализом образец был дериватизирован путем каталитического ацилирования N-метилимидазола. Дериватизация была быстро завершена при комнатной температуре в водном образце. Данный метод достаточно чувствителен для безопасного обнаружения фальсификаций меда путем кормления пчел сукрозой (сахарозой). Предлагаемый способ может быть адаптирован для определения других моно- и дисахаридов в меде (Wang и др., 2015).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. DIN 32645: Chemical analysis—decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions—terms, methods evaluation. 2008– 11, Beuth publisher's, <http://www.beuth.de/de/norm/din-32645/110729574>.
2. Lichtenberg-Kraag, B., Hedtke, C., Bienefeld, K. (2002) Infrared spectroscopy in routine quality analysis of honey; *Apidologie*, 33: 327–337.
3. Pan, L., Pawliszyn, J. (1997) Derivatization/solid-phase microextraction: new approach to polar analytes; *Analytical Chemistry*, 69: 196–205.
4. Wang, H., Geppert, H., Fischer, T., Wieprecht, W., Möller, D. (2015) Determination of Sucrose in Honey with Derivatization/Solid-Phase-Microextraction and Gas-Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 2015;0:1-5 (Advance Access publication)
5. Wu, J., Li, M.H., Lin, J.P., Wei, D.Z. (2011) Determination of dihydroxyacetone and glycerol in fermentation process by GC after n-Methylimidazole catalyzed acetylation; *Journal of Chromatographic Science*, 49: 375–378.

УДК 601.4 579.64

**СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ
СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА ФИТАЗЫ
PANTOEA AGGLOMERANS**

Хабипова Н. Н.¹, Валеева Л. Р.¹, Нямсурэн Ч.¹, Нигматуллина Л. Р.¹,
Шакиров Е. В.², Шарипова М. Р.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет
420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская 18, Chuka_ch@mail.ru

²University of Texas at Austin, Section of Integrative Biology, Austin, TX,
78712 USA

На основе вектора pET28b и штамма E.coli BL 21 pLysS получена экспрессионная система синтетического гена фитазы P.agglomerans. Наличие синтетического гена фитазы у рекомбинантных штаммов установили с помощью ПЦР – и рестрикционного анализа.

Ключевые слова: фитат, фитазы, Pantoea agglomerans

Фосфор – одним из важнейших элементов, необходимых для роста и жизнедеятельности организмов. Для растений единственным источником фосфора является почвенный раствор, животные получают фосфор вместе с пищей [Balaban *et al.*, 2014, Р. 433-437]. Актуальной проблемой на сегодняшний день является дефицит фосфорного питания растений и животных. В связи с этим, большое внимание привлекает фитат (мио-инозитол гексакисфосфат) - основной резервуар органического фосфора в почве и семенах растений, но растения не могут усваивать фосфор из почвенного фитата. Кроме того, избыток фитатов в почве может стать причиной эвтрофикации водоемов [Lei *et al.*, 2001, Р. 474-481]. Однако многим микроорганизмам за счет наличия у них специфических фосфогидролаз – фитаз удается высвобождать фосфаты, гидролизуя фитат.

Фитаза бактерии *Pantoea agglomerans* (*paPhyc*) обладает высокой активностью, причем свойства фермента (рН- и температурные оптимумы) хорошо соответствуют условиям кислых почв умеренных широт [Greiner, 2004, Р. 577-585]. Эти характеристики

позволяют открыть большие перспективы использования фитазы в сельском хозяйстве, в частности для улучшения роста и урожайности сельскохозяйственных культур.

Современные методы генетической инженерии, а именно молекулярного клонирования, позволяют создать генетические системы, с помощью которых можно получить высокоэффективные рекомбинантные штаммы, экспрессирующие целевые гены и изучить особенности и свойства полученных рекомбинантных ферментов. Получение рекомбинантного штамма, несущего синтетический ген фитазы *P. agglomerans* с оптимизированной нуклеотидной последовательностью для экспрессии в растительном организме, и изучение свойств фермента является одним из этапов исследования регулирования фосфорного обмена.

Цель работы – получение экспрессионной системы на основе синтетического гена фитазы *Pantoea agglomerans*.

Провели клонирование синтетического гена фитазы *P. agglomerans paPhyC* в вектор рЕТ28b. Для экспрессии использовали плазмиду рЕТ28b, относящуюся к экспрессионным векторам рЕТ-системы, и широко используемую для создания гетерологичных систем экспрессии прокариотических и эукариотических рекомбинантных белков.

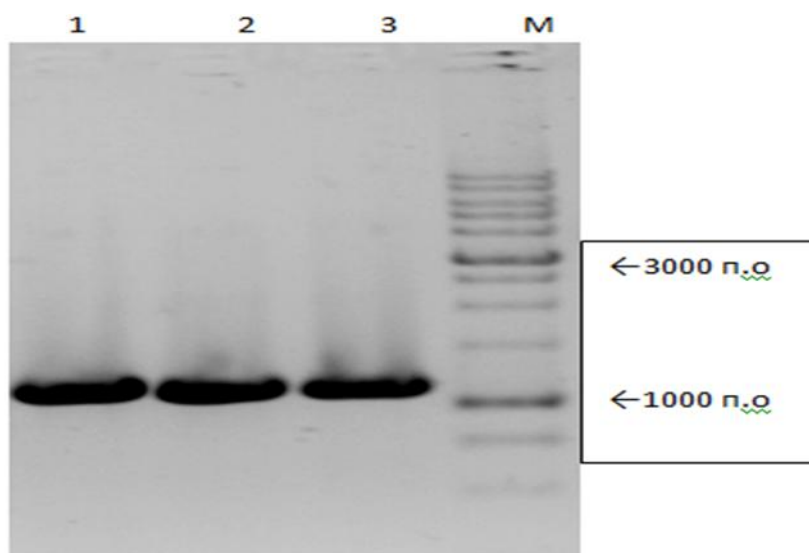


Рис. 1. Электрофорез после амплификации гена фитазы *P. agglomerans* 1 – 3 – пробы по порядку; М – маркер (M12)

Провели амплификацию синтетического гена фитазы *P. agglomerans*. Электрофорез в агарозном геле подтвердил наличие

продуктов реакции амплификации размером около 1200 п.о., что соответствовало длине гена фитазы *paPhyC* (рис. 1).

Для клонирования гена фитазы в рЕТ 28b использовали рестриктазы *NcoI* и *XhoI*, сайты рестрикции для которых имелись на векторе рЕТ 28b и в амплифицированной последовательности гена фитазы *paPhyC*. Рестрицированную последовательность гена и вектор лигировали. Полученную в результате клонирования конструкцию рЕТ 28b *paPhyC* трансформировали в клетки *E.coli* DH 5 α . Отбор трансформантов проводили в стерильных условиях на среде LA с добавлением маркерного антибиотика – канамицина (*Km*). Наличие целевого гена идентифицировали с помощью ПЦР-анализа колоний *E.coli* DH5 α , трансформированных вектором рЕТ 28b с геном фитазы. Для подтверждения результатов ПЦР-анализа провели рестрикционный анализ полученных колоний с использованием рестриктаз *NcoI* и *XhoI*. Электрофорез продуктов рестрикции показал наличие двух ДНК-фрагментов размером около 5300 и 1200 п.о. только для одной из анализируемых плазмидных ДНК колоний-трансформантов (что соответствовало размерам вектора рЕТ 28b (5368 п.о.) и гена *paPhyC* (1200 п.о.). Таким образом, только одна из полученных колоний несла рекомбинантный вектор. Результаты секвенирования подтвердили полное соответствие гена *paPhyC* на плазмиде рЕТ28b рекомбинантного штамма синтетическому гену фитазы *P.agglomerans*.

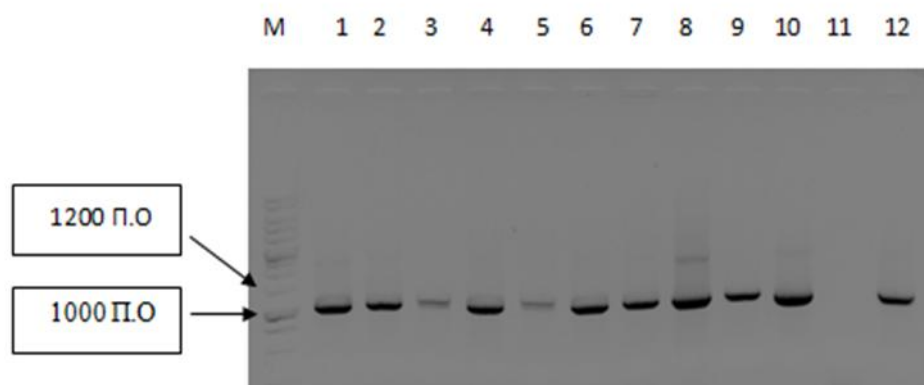


Рис. 2. Электрофорез после ПЦР с колоний *E.coli* BL 21 *rLysS* M – молекулярный маркер (M 12), 1-10 – образцы по порядку, 11 - отрицательный контроль (плаزمида рЕТ 28b), 12 - положительный контроль (плазмида рЕТ 28b *paPhyC*)

Далее провели трансформацию рекомбинантной плазмиды в клетки *E.coli* BL 21 рLysS. Трансформантов отбирали на среде LA с добавлением антибиотиков – *Km* и *Sm*. ПЦР-анализ подтвердил наличие интегрированного гена фитазы *raPhyC* во всех отобранных клонах-трансформантах (рис. 2).

Таким образом, получили экспрессионную систему на основе штамма *E.coli* BL 21 рLysS с интегрированным синтетическим геном фитазы *P.agglomerans*. Дальнейшая экспрессия белка в высокопродуктивном экспрессионном штамме позволит получить фитазу в количествах, необходимых для выделения, очистки и изучения ферментативных и биохимических свойств фермента.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Balaban N.P., Suleimanova A. D., Valeeva L. R., Chastukhina I. B., Sharipova M. R. Inositol Phosphates and their Biological Effects // Biomedical & Pharmacology Journal. 2014. V. 7. P. 433-437.

2. Greiner, R. Degradation of myo-inositol hexakisphosphate by a phytate-degrading enzyme from *Pantoea agglomerans* // The Protein Journal. 2004. V. 23. P. 577–585.

3. Lei, X.G. Stahl C.H. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection // Appl. Microbiol Biotechnol. 2001. V. 57. P. 474 – 481.

УДК 557.150;576.809.53

РЕТРОИНГИБИРОВАНИЕ НИКОТИНАТ ФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ CORYNEBACTERIUM FLAVUM ПРОДУКТАМИ РЕАКЦИИ

В.Ж. Цыренов, Н.Г. Дульянинова, А.А. Санданов, Б.Д. Мункуева

Восточно-сибирский государственный университет технологий и управления, 670013, Россия, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская 41-а.
esstu.biotechnolodgy@yandex.ru

В ходе исследовательской работы были проведены опыты по определению активности ферментов, участвующих в salvage синтезе у штаммов коринеподобных бактерий, изучено влияние НАД, АТФ и других нуклеотидов на активность ферментов.

Библиогр. 16 назв.

Ключевые слова: Никотинат-фосфорибозилтрансфераза, *Corynebacterium flavum*, ретроингибирование, salvage синтез,

Никотинат-фосфорибозилтрансфераза из *Corynebacterium flavum* ВСТИ 301 подвергалась ретроингибированию продуктами реакции: мононуклеотидом никотиновой кислоты, пирофосфатом и АДФ: дезамидоНАД и НАД также обладали ингибирующим действием. На активность фермента не влияли никотинамид и мононуклеотид никотинамида, аденин, аденозин, полиаденовая кислота, аденозин-5'-тетрофосфат, рибозо-5-фосфат, нуклеозидмонофосфаты, а также ФМН, ФАД и НАДФ, ЦТФ, ИТФ, УТФ и ГТФ могли заменить АТФ в реакции однако, сродство фермента к вышеуказанным нуклеозидтрифосфатам было ниже чем к АТФ.

Специально отобранные микроорганизмы из группы коринеподобных бактерий являются эффективными продуцентами нуклеотидов. Они осуществляют сверхсинтез НАД, АТФ из экзогенных предшественников – аденина, никотинамида или никотиназа по salvage пути биосинтеза (Цыренов, 2014). Биосинтез НАД происходит по пути Прейса-Хандлера и объединяет salvage синтез пиридиновых и пуриновых нуклеотидов (рис.1).

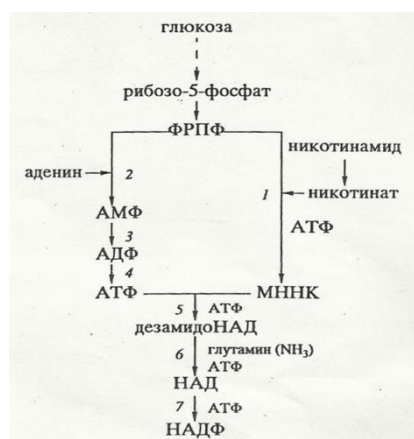


Рис. 1. Схема salvage пути синтеза НАД 1- никотинат-фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.11); 2 - аденин-фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.7); 3 – аденилаткиназа (КФ 2.7.4.3), 4 – нуклеозиддифосфаткиназа (КФ 2.7.4.6); 5 - дезамидоНАД-пирофосфорилаза (КФ 2.7.7.18); 6 - НАД-синтетаза (КФ 6.3.5.1), 7 – НАД-киназа (КФ 27.1.23)

Важная роль в salvage синтезе НАД отводится никотинат-фосфорибозилтрансферазе (НФРТаза, МННК-пирофосфорилаза, КФ2.4.2.11), ферменту, который катализирует образование мононуклеотида никотиновой кислоты из никотина и ФРПФ:



ФРПФ – 5-фосфорибозил-1-пирофосфат, МННК – мононуклеотид никотиновой кислоты

НФРТаза *in vivo* играет двойную роль. С одной стороны, способствует синтезу и восстановлению пула пиридиновых нуклеотидов после деградации НАД, а с другой стороны, дает клеткам возможность утилизировать экзогенную никотиновую кислоту для синтеза пиридиновых нуклеотидов.

Именно эта способность клеток к salvage синтезу в ряде случаев лежит в основе микробиологического получения различных коферментов, нуклеотидов и их производных штаммами-продуцентами. Действительно salvage синтез в этом отношении представляет большие возможности, которые и объясняют интерес к данному явлению. В связи с этим проблема изучения регуляции активности ферментов, участвующих в salvage пути синтеза НАД, становится особенно актуальной.

НФРТаза является одним из ферментов цепи биосинтеза НАД, наиболее чувствительным к регуляторным воздействиям. Активность фермента зависит от концентрации ортофосфата, угнетается различными нуклеозиддифосфатами. Фермент подвержен субстратному ингибированию. Активность НФРТазы регулируется продуктами реакции по принципу отрицательной обратной связи. Кроме того, у целого ряда организмов внутриклеточный уровень АТФ осуществляет быстрый контроль за образованием пиридиновых нуклеотидов, оказывая влияние на активность НФРТазы, первого фермента в никотинатной ветви salvage синтеза НАД [2].

Также существуют жесткие генетические механизмы, связанные с изменением количества фермента в клетке (репрессия-депрессия) [3,4]. Такая множественная регуляция обычно характерна для ферментов, которые лимитируют скорость определенных процессов, т.е. действуют на самом медленном этапе того или иного пути и поэтому ограничивают скорость всего процесса. Как считают

многие авторы, НФРТаза является именно таким ферментом в salvage пути биосинтеза НАД [5].

Данные обстоятельства, а также перспективность использования НФРаза в инженерной энзимологии определили необходимость подробнее изучить вопросы регуляции этого фермента из клеток коринеподобных бактерий, влияние на ее активность различных метаболитов salvage синтеза НАД, а также других нуклеотидов, что и являлось задачей данной работы.

Осуществить предварительные опыты по определению активности НФРТаза у пяти штаммов-продуцентов НАД, выделенных нами из природного источника и двух штаммов музейных культур. В данном исследовании остановились на двух культурах - *Corynebacterium flavum* ВСТИ 301 и *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872.

Биомассу *C. flavum* ВСТИ 301 получали культивированием на среде, описанной ранее [6]. 33-часовую культуру собирали центрифугированием при 4000 g в течение 20 мин, промывали 0.05 М К-фосфатным буфером, рН 7.4, и разрушали на прессе.

Все стадии выделения НФРТаза проводили при 4⁰С. Очистка фермента включала в себя получение бесклеточного экстракта, дробное высаливание сульфатом аммония от 40 до 65% насыщения, обработку кальций-фосфатным гелем, кислотную обработку 8 н. уксусной кислотой до рН 5.0, повторную колоночную хроматографию на DEAE-Sephacе 1 и гель-фильтрацию на Sephadex G-150 [7]. Эти ранее описанные процедуры, позволившие достичь очистки фермента в 150 раз, были дополнены еще одной: колоночной хроматографией на DEAE-Toyopearl HW-65, которая предшествовала гель-фильтрации на Sephadex G-150. В результате применения описанных процедур нам удалось очистить фермент в 500 раз.

Активность НФРТаза определяли в инкубационной среде следующего состава (мкмоль/мл): трис-фосфатный буфер, рН 8.5-50; АТФ, динатриевая соль - 0.5; MgCl₂ - 10; ФРПФ, магниевая соль - 0.5; /C¹⁴/НК (50 Кю/М) - 0.1. Общий объем реакционной смеси составлял 250 мкл. Реакцию инициировали добавлением 50 мкл ферментного препарата, смесь инкубировали в течение 20 мин при 37⁰С. Реакцию останавливали нагреванием в кипящей водяной бане в течение 1 мин. Белковый осадок удаляли центрифугированием

при 4000 g в течение 5 мин. Супернатант (6 мкл) наносили на пластинки "Silufol UV 254" (ЧСФР). Разделение проводили в системе растворителей изомасляная кислота : ледяная уксусная кислота : 1 н. водный аммиак (30 : 3 : 15). Пластинку высушивали. Пятна, соответствующие НК и МННК, вырезали, помещали во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-106 и просчитывали радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-4000 фирмы "Intertechnique" (Франция). За единицу активности фермента принимали количество мкмоль продукта реакции, образующихся за 1 мин.

Для определения концентрации моноклеотида никотиновой кислоты использовали спектрофотометрический метод, учитывая, что коэффициент молярной экстинкции раствора МННК (рН 7.0) при 275 нм, равен 4.3×10^3 [8]. Белок определяли по методу Лоури.

На очищенной НФРТазае из *S. flavum* ВСТИ 301 было исследовано влияние конечных продуктов реакции. Для НФРТазы известно, что МННК, являющийся одним из продуктов реакции, в концентрации 1 мМ ингибировал активность фермента из эритроцитов человека на 88%, из печени свиньи - на 86% [9, 10]. Причем по отношению к никотиновой кислоте ингибирование для гомологов различного происхождения всегда носило конкурентный характер, а по отношению ко второму субстрату ФРПФ тип ингибирования мог быть и неконкурентным, например для фермента из печени свиньи [10]. Нами было показано, что МННК также оказывал ингибирующее действие на НФРТазу из коринеподобных бактерий снижая активность фермента на 24% при концентрации 1 мМ. При этом константа ингибирования составила 1.9×10^{-3} М. По отношению к никотиновой кислоте и ФРПФ МННК проявлял конкурентное ингибирование, снижая сродство фермента к данным субстратам. В присутствии МННК K_m для никотината и ФРПФ возрастала с $0,56 \times 10^{-4}$ М до 1×10^{-4} М и с 1.45×10^{-4} М до 3.2×10^{-4} М соответственно. По отношению к АТФ МННК оказывал неконкурентный тип ингибирования (рис. 2). Ниациновые производные никотинамид и моноклеотид никотинамида не влияли на активность фермента.

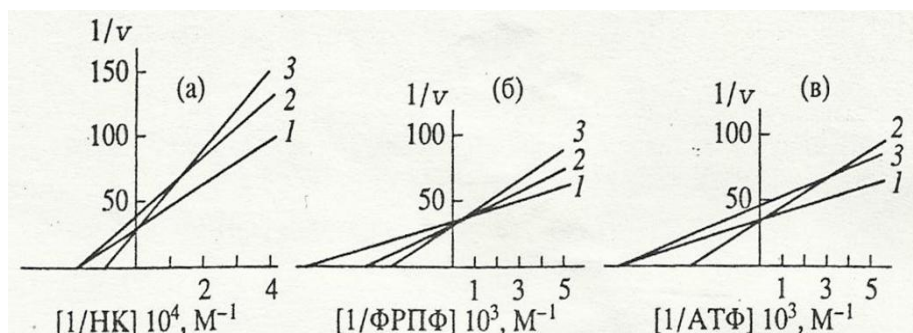


Рис. 2. Влияние продуктов реакции на активность НФРТазы из *C. Flavum*. а - $1/v$ при изменении концентрации НК; б - $1/v$ при изменении концентрации ФРПФ; в - $1/v$ при изменении концентрации АТФ.

1 - контроль, 2 - пирофосфат (0.6 мМ), 3 - МННК (0.9 мМ)

Исследование влияния еще одного конечного продукта реакции на активность НФРТазы из *C. flavum* ВСТИ 301 показало, что пирофосфат (ФФ) в концентрации 1 мМ ингибировал активность фермента на 40%. Константа ингибирования K_i ФФ равнялась 9×10^{-4} М. Пирофосфат являлся конкурентным ингибитором по отношению к АТФ и ФРПФ (рис. 2). Его действие выражалось в снижении сродства фермента к субстратам. Так, под действием ФФ K_m для АТФ увеличивалась с 1.54×10^{-4} М до 3.13×10^{-4} М, а K_m для ФРПФ с 1.43×10^{-4} М до 2.52×10^{-4} М.

АДФ действовал как конкурентный ингибитор по отношению к АТФ с константой ингибирования $K_i = 1.2 \times 10^{-3}$ М. Нуклеозиддифосфаты ГДФ, ИДФ, УДФ, ЦДФ и нуклеозидмонофосфаты АМФ, ГМФ, ИМФ, ЦМФ и ТМФ в концентрации 1 мМ практически не оказывали влияния на активность НФРТазы. Как уже отмечалось, в присутствии 1 мМ МННК или АДФ активность НФРТазы снижалась на 24 и 15% соответственно. Присутствие в той же концентрации обоих продуктов реакции в среде приводило к снижению активности фермента до 44%. Это указывает на то, что каждый из метаболитов действует на фермент независимо и имеет отдельный центр связывания, отличный от активного центра.

Ранее нами сообщалось, что НФРТаза из *C. flavum* ВСТИ 301 как и большинство микробных НФРТаз, является АТФ-зависимым ферментом и для проявления своей активности нуждается в присут-

ствии АТФ как обязательного кофактора или косубстрата. K_m для АТФ составила 1.54×10^{-6} М [7].

Нами показано, что ФРТазе из коринеподобных бактерий является АТФ-зависимым ферментом [7]. В данной работе показано, что другие нуклеозиды могут выступать в роли энергосопрягающего агента в МННК-образующей реакции, хотя и с меньшей эффективностью (Рис.3).

Таким образом, фермент проявлял наибольшее сродство к АТФ.

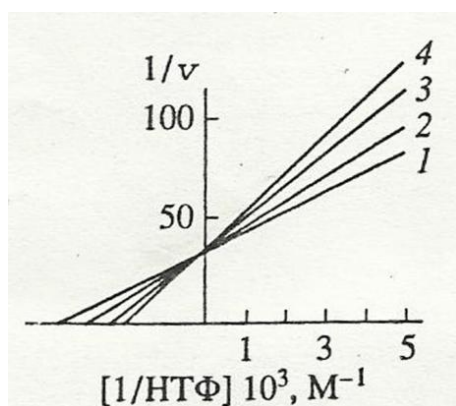


Рис. 3. Активность *C. flavum* ВСТИ 301 в присутствии различных нуклеозидтрифосфатов (НТФ).
1 – ЦТФ, 2 – ИТФ, 3 – УТФ, 4 – ГТФ

Аналогичные наблюдения относительно низкой нуклеотидной специфичности были сделаны для АТФ-зависимого фермента из *Bacillus subtilis* и дрожжей [3, 11].

Еще более слабый стимулирующий эффект (20-30%) по сравнению с АТФ оказывали нуклеозидтрифосфаты ИТФ, ЦТФ и ГТФ на активность фермента из бычьей печени. А в присутствии УТФ наблюдалось легкое ингибирование НФРТазной активности [12]. Фермент из печени свиньи не стимулировался ГТФ, остальные пуриновые нуклеотиды ингибировали его активность [10]. Следует отметить, что присутствие АТФ не является обязательным условием для проявления активности - НФРТазы животного происхождения. В этом случае АТФ выступает как положительный аллостерический эффектор, повышая активность фермента за счет снижения K_m для обоих субстратов [13,15].

Таким образом, было показано, что НФРТаза из клеток коринеподобных бактерий характеризуется низкой специфичностью по отношению к нуклеозидтрифосфатам. На активность НФРТазы не оказывали влияния аденин, аденозин, рибозо-5-фосфат, полиаде-

ниловая кислота и аденозин-5'-тетрафосфат. Исследование влияния НАД на активность НФРТаза показало, что он является более сильным ингибитором по сравнению с другими метаболитами ниацинового ряда, например, по сравнению дезамидоНАД [14]. Таким образом, НФРТаза является объектом ретроингибирующего действия НАД и его дезамидированного производного дезамидоНАД.

Анализ литературных данных показал, что активность НФРТаза, к настоящему времени выделенной как из животных тканей, так и из целого ряда микроорганизмов, не подвергалась ингибирующему действию со стороны дезамидоНАД, НАД и НАДФ.

Возможно, строго ограниченное содержание пиридиновых коферментов, свойственное нормально развивающейся клетке, поддерживается за счет регуляции других ферментов этого биосинтетического пути. Полученные нами результаты по ретроингибированию активности НФРТаза пиридиновыми нуклеотидами можно объяснить особенностями метаболизма данного микроорганизма. Являясь сверхпродуцентом НАД, он способен функционировать в условиях сверхсинтеза, подчиняясь действию иных механизмов регуляции нежели существуют в клетке с нормально функционирующей системой контрольных механизмов.

Если вернуться к схеме salvage синтеза НАД (рис. 1), то заметим, что начиная с образования МННК все три реакции пиридиновой ветви, завершающие эту синтетическую цепочку, а также последующая реакция фосфорилирования НАД до НАДФ, идут с участием АТФ. И поэтому, следуя принципу энергосбережения, можно считать физиологически оправданным, обнаруженный нами факт ингибирующего влияния пиридиновых нуклеотидов на НФРТазу, фермент, стоящий на воротах этого энергоемкого участка образования НАД, для обеспечения которого недостаточно того количества АТФ, которое образуется в нормально развивающейся клетке [16]. И хотя в условиях сверхсинтеза НАД имеет место и salvage синтез АТФ из экзогенных предшественников, тем не менее клетка в условиях сверхсинтеза вынуждена иметь дополнительные механизмы контроля, позволяющие ей скоординировать использование основного носителя биологической энергии, которым является АТФ, и не обессточить другие необходимые для жизни виды клеточной активности. Это особенно важно, если учесть, что все энергозависимые процес-

сы в живых системах прямо или косвенно сопряжены с затратой АТФ.

Тот факт, что у целого ряда организмов, включая те, где реакция образования МННК не сопряжена с гидролизом АТФ, доступность аденозинтрифосфата контролирует скорость синтеза НАД *in vivo* через регуляцию активности НФРТаза, еще раз подтверждает наличие механизмов регуляции, направленных на рационализацию обмена веществ. Синтез МННК и дезамидоНАД в клетке имеет смысл лишь в контексте образования НАД как целевого продукта. И если доступность АТФ не позволяет завершить данную биосинтетическую цепочку, то судьбу этих промежуточных метаболитов будут решать ферменты их деградации. Но в таких случаях имеющиеся регуляторные механизмы предотвращают накопление МННК и позволяют клетке избегать подобных холостых ходов.

Регуляция по принципу обратной связи, направленная на активность первого фермента salvage пути синтеза НАД, НФРТаза, представляется вполне логичной еще и потому, что это обычное явление, когда мишенью ингибирования конечными продуктами того или иного биосинтетического пути является фермент, осуществляющий первую реакцию данного пути.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Preiss J., Handler P. // J. Biol. Chem. 1958. V. 233. № 2. P. 493-500.
2. Баздырева Н.М., Подлепа Е.М., Тулохонова Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. № 6. С. 741-758.
3. Imsande J., Hrestidge L.S. // Biochim. Et Biophys. Acta. 1964. V. 85. №2. P. 255-273.
4. Baecker P.A., Yung S.G., Rodriguez M. et al. // J. Bacterid. 1978. V. 133. № 3. P. 1108-1112.
5. Imsande J., Pardee A. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. №4. P. 1305-1308.
6. Баздырева Н.М., Куцева Л.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 1984. Т. 20. № 3. С. 334-339.
7. Дульянинова Н.Г., Подлепа Е.М., Радина В.П., Быховский В.Я. // Прикл. биохимия и микробиология. 1995. Т.31. №6. С. 594-598.

8. Цыренов В.Ж. Биотехнология нуклеотидов: микробиологический синтез / отв. ред. А.М. Безбородов. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2014. 355 с.
9. Belerky P., Bogar K.I., Brenner C // Trends in Biochem Sci. 2007, Vol. 33, №1. P. 12-15.
10. Abbouni B., Ethariry H.M., Auling J // Arch. Microbiol 2004. Vol. 182. P.119-125/
11. Санданов А.А., Цыренов В.Ж., Пинуев И.О. Вестник ВСГУТУ, 2008, №3, С. 24-28.
12. Санданов А.А., Цыренов В.Ж., Островский Д.Н. Вестник ВСГУТУ, 2010, №2, С. 31-37.
13. Цыренов В.Ж., Тулохонова Л.П., Подлепа Е.М., Санданов А.А. Известия вузов. Прикладная химия и технология. Изд-во ИрГТУ, 2013, №1, С. 66-72.
14. Rodionov D., de Indeniis J Mancini C. et al., || Nuclieac Acid Research. 2008. Vol. 36. № 6. P. 2047-2059.
15. Busso N., Karabata M. et al. || Plas one. 2008. Vol.3. №5, P. 1-10.
16. Khan J.A., Tao X., Tong I. || J. Mol. Biol., 2006, Vol 13, P. 582-585.

УДК579.222

РЕКОМБИНАНТНАЯ СИНТЕТАЗА ЦЕФАЛОСПОРИНОВ-КИСЛОТ: ГЕНОМНЫЙ КОНТЕКСТ, КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА И СОЗДАНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ СИНТЕЗА ЦЕФАЛОСПОРИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

М.А.Эльдаров¹, А.В.Скляренко², А.В.Марданов¹, А.В.Белецкий¹,
А.А.Жгун¹, М.В.Думина¹, Н.В. Медведева², Д.Э.Сатарова²,
Н.В.Равин¹,
С.В.Яроцкий²

¹Центр «Биоинженерия» РАН, 117312, Россия, г.Москва, Проспект 60-летия Октября, д.7, корп.1, eldarov@biengi.ac.ru.

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Россия, г. Москва, 1-ый Дорожный пр, д.1.

Расшифрована геномная последовательность штамма E.coli ВКПМ В-10182 – продуцента синтетазы цефалоспоринов-кислот (CASA), проведено ее сравнение с геномом родительского штамма E.coli ATCC 9637, выявлены множественные полиморфизмы и различия в наборах кодируемых генов. Ген CASA выделен, клонирован в оригинальный вектор экспрессии, получен эффективный штамм-продуцент CASA. За счет подбора параметров культивирования штамма и вариантов конструкций вектора проведена оптимизация экспрессии CASA в клетках E.coli.

Разработан метод иммобилизации рекомбинантной CASA на макропористом акрилатном носителе, содержащем активные эпокси-группы. С использованием полученного гетерогенного биокатализатора продемонстрирована возможность высокоэффективной синтеза цефазолина из 3-[(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-тиометил]-7-аминоцефалоспориновой кислоты (ММТД-7-АЦК) и метилового эфира 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты (МЭТЗУК) со степенью трансформации ММТД-7-АЦК в цефазолин до 95 %.

Ключевые слова: ферменты, антибиотики, цефалоспорины, биокатализаторы, геномика, экспрессия белков.

Антибиотики подкласса цефалоспоринов-кислот насчитывают более полутора десятков полусинтетических бета-лактамов, широко востребованных на российском и зарубежном рынках [1]. Разработка биокаталитических технологий их получения является перспективной альтернативой традиционному химическому синтезу [2].

Фермент синтетаза цефалоспоринов-кислот (cephalosporin-acid synthetase, CASA) обладает специфичностью к синтезу цефалоспоринов-кислот путем ацилирования аминокислоты, несущей β-лактамноое ядро антибиотика, соответствующей карбоновой кислотой, содержащей боковую цепь антибиотика. CASA продуцируется различными штаммами *E.coli*, в том числе штаммом *E.coli* ВКПМ В-10182 [3].

Цель работы состоит в разработке метода синтеза антибиотиков цефалоспоринов-кислот с использованием биокатализатора на основе рекомбинантной CASA. Для достижения поставленной цели необходимо было расшифровать геном штамма *E.coli* ВКПМ В-10182, идентифицировать гена CASA, создать штаммы-продуценты CASA, разработать метод получения биокатализатора на основе рекомбинантной CASA и метод биокаталитической трансформации субстратов в цефазолин с использованием такого биокатализатора.

Геном штамма *E.coli* ВКПМ В-10182 был расшифрован методом пиросеквенирования с использованием платформы Roche 454 GS FLX. Была получена библиотека из 257,360 чтений со средним размером 637 пн. Чтения были собраны в 74 контига с помощью Newbler assembler 2.8 (454 Life Sciences, Branford, CT). Размер N50 длины контига составил 198,256 пн [4]. Для аннотации генома использовали принцип быстрой аннотации с помощью технологии подсистем (RAST сервер)[5] Для картирования полиморфизмов использовали программу GS Reference Mapper 2.9 с параметрами по умолчанию. Для сравнения набора генов использовали BLAST [6].

Вектор экспрессии CASA pMD0107 и его производные были сконструированы на основе вектора pSVH0107 [7]. Продукцию вариантов CASA в трансформантах штамма *E.coli* BL21(DE3) осуществляли по принципу «автоиндукции» [8]. Штамм *E.coli* BL21(DE3)/pMD0107 депонирован как ВКПМ В-12206.

Получение ферментных препаратов на основе рекомбинантной CASA осуществляли путем гомогенизации биомассы высоким давлением, осаждения белков из бесклеточных экстрактов ПЕГ6000, растворения осадка в подходящем объеме буфера. Биокатализаторы на основе CASA получали путем иммобилизации фермента на макропористом носителе акрилатной природы Relizyme™ EP113/S. Синтез цефазолина проводили в объеме 20 мл при 30°C в 0,3 М натрий-фосфатном буфере pH 7,5 с установлением далее спонтанного градиента не ниже 6,0, используя 0,8 г влажного биокатализатора, 60 мМ ММТД-7-АЦК, 145-280 мМ МЭТЗУК. Для изучения динамики процесса через заданные промежутки времени отбирали пробы, которые анализировали методом ВЭЖХ.

По данным секвенирования размер генома штамма *E.coli* ВКПМ В-10182 составляет 4936462 п.н. [4]. Геном кодирует 4820 открытых

рамок считывания для белков, средний размер которых составляет 899 п.н, 70 генов тРНК.

Сравнение последовательности генома ВКПМ В-10182 с родительским штаммом ATCC 9637 выявило относительно часто встречающиеся полиморфизмы - 32 инсерции/делеции и 1780 точковых мутаций. Такой уровень полиморфизма свидетельствует о долгой селекционной истории штамма, который подвергался многократным раундам мутагенеза и селекции. В том числе были выявлены мутации, приводящие к инактивации генов РНКаз и бета-лактамазы, которые могут быть связаны с повышенной продукцией CASA у этого штамма.

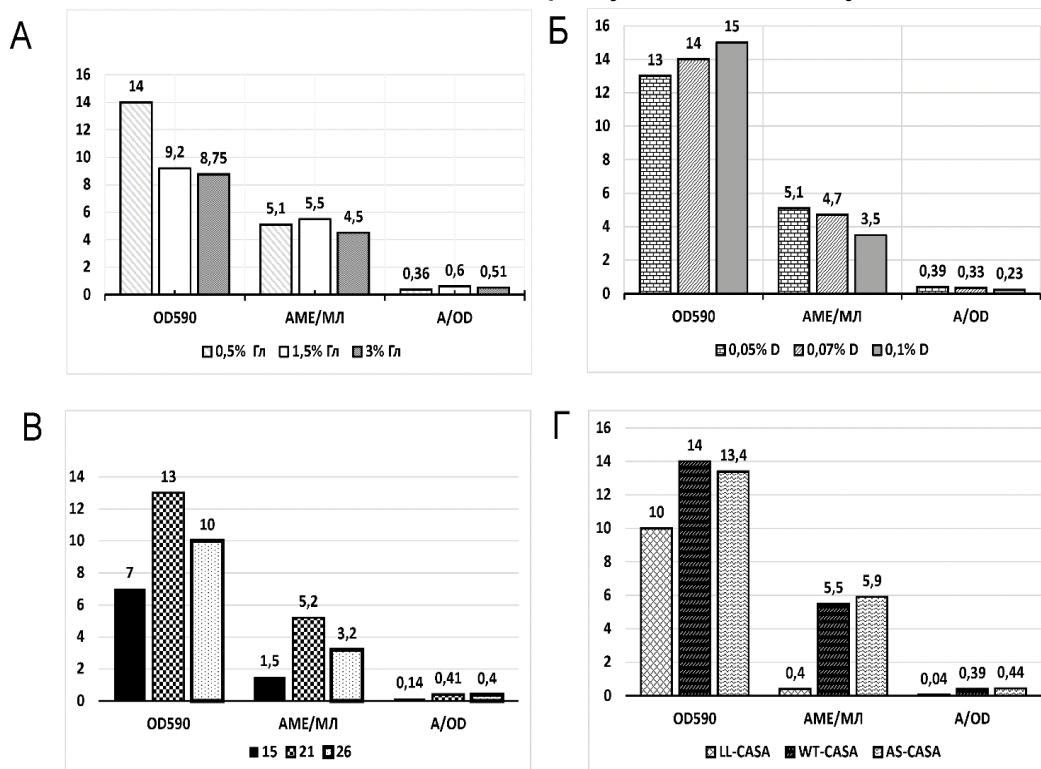


Рис. 1. Оптимизация экспрессии CASA. Влияние концентрации глицерина (А – 0,5%, 1,5%, 3%), глюкозы (Б-0,05%, 0,07%, 0,1%), температуры культивирования (В-15°C, 21°C, 26°C) и конструкции вектора (Г- LL-CASA- «безлидерный» вариант, WT-CASA- собственный сигнальный пептид CASA, AS-CASA- pro-часть CASA с сигнальным пептидом L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*) на рост штамма (OD590), накопление пенициллин-амидазной активности (А ME/мл) и удельную активность (A/OD)

Ген CASA был идентифицирован как полный гомолог пенициллинацилазы, практически идентичный последовательности PGA штамма ATCC 9637. Ген был выделен и клонирован в экспрессионный

вектор под контроль T7 промотора. Полученный штамм ВКПМ В-12206 обеспечивал высокий синтез CASA в условиях «автоиндукции», по уровню продуктивности штамм превышал известные аналоги в 2-3 раза.

При экспрессии CASA мы столкнулись с распространенной проблемой – неполным процессингом синтезируемого белка и накоплением нерастворимого предшественника [9]. Для оптимизации выхода функционально-активного фермента варьировали такие параметры культивирования, как, посевная доза, состав среды, pH, температура, тип экспрессионной конструкции (рис 1).

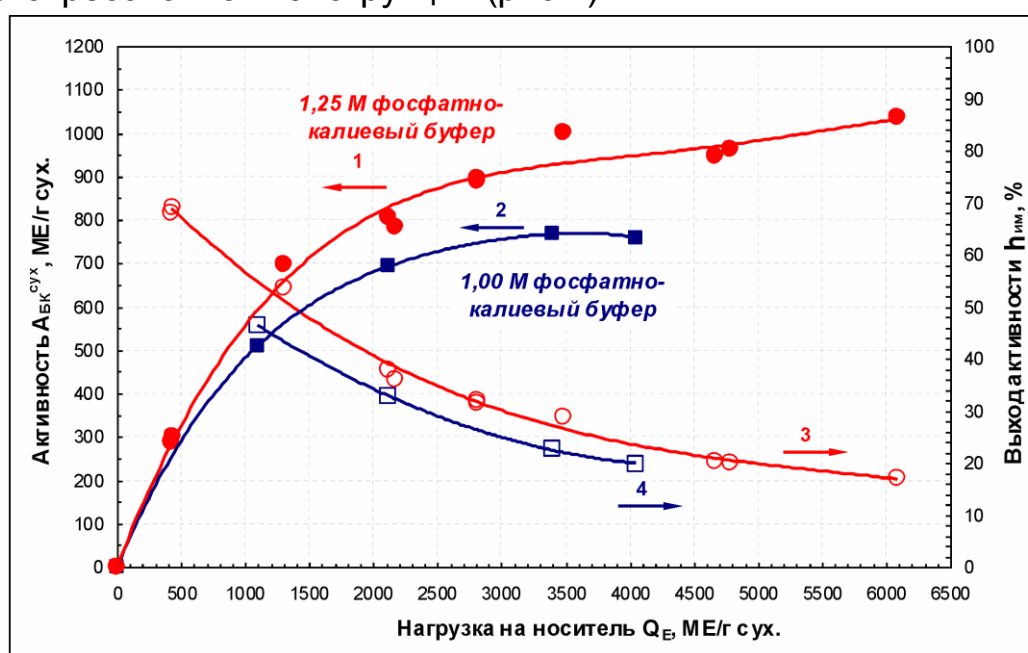


Рис. 2. Влияние концентрации буфера на эффективность иммобилизации рекомбинантной CASA на носителе Relizyme EP113/S. 1, 3 – зависимости $A_{БК}^{сух}$, МЕ/г сух. и $\eta_{им}$, %, соответственно, от нагрузки на носитель при концентрации буферного раствора 1,25 М; 2, 4 – зависимости $A_{БК}^{сух}$, МЕ/г сух. и $\eta_{им}$, %, соответственно, от нагрузки на носитель при концентрации буферного раствора 1,0 М

Замена собственной сигнальной последовательности CASA на сигнальный пептид L-аспарагиназы не оказала влияние на продукцию CASA, а полное удаление сигнального пептида снижало продукцию CASA более чем на порядок (рис 1,Г).

За счет подбора оптимальных концентраций глюкозы, глицерина и магния, снижения pH и оптимальной температуры удалось на 20-25% поднять уровень продукции CASA в полученном штамме ВКПМ В-12206 – до 6,5 МЕ/мл.

Экстракты CASA из полученной биомассы иммобилизовали на Relizyme™ EP113/S, варьируя такие параметры, как ионная сила и pH буфера, нагрузка фермента на носитель, тип блокирующего реагента. Разработанный метод обеспечивает при выходе активности $\eta_{им} = 30 \div 60$ % получение биокатализатора с синтетазной активностью 450 \div 900 МЕ/г сух (рис 2).

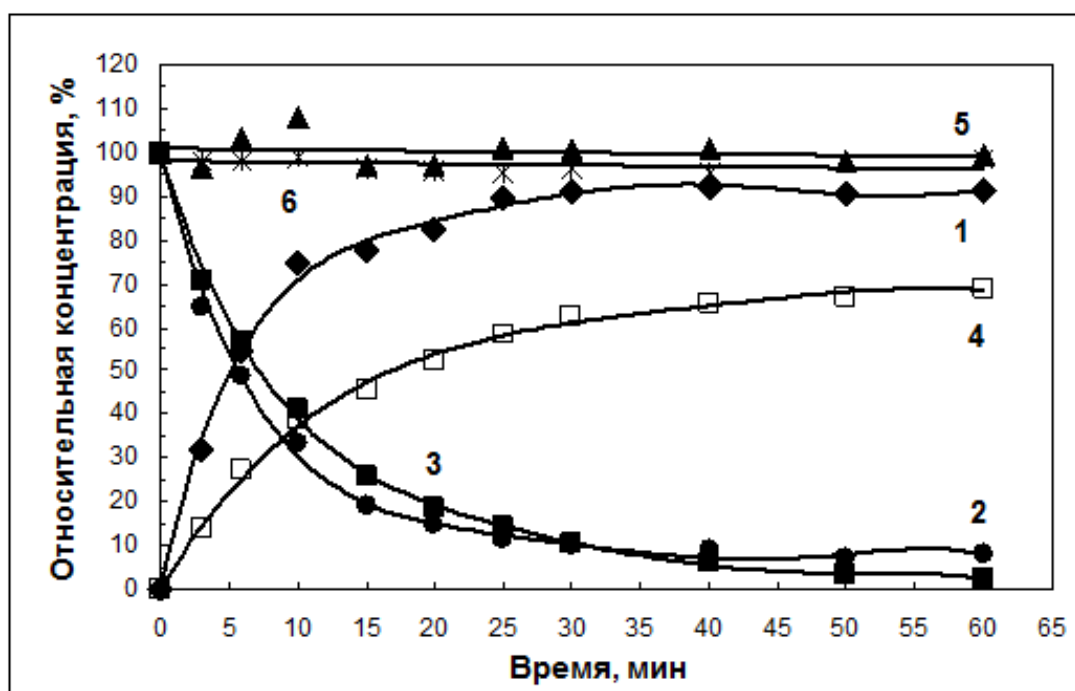


Рис. 3. Динамика изменения состава реакционной смеси при кинетически-контролируемом синтезе цефазолина под действием иммобилизованной рекомбинантной CASA. Условия: 30 °С; 0,3 М фосфатно-натриевый буфер; спонтанный градиент pH 7,5→6,0; Концентрация фермента =9,6 МЕ/мл; ММТД 7 АЦК =60 мМ; МЭТЗУК =235 мМ; 1(ромбы) – цефазолин; 2 (кружки) –ММТД-7-АЦК; 3 (полные квадраты) – МЭТЗУК; 4 (пустые квадраты) – ТЗУК; 5 (треугольники) –баланс по β-лактаму; 6 (звездочки) – баланс по ТЗУК

Полученный биокатализатор обеспечивал эффективный синтез цефазолина с выходом 75-95 % от ММТД-7-АЦК в зависимости от исходного мольного избытка ацилирующего агента над ключевой

аминокислотой. При мольном избытке 3,9 М/М достигается выход 90 % (рис 3), а избыток 4,7 М/М обеспечивает выход цефазолина 95 %. Кривая накопления целевого антибиотика характеризуется продолжительным плато, что свидетельствует о существенном превышении скорости синтеза цефазолина над скоростью его гидролиза.

Расшифрована геномная последовательность штамма *E.coli* – продуцента CASA. Ген CASA идентифицирован как прямой гомолог гена пенициллин G ацилазы.

Ген клонирован в оригинальный вектор экспрессии, получен эффективный штамм-продуцент CASA. Высокий уровень продукции CASA полученным штаммом позволил разработать на его основе высокоэффективный метод получения гетерогенного биокатализатора для процессов ферментативного синтеза цефазолина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ – Соглашение о предоставлении субсидии №14.604.21.0022 от 17.06.2014 - уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60414X0022.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Курочкина В.Б., Ныс П.С. Ферментативный синтез беталактамовых антибиотиков. I. Цефазолин. // Антибиот Химиотер. 1999. Vol. 44, № 5. P. 12–16.
2. Sklyarenko A.V., Kurochkina V.B. E.A.M. Enzymatic transformation and synthesis of beta-lactam antibiotics. // Egorov A.M. Zaikov G. New Res. Biotechnol. Biol. Med. – Nov. Sci. Publ. 2006. Vol. chapter 8. P. 73–86.
3. Способ получения биокатализатора, обладающего активностью в отношении синтеза цефалоспоринов-кислот. Патент РФ 2420581 [Online]. URL: <http://www.findpatent.ru/patent/242/2420581.html> (accessed: 07.11.2014).
4. Mardanov A. V et al. Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain VKPM B-10182, Producing the Enzyme for Synthesis of Cephalosporin Acids. // Genome Announc. 2014. Vol. 2, № 6.
5. Aziz R.K. et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. // BMC Genomics. 2008. Vol. 9. P. 75.

6. Altschul S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. // *Nucleic Acids Res.* Oxford Univ Press, 1997. Vol. 25, № 17. P. 3389–3402.

7. Khatuntseva S.A. et al. Purification and immobilization of recombinant variants of *Brevundimonas diminuta* glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expressed in *Escherichia coli* cells // *J. Biotechnol.* 2008. Vol. 133, № 1. P. 123–126.

8. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures // *Protein Expression and Purification.* 2005. Vol. 41, № 1. P. 207–234.

9. Srirangan K. et al. Biotechnological advances on penicillin G acylase: pharmaceutical implications, unique expression mechanism and production strategies. // *Biotechnol. Adv.* 2013. Vol. 31, № 8. P. 1319–1332.

II. ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ. КАЧЕСТВО И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

УДК 664.1

КОМПЛЕКСНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ СОКОВОГО ПРОИЗВОДСТВА НА ПРИМЕРЕ ЖОМА ЖИМОЛОСТИ

Е. В. Аверьянова¹, О. В. Грищенко²

¹Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВПО АлтГТУ им. И.И. Ползунова,
659316, Россия, г. Бийск, ул. Ленинградская, 33/1, Jenny2810@bk.ru

²Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВПО АлтГТУ им. И.И. Ползунова,
659311, Россия, г. Бийск, ул. Васильева, 39, bt@bti.secna.ru

В результате проведенных исследований по переработке отходов сокового производства была разработана комплексная схема получения БАВ из жомов ягод жимолости сорта «Памяти Гидзюка».

Ключевые слова: жом жимолости; пектин; антоциановый краситель.

Среди дикорастущих и культивируемых ягод, произрастающих в предгорной зоне Алтая, выделяется жимолость сорта «Памяти Гидзюка», так как биохимический состав жимолости богат и разнообразен. Они содержат 13–16 % сухих веществ, 8 % сахаров, от 1 до 5 % – органических кислот, до 1,5 % – пектинов и до 0,3 % дубильных веществ; 400–1800 мг % Р-активных соединений (антоцианов, катехинов, лейкоантоцианов). Витаминный состав представлен провитамином А, витаминами группы В и аскорбиновой кислотой.

Благодаря наличию биологически активных веществ ягоды жимолости полезны в профилактике и при лечении проблем с сердечнососудистой системой, при малокровии, гипертонии и атеросклерозе. Из-за высокого содержания пектинов, дубильных веществ

и органических кислот, оказывают на организм человека противосклеротическое действие.

В связи с этим жимолость используют как в пищевой промышленности для производства соков, вин, компотов, джемов, так и для приготовления косметических кремов. Однако, в результате производства напитков скапливается большое количество жома, который богат пектиновыми веществами и антоциановыми красителями, но не находит широкого применения из-за специфического горького вкуса, обусловленного наличием бутиловых эфиров, яблочной и лимонной кислот.

Поэтому представлялось интересным рассмотреть использование жома, полученного с одного из пищевых предприятий г. Бийска, для получения из него пектина и пищевого красителя. Пектин из выжимок получали известным способом экстракцией 0.5%-ным раствором щавелевой кислоты с последующим осаждением спиртом [1]. Полученный пектин подсушивали на воздухе; выход составил 6,34 %. Полученный порошок имеет тёмно-лиловое окрашивание.

Для полученного образца пектина был проведен анализ физико-химических показателей. Результаты представлены в таблице.

Таблица – Физико-химические показатели пектина жимолости

Показатель		Значение
рН		2,000 ± 0,001
Массовая доля пектовой кислоты, %		61,330 ± 0,001
Количество общей золы, %		2,470 ± 0,001
Количество золы, нерастворимой в HCl, %		0,110 ± 0,001
Массовая доля ацетильных групп, %		0,038 ± 0,001
Массовая доля карбоксильных групп	Свободные, %	1,755 ± 0,001
	Связанные, %	10,846 ± 0,001

Тёмно-лиловое окрашивание образца пектина обусловлено наличием антоцианов, содержание которых в образце жома по экспериментальным данным составило 0,95 %, а в пектине 0,39 %. Таким образом в процессе извлечения пектина в него переходит до 41 % красителя. Поэтому нами предложено проводить перед выделением пектина извлечение из жома антоцианового красителя. Блок-схема комплексной переработки жома представлена на рисунке.

В процессе реализации предложенной блок-схемы был получен бледно-розовый образец пектина с выходом 6,34 %, соответствующий по содержанию карбоксильных групп высокоэтерифицированному пектину. И антоциановый краситель с выходом 0,95 %.

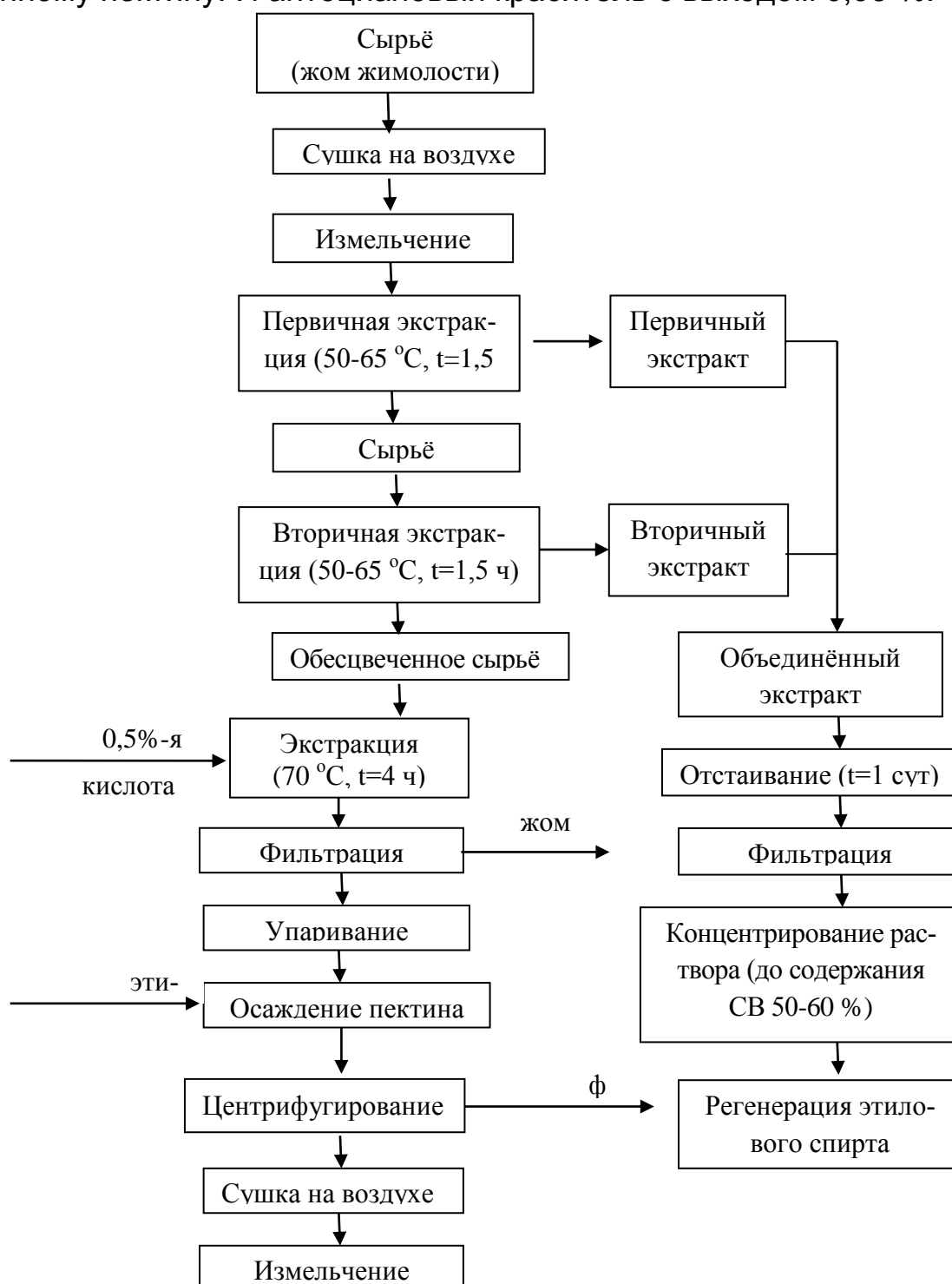


Рис. Блок-схема комплексной переработки жома жимолости

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аверьянова, Е.В. Пектин. Получение и свойства/Е.В.Аверьянова, Р.Ю. Митрофанов.-Бийск.:Изд.Алт.гос.тех.уч-та, 2015.- 44с.

УДК 604.6: 608.32: 658.562

О ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ СОХРАНЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ НОРМ МАРКИРОВКИ И СИСТЕМЫ КОНТРОЛЯ ГМИ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

А.Г. Еникеев, Ю.В. Нурминская, Т.В. Копытина, Л. А. Максимова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132. Тел. (3952)42-66-76, факс (3952)51-07-54, e-mail: enikeev@sifibr.irk.ru

Представлен анализ эффективности принятой, в настоящее время, в РФ системы контроля ГМИ в продуктах питания. Сделан вывод, что существующая правовая база в этой области морально устарела, вследствие чего реальной системы контроля над оборотом ГМИ в России нет. Создание эффективно работающей системы контроля, на основе действующих подходов, в сложившейся экономической обстановке реализовать невозможно. Обсуждаются пути выхода из сложившейся ситуации.

Библиогр. 10 назв.

Ключевые слова: Генетически модифицированные ингредиенты в продуктах питания, маркировка, системы контроля.

В 2015 г исполняется 21 год с момента появления первого коммерческого пищевого генно-модифицированного растения (ГМР). За прошедшие годы доля ГМР в мировом сельскохозяйственном производстве выросла до 11%. По данным Международной службы по приобретению и использованию агро-биотехнологий на конец 2014 года площади под посевами таких культур занимали 181,5 млн га [ISAAA, 2014]. Одновременно с началом широкомасштабного использования трансгенных растений появилось понятие

рисков ГМО, то есть признание возможности их негативного воздействия на здоровье человека и окружающую среду [Meуer, 2011]. Единого мнения по этому вопросу в научной литературе на сегодняшний день нет [Конов и др., 2005; Кузнецов и др., 2010; Тарасов и др., 2004, Чемерис и др., 2014]. В сложившихся условиях, доступность информации о наличии ГМИ в продуктах питания является необходимым условием обеспечения потребителям права выбора, гарантированного ФЗ 2300-1 РФ «О защите прав потребителей» и другими нормативными актами РФ. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 8 ноября 2000 г введена обязательная маркировка продуктов питания, содержащих более 5% генетически модифицированных ингредиентов (ГМИ) (с 5 марта 2004 г эта планка снижена до 0,9%). В 2002 г введена государственная регистрация всех ГМО при их первом выпуске в окружающую среду, промышленном производстве и импорте. Контроль за соблюдением этих норм возложен на органы государственного санитарного контроля.

На сколько эффективна существующая правовая база в области контроля ГМО и какой степени она способна обеспечить права потребителей на предоставление в полном объеме информации о качестве (составе) того или иного продукта? В 2003 году усилиями ученых Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева и Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта разработаны ГОСТы Р52173 и Р52174, регламентирующие порядок определения генетически модифицированных ингредиентов (ГМИ) в продуктах питания. Однако в силу несовершенства правовой базы эти документы оказались абсолютно нереализуемыми. Для количественного анализа ГМИ используется метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР). Первый соответствующий прибор iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories Inc, USA) внесен в «Государственный реестр средств измерений, допущенных к использованию в РФ» в 2007 г (рег.№ 34547-07), через 4 года после принятия ГОСТов. Позднее список были внесены еще несколько аналогичных приборов импортного производства. Эксплуатация этих приборов допускается только по стандартам ASA и ISO. Аналогичные по своим возможностям, значительно более дешевые отечественные приборы АК-32 (Санкт-Петербург), периодически, с 2009 г, то появляю-

щиеся, то исчезающие из данного документа, так и не прошли процедуру валидации на соответствие международным стандартам. Вступление России в ВТО поставило окончательный крест на возможности создания отечественной системы контроля продуктов питания на содержание ГМИ. Согласно правилам этой организации принятие национальных стандартов после вступления в ВТО не допускается.

На сегодняшний день стоимость одного импортного прибора составляет $\approx 45000\text{€}$, стоимость одного анализа до 10000 руб.

Обслуживание прибора предполагает наличие высококвалифицированного специалиста (молекулярного биолога). Простое сопоставление параметров бюджета указанных государственных учреждений и сумм, необходимых для проведения мониторинга хотя бы крупных торговых сетей, ставит под сомнение возможность такого контроля. По расчетам специалистов Института биохимии и генетики УрО РАН (г.Уфа), только для оснащения соответствующих лабораторий необходимо более 250 млрд. руб. [Чемерис, 2015, личное сообщение]. В такой ситуации говорить о создании полноценной системы контроля ГМИ в продуктах питания невозможно.

Отдельно следует остановиться на пороговой норме обязательной маркировки содержания ГМИ в продуктах питания 0,9%. Указанная норма имеет, вероятно, некоторое технологическое значение, но не имеет никакого отношения к вопросам безопасности. Современные аналитические методы позволяют выявлять значительно меньшее содержание ГМИ (0,01%), однако определить различия в содержании ГМИ с такой точностью не представляется возможным. Если для биолога вариация результатов от 0,89% до 0,91% является естественной, то с юридической точки зрения эти результаты могут иметь различные правовые последствия. Различия в результатах могут быть и следствием использования различных тест-систем. Подробный анализ проблем количественного определения ГМИ дан в работе Чемерис и др., 2014.

Установление единого порога маркировки содержания ГМИ лишено смысла и в силу того, что уровень потенциальных рисков ГМО определяется, в первую очередь, индивидуальными характеристиками каждого генетически модифицированного организма [Nielsen, 2003]. Единых критериев оценки безопасности ГМО не су-

ществует [Magaña-Gómez, Calderón de la Barca, 2009; Talas-Oğraş, 2011]. В «Руководстве по оценке влияния генетически модифицированных организмов на окружающую среду и здоровье» (2005), составленном специалистами Института Эдмонса (США) подчеркивается, что методы создания ГМО не имеют аналогов, следовательно, к ним не могут быть применены стандартные методы оценки безопасности. Вопрос о возможных рисках ГМО имеет высокую степень неопределенности. Вопрос о безопасности практического использования должен решаться индивидуально для каждого генетически модифицированного организма.

Таким образом, принятая сегодня система контроля ГМИ в продуктах питания не только морально устарела, но и не может быть реализована в сложившейся экономической ситуации. В качестве альтернативной действующей предлагается новая система контроля ГМИ в продуктах питания, базирующаяся на следующих принципах:

Признать, что маркировка продуктов питания на наличие ГМИ носит только уведомительный характер, и не может рассматриваться в качестве критерия безопасности продукта.

Обязательной маркировке подлежат все продукты питания содержащие ГМИ, независимо от их доли.

Принимая во внимание, что 86ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» запрещает выращивание ГМО в каких-либо целях кроме научных, единственным источником ГМИ является импорт.

Целесообразно возложить контроль над ввозом ГМИ в РФ на органы Государственной таможенной службы. Основу таможенного контроля ГМИ должен составлять не инструментальный анализ, а контроль предоставления экспортером информации о характеристиках ввозимого товара.

Для обеспечения нормативно-правовой базы действий указанных в п.4 необходимо срочное подписание и ратификация Федеральным собранием РФ «Картахенского протокола по биобезопасности».

Контроль за перемещением ГМИ на территории РФ (на основе документов товарооборота) возлагается на Роспотребнадзор РФ с помещением всей информации на специальном сайте в Интернете.

В случае необходимости проведения инструментального анализа ГМИ целесообразно привлечение к выполнению этих исследований Институтов РАН и соответствующих кафедр ведущих ВУЗов РФ, имеющих соответствующее оборудование и опыт работы.

Предлагаемые меры позволят значительно повысить уровень защищенности потребителей при одновременном сокращении расходов бюджета.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Конов А.Л., Голиков А.Г., Скрябин К.Г. Генетически модифицированные растения: реальные и мифические риски // Российский химический журнал. 2005.- Т. XLIX, №4. - С.84-91.

2. Кузнецов В.В., Куликов А.М., Цыдендамбаев В.Д. Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры и полученные из них продукты: пищевые, экологические и агротехнические риски // Известия аграрной науки. 2010. – Т. 8, №. 3. – С. 10-30.

3. Руководство по оценке влияния генетически модифицированных организмов на окружающую среду и здоровье: Пер. с англ. (В 2-х ч. Ч. 1. Вводная информация, сопроводительные тексты к блок-схемы) – М.: МСоЭ, 2005. -102 с.

4. Тарасов М.Ю., Бондарев В.П., Максимов В.А., Поклонский Д.Л. Генетически модифицированные организмы: «за» и «против». Существует ли угроза безопасности России? // Химическая и биологическая безопасность 2004. - № 3-4 (15-16).- С.3-7.

5. Чемерис А.В., Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Надо ли опасаться ГМО? Взгляд несторонних наблюдателей на истерию вокруг // Биомика. 2014.- Том 6, № 2. 77-138. Режим доступа: <http://biomics.ru/nomera/2014/72-nado-li-opasatsya-gmo-vzglyad-nestoronnih-nablyudateley-na-isteriyu-vokrug.html>

ISAAA's GM Crop Statistics for 2014. Режим доступа: <http://www.cban.ca/Press/Media-Backgrounders/Nothing-New-ISAAA-s-GM-Crop-Statistics-for-2014>

6. Magaña-Gómez J.A., Calderón de la Barca A.M. Risk assessment of genetically crops for nutrition and health // Nutrition Reviews. 2009. -Vol.67, №1. - P.1-16.

7. Meyer H. Systemic risks of genetically modified crops: the need for new approaches to risk assessment // Environmental Sciences Europe. 2011- Vol. 23, №7. - P.1-11 Режим доступа: <http://www.enveurope.com/content/23/1/7>

8. Nielsen K.M. Transgenic organisms: time for conceptual diversification? Nature Biotechnology. 2003. - Vol.21, №3. - P. 227-228.

9. Talas-Oğraş T. Risk assessment strategies for transgenic plants// Acta physiologiae plantarum. 2011. – Vol. 33, №. 3. – P. 647-657.

УДК 615.281.9: 615.322: 664

**АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА СУХОГО
ИЗ ВЫЖИМОК ЯГОД БРУСНИКИ И КЛЮКВЫ**

Н.Д.Замбулаева¹, С.Д.Жамсаранова¹, О.С. Дансарунова²

¹Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
670013, Россия, г. Улан-Удэ, ул.Ключевская, 40 В, стр.1, nzambulaeva@mail.ru

²Бурятская государственная сельскохозяйственная академия им.
В.Р. Филиппова
670034, Россия, г. Улан-Удэ, ул. Пушкина, 8,
ms.dansarunova@mail.ru

*Изучена антимикробная активность сухих экстрактов из выжимок ягод брусники и клюквы, произрастающих на территории республика Бурятия. Определена минимальная подавляющая концентрация экстрактов, подавляющая рост и развитие бактерий - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*.*

Библиогр.4 назв.

Ключевые слова: выжимки ягод брусники и клюквы, экстракт, антимикробная активность, минимальная подавляющая концентрация.

Антимикробные свойства ягод брусники и клюквы известны с давних пор. В народной медицине плоды брусники и клюквы применяют для профилактики и лечения простудных заболеваний и ангины. Включение их в рацион человека улучшает обмен веществ в организме, способствует лучшему усвоению пищи, содействует успешному лечению многих болезней.

Переработка дикоросов дает пищевые продукты высокого качества. Одним из способов переработки ягод является производство соков, в процессе которого образуется большое количество вторичных ресурсов. В большинстве случаев отходы соковых производств используют на корм скоту, превращают в компост или утилизируют. Учитывая промышленные масштабы переработки ягод, а также содержание в их выжимках ценных биологически активных веществ, использование ягодных отходов является перспективной задачей.

Выжимки из ягод брусники и клюквы, произрастающих на территории Республики Бурятия, представляют собой природный комплекс биологически активных веществ, в число которых входят вещества, проявляющие консервирующие, антиоксидантные и антимикробные свойства [1], действующие на организм мягче, чем добавки искусственного происхождения. Так, наличие бензойной кислоты в растительном сырье обуславливает его устойчивость к действию микроорганизмов, благодаря чему ягоды, а также продукты ее переработки могут храниться длительное время [2]. Кроме того, антимикробный потенциал растений определяется синергизмом действия витаминов и фенольных соединений [3]. Использование экстрактов из выжимок ягод дикоросов позволит расширить область их применения в пищевой промышленности, нежели применение в засушенном и измельченном виде.

Целью настоящей работы явилось определение антимикробной активности сухих экстрактов из выжимок ягод брусники и клюквы.

Для исследования антимикробной активности сухих экстрактов из вторичного сырья дикоросов были использованы ягоды брусники и клюквы, произрастающие на территории Тункинского района республики Бурятия. Выжимки, полученные после отжима соков, предварительно высушивали в сушильном шкафу с инфракрасным излу-

чением при $T=35-40^{\circ}\text{C}$ в течение 40 мин и измельчали в фарфоровой ступке до размера частиц 1-2 мм.

Процесс экстракции проводили с применением СВЧ-воздействия при различных значениях технологических параметров: содержание этанола в водно-спиртовом экстрагенте, гидромодуль (соотношение массы сырья к растворителю) и продолжительность экстракции. На основании результатов математического планирования выявлены условия максимального извлечения биологически активных веществ: а) экстракция для высушенных выжимок ягод брусники - 60,4 %-ным этиловым спиртом, время экстракции - 63,3 секунд, гидромодуль 1:10; б) для высушенных выжимок ягод клюквы - 40 %-ный спирт этиловый, 120 секунд, гидромодуль 1:10. Сухие экстракты получали путем удаления экстрагента вакуумной сушкой.

Оценку антимикробной активности изучаемых экстрактов проводили методом серийных разведений в 0,5мл мясо-пептонного бульона (МПБ) [4]. В качестве тест-культуры микроорганизмов использовали *Escherichia coli* 113-3, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* 11170, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* 79, борьба с действием которых является основной задачей при хранении и переработке пищевых продуктов. Штаммы тест-культур были представлены кафедрой микробиологии, вирусологии и ветсанэкспертизы БГСХА им.В.Р. Филиппова.

Исходное разведение сухих экстрактов готовили в стерильной питательной среде в концентрации 1000 мг/мл. Затем готовили ряд двойных последовательных разведений (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128). К каждому разведению добавляли смыв суточной агаровой культуры испытуемых микроорганизмов, соответствующей стандарту мутности 0,5 по МакФарленду. Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. В качестве контроля исследуемые штаммы микроорганизмов высевали на МПБ без добавления экстракта.

Минимальную подавляющую концентрацию определяли по наименьшей концентрации исследуемого экстракта, которая подавляла видимый рост микроорганизма (пробирка с прозрачной средой).

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования (табл.) свидетельствуют о наличии антибактериальной активности сухих экстрактов.

Из данных таблицы следует, что антибактериальное действие исследуемых экстрактов наиболее выражено у *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes*, минимальная ингибирующая концентрация сухих экстрактов из выжимок ягод брусники и клюквы не отличалась, и составила 15,63 мг/мл. Рост остальных изучаемых бактерий подавлялся при большей концентрации экстрактов. Так, по отношению к *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus* наиболее активен был экстракт из выжимок ягод клюквы, МПК которого составила 31,25 мг/мл, а МПК экстракта из выжимок ягод брусники – 62,5 мг/мл.

Таблица. Антимикробная активность сухих экстрактов из выжимок ягод брусники и клюквы

Вид микроорганизма	Минимальная подавляющая концентрация сухого экстракта (МПК), мг/мл	
	Из выжимок ягод клюквы	Из выжимок ягод брусники
Грамотрицательные бактерии		
<i>Salmonella typhimurium</i>	31,25	62,5
<i>Escherichia coli</i>	15,63	15,63
Грамположительные бактерии		
<i>Staphylococcus aureus</i>	31,25	62,5
<i>Bacillus cereus</i>	31,25	62,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	15,6	15,63

Выводы

1 Сухие экстракты из выжимок ягод брусники и клюквы обладают противомикробным эффектом разной степени выраженности.

2. Чувствительность *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes* к действию исследуемых ягодных экстрактов проявлялась в равной степени, МПК которых составила 31,25 мг/мл.

3. Экстракт из выжимок ягод клюквы проявил более выраженное антимикробное действие по отношению к *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Замбулаева, Н.Д. Отходы, образующиеся при получении соков из ягод брусники и клюквы, как перспективное сырье с полифункциональным эффектом / Н.Д. Замбулаева, С.Д. Жамсаранова // Материалы Международной научно-практической конференции «Техника и технологии продуктов питания: Наука. Образование. Достижения. Инновации». – Улан-Удэ, 2014. – С. 145-155.

2. Щеглов Н.Г. Технология консервирования плодов и овощей: учебно-практическое пособие. – М.: Палеотип. 2002. 380с.

3. Карпова Е.А., Храмова Е.П., Фершалова Т.Д. Флавоноиды и аскорбиновая кислота у некоторых представителей рода *Vegetaria* L // Химия растительного сырья. 2009. №2. С.105-110.

4. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

УДК 577.117:634.74

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЦЕСС ЭКСТРАКЦИИ АНТОЦИАНОВ ИЗ ВЫЖИМОК ЯГОД ИРГИ И ГОЛУБИКИ

Е.П. Каменская, Ю.С. Малямова

Бийский технологический институт (филиал) АлтГТУ им. И. И. Ползунова,
г. Бийск 659305, Россия, г. Бийск, ул.Трофимова, 27,
malyamova133@yandex.ru

В ходе проделанной работы было исследовано влияние различных концентраций пектолитического («Пектинекс БЕ 3-L») и цитолитического («Целлюксил») ферментных препаратов, а также их мультиэнзимных композиций на эффективность извлечения антоцианов из выжимок ягод ирги и голубики. В работе подобраны

оптимальные концентрации индивидуальных ферментных препаратов в составе мультиэнзимных композиций для повышения выхода антоцианов.

Библиогр. 3 назв.

Ключевые слова: антоцианы; ирга; голубика; ферментные препараты; мультиэнзимные композиции.

В последнее время среди натуральных красных пищевых красителей наибольшую популярность получили антоциановые красители (Е 163), которые являются широко распространенными водорастворимыми колорантами и содержат в качестве основных пигментов антоцианы, являющиеся представителями флавоноидных соединений [3]. Кроме того, антоцианы привлекают всё большее внимание исследователей не только как потенциальные колоранты, но также возрастает их роль и как лекарственных субстанций. Известно, что они отличаются высокой антиоксидантной активностью, препятствуют образованию тромбов, снижают уровень холестерина, способствуют профилактике онкологических заболеваний, нейтрализуют свободные радикалы и др. [1].

Тем не менее, выработка натуральных пищевых красителей в настоящее время ограничена как в масштабах, так и в ассортименте, и потребность в них до настоящего времени покрывается частично за счет синтетических красителей, которые не являются абсолютно безвредными. Поэтому разработка новых технологий производства натуральных красителей и совершенствование существующих являются приоритетными направлениями исследований в этой области.

Основным источником получения натуральных красителей антоциановой природы являются отходы соковых и консервных производств, перерабатывающих плодово-ягодное сырье. Для получения пищевых красителей высокого качества из данного сырья перспективным является усовершенствование или разработка новых способов экстрагирования красящих пигментов с применением различных ферментных препаратов.

Известно, что применение ферментных препаратов позволяет интенсифицировать процессы экстракции, улучшить качество гото-

вой продукции, увеличить ее выход, а также сэкономить ценное пищевое сырье [2].

Поэтому цель данной работы состояла в оптимизации условий экстракции антоцианов из замороженных выжимок ягод ирги (*Amelanchier ovalis*) и голубики (*Vaccinium uliginosum*) с использованием стадии ферментализации некрахмальных полисахаридов клеточных стенок растительного сырья отечественными ферментными препаратами и их мультиэнзимными композициями (МЭК).

Основной задачей нашей работы явилось изучение влияния различных концентраций пектолитических («Пектинекс БЕ 3-L») и цитолитических («Целлюксил») ферментных препаратов, а также их мультиэнзимных композиций на продолжительность экстракции антоцианов и их содержание в экстрактах.

В процессе исследований изучались следующие параметры: концентрация ферментного препарата, продолжительность экстракции и соотношение ферментных препаратов «Целлюксил» и «Пектинекс БЕ 3-L» в составе МЭК. В ходе эксперимента использовались различные концентрации ферментного препарата «Пектинекс БЕ 3-L»: 0,001-0,01 мл/г, и «Целлюксил»: 0,01-0,1 %. Экстракция проводилась при температуре 50 °С и гидромодуле – 1:10. В качестве контроля использовались водные экстракты, подкисленные лимонной кислотой до pH 2,7, без внесения ферментного препарата. Содержание антоцианов в экстрактах определялось каждые 30 минут колориметрическим методом.

В результате эксперимента было установлено, что при использовании пектолитического ферментного препарата «Пектинекс БЕ 3-L» максимальное количество антоцианов в экстракте из выжимок ирги отмечалось через 180 минут при концентрации 0,005 мл/г и составило 9,79 г/л, а для голубики при 0,001 мл/г и составило 26,3 г/л.

При использовании ферментного препарата «Целлюксил» максимальный выход антоцианов наблюдался также через 180 минут при концентрации 0,1 %, что позволило увеличить извлечение антоцианов на 10 %, по сравнению с предыдущим опытом. Для выжимок голубики оптимальной оказалась концентрация ферментного препарата 0,05 %, при этом результаты достоверно не различались с первым опытом.

Использованные ферментные препараты были комплексными, однако не обладали одновременно цитолитическими и пектолитическими ферментами. Поэтому в дальнейшей работе была изучена возможность обработки выжимок МЭК из ферментных препаратов «Целлюксил» и «Пектинекс БЕ 3–L» в соотношениях 1:1, 1:2, 2:1. На основании полученных результатов были составлены сводные диаграммы (рисунок 1), на которых представлены оптимальные результаты содержания антоцианов в экстрактах.

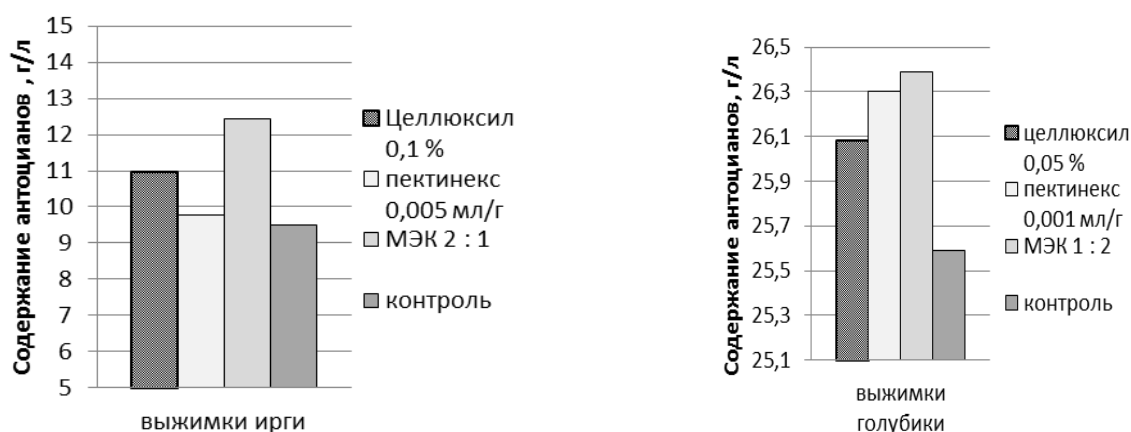


Рис. 1. Содержание антоцианов в экстрактах из выжимок ирги и голубики при использовании ферментных препаратов и мульти-энзимных композиций

Из представленных данных видно, что при экстракции антоцианов из ирги целесообразно использовать МЭК в соотношении 2:1, а при экстракции голубики МЭК в соотношении 1:2, что позволяет увеличить содержание антоцианов в экстрактах до 12,4 г/л и до 26,4 г/л соответственно.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Дейнека Л.А., Шапошников А.А., Дейнека В.И., Сорокопудов В.Н. Антоцианы: природные антиоксиданты и не только // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина и фармация. 2006. № 3(23). Вып.4. С. 92 -100.
2. Ферментные препараты в пищевой промышленности / Под ред. В.Л. Кретовича, В.Л. Яровенко. — М.: Пищевая промышленность, 1975. – 535с.

3. Хайрутдинова А.Д. Разработка технологии антоциановых красителей из растительного сырья / А.Д. Хайрутдинова. – Воронеж, 2004. – С.6 – 21.

УДК: 577.114.083:635.24

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЭКСТРАГИРОВАНИЯ
ИНУЛИНА ИЗ КОРНЕПЛОДОВ ТОПИНАМБУРА
СОРТА «БЕЛЫЙ»**

Е.П. Каменская, Н.А Горяева

Бийский технологический институт (филиал) АлтГТУ им. И. И. Ползунова, г. Бийск 659305, Россия, г. Бийск, ул.Трофимова, 27, ngor-yaeva19@yandex.ru

В работе показана возможность оптимизация процесса экстракции инулина из корнеплодов топинамбура и увеличение его выхода при использовании воздействия полей сверхвысокой частоты на стадии предобработки сырья с дальнейшей водной экстракцией при температуре 80 °С.

Библиогр. 3 назв.

Ключевые слова: инулин; топинамбур; поля сверхвысокой частоты, полифенолоксидаза.

В настоящее время в связи с популяризацией здорового образа жизни возрос интерес к инулиносодержащим культурам и продуктам их переработки, в частности, топинамбуру. Ценность топинамбура обуславливается, прежде всего, его химическим составом. До 40 % массы сухих веществ топинамбура составляет инулин – единственный природный резервный полисахарид, состоящий на 95 % из фруктозы. Физиологическая ценность, которого состоит в том, что он стимулирует двигательную активность желудочно-кишечного тракта, обладает выраженным желчегонным действием, антитоксическим эффектом, стимулирует синтез витаминов, активизирует иммунные механизмы защиты и модифицирует микрофлору кишечника [3].

Поскольку инулин является одним из важнейших продуктов, обладающих высокой биологической активностью, актуальным является изучение оптимизации его экстракции и возможностей увеличения его выхода из инулиносодержащего сырья.

Целью настоящей работы является оптимизация технологических режимов процесса экстрагирования инулина из корнеплодов топинамбура.

Объектом исследования являлся топинамбур (*Helianthus tuberosus*) сорта «Белый» осеннего сбора 2014г. районированный в Алтайском крае (содержание инулина – 12%). В качестве параметров оптимизации были выбраны следующие показатели: температура и продолжительность экстрагирования (опыт 1) и предобработка клубней топинамбура полями сверхвысокой частоты (опыт 2).

Клубни топинамбура, очищенные от кожуры, непосредственно перед экстракцией измельчали до размера 5-10 мм. После кратковременной дозировки стружки топинамбура в водный экстрагент через каждые 20 мин отбирались пробы суспензии, фильтровали и в фильтрах определяли концентрацию редуцирующих веществ по методу Бертрана и концентрацию инулина по методу Щербакова.

На первом этапе эксперимента проводилось исследование продолжительности воздействия различных температур в диапазоне от 30°C до 80°C на степень извлечения инулина (гидромодуль 1:2). Результаты исследования зависимости концентрации инулина от температуры и продолжительности экстракции приведены на рисунке 1, из которого видно, что максимальная концентрация инулина – 8,7 г/л была зафиксирована при температуре 80°C через 80 минут с момента начала экстракции.

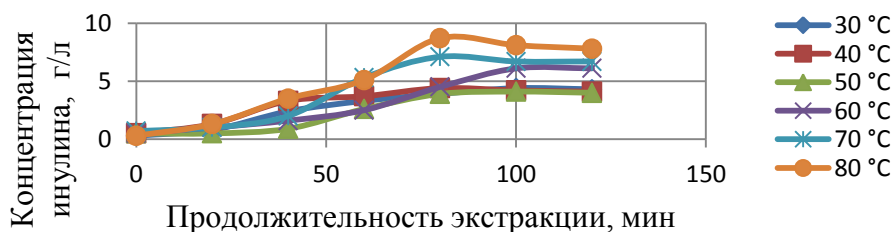


Рис. 1. Зависимость содержания инулина от температуры и продолжительности экстракции

Для интенсификации процесса экстракции и увеличения выхода инулина проводилась предобработка корнеплодов полями сверхвысо-

кой частоты, которая обеспечивает ослабление структурных связей и частичное разрушение клеточных стенок материала, а также приводит к инактивации фермента полифенолоксидазы клубней топинамбура [2]. Для определения активности полифенолоксидазы использовали косвенный метод визуального определения цветности, основанный на потемнении экстракта с течением времени (1-4 мин) при обработке излучением различной мощности (140 Вт, 280 Вт и 420 Вт). Определение цветности экстрактов проводили по адаптированной методике [1]. Результаты исследований представлены на рисунке 2.

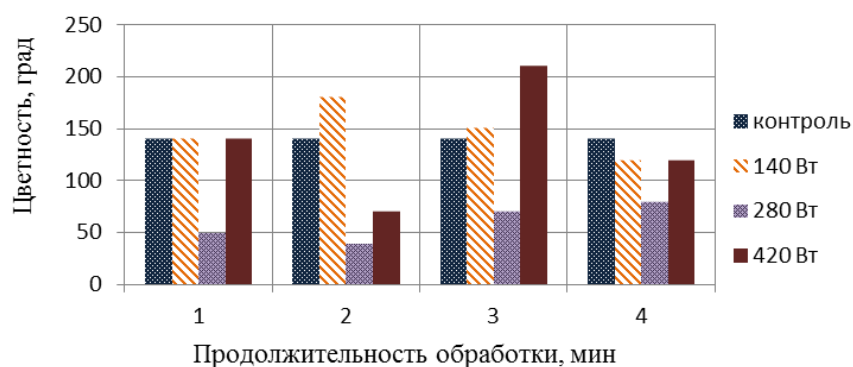


Рис. 2. Влияние мощности и длительности СВЧ обработки на активность полифенолоксидазы

На основании полученных данных можно сделать вывод что, предобработка клубней топинамбура полем СВЧ мощностью 280 Вт/кг в течение 2 минут перед измельчением ведет к инактивации фермента полифенолоксидазы. На последнем этапе работы выделяли инулин с использованием условий оптимизации. Результаты зависимости выхода инулина от предобработки сырья представлены на рисунке 3.

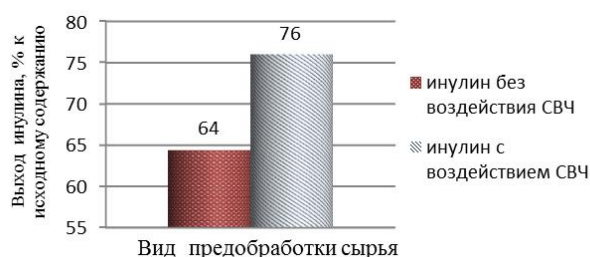


Рис. 3. Зависимость выхода инулина от вида предобработки сырья

Таким образом, было установлено, что использование предобработки корнеплодов топинамбура сорта «Белый» полями СВЧ мощностью 280 Вт/кг в течении 2 мин, не только интенсифицирует процесс экстракции инулина при температуре 80 °С в 2,5 раза, но и позволяет увеличить выход инулина на 12 %.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. ГОСТ Р 52769-2007. Вода. Методы определения цветности. Введ. 2009-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 2009
2. Екутеч Р.И, Определение оптимальных условий экстрагирования инулина из клубней топинамбура/ Р.И. Екутеч, В.В. Кондратенко// Современные технологии хранения и переработки сельскохозяйственного сырья. Краснодар. – 2010. С.13-17.
3. Сафронова Т.Н. Технологические аспекты получения пасты из топинамбура. //Хранение и переработка сельхозсырья, № 10, 2008. – С. 20-23.

УДК 341.45.21.93

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА МАКРОФИТА LEMNA MINOR И ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕГО НА ПИЩЕВЫЕ ЦЕЛИ

Е.В. Климова

ФГБОУ ВПО Госуниверситет-УНПК,
302020, Россия, г. Орел, ул. Наугорское шоссе, 29, kl.e.v@yandex.ru

Для обоснования перспективности применения ряски малой (Létna mínor) как источника хлорофилла установлено повышенное содержание хлорофилла а и b (8,604 мг/100г), содержание сухих веществ– 5-6%, белка – 24-28%, клетчатки –12-14%, целлюлозы – 9-10%. Исследовано влияние температуры на термостабильность хлорофилл из ряски, показавшие, что потери хлорофилла составляют не более 15-17%. Доказана возможность использования хлорофилла ряски в качестве функциональ-

ной добавки в пищевых продуктах, в технологии которых не требуются жесткие режимы стерилизации.

Библиогр. 5 назв.

Ключевые слова: ряска; хлорофилл; пищевые продукты.

Ряска малая (лат. *Lémna mínor*) – многолетнее водное растение, распространенное в водоемах со стоячей водой. В сухом веществе ряски содержится до 38 % белка, до 5 % жира, 17-23 % клетчатки, 6 % кальция, 3 % фосфора, 2 % магния. Другие микроэлементы (в мг на 100 г сухой массы): 0,048 мг кобальта, 0,018 мг брома, 0,032 мг меди, 0,7 мг никеля, 4,8 мг титана, марганец, цинк, ванадий. Особенно богата ряска бромом и йодом, что обуславливает ее определенное воздействие на живые организмы. Также в ряске содержатся тритерпеновые соединения и флавоноиды и хлорофилл [1, 2].

Известно около 10 хлорофиллов. У всех высших растений содержатся хлорофиллы *a* и *b* [5]. Известно, что строение молекулы хлорофилла имеет сходства со строением молекулы гемоглобина крови. Единственное отличие заключается в том, что в центре хелатного комплекса в хлорофилле находится атом магния, а в гемоглобине - железо. Поэтому хлорофилл способен оказывать на кровь воздействие, сходное с действием гемоглобина [3].

Представлялось перспективным выделение хлорофилла из водного макрофита ряски малой (*Lemna minor*) для использования в технологии пищевых продуктов.

На базе Госуниверситета-УНПК (г. Орел) разрабатывается новая технология культивирования макрофита *Lemna minor* и получения хлорофилла, а также технологии продуктов с его использованием. Для обоснования возможности использования данного водного растения было установлено содержание хлорофилла *a* и *b* методом спектрофотометрии [4]. Были установлено содержание хлорофилла, мг: *a* – 6,176; *b* – 2,423; *a+b* – 8,604.

Сравнив полученные данные с количеством хлорофилла, выделяемым из других зеленых растений, например из листьев крапивы (от 0,7 до 1,1 г на 1 кг зеленой массы), установили, что в ряске содержание хлорофилла в среднем 8,604 г на 1 кг зеленой массы, что значительно отличает ее от других зеленых растений. Тем самым подтверждается перспективность использования ряски для по-

лучения хлорофилла. Определено содержание сухих веществ в ряске – 5-6%, белка – 24-28%, клетчатки – 12-14%, целлюлозы – 9-10% на сухое вещество.

Исследовано влияние температуры на хлорофилл из ряски, так как известно, что зеленый пигмент отличается низкой стабильностью [2]. Исследования показали, что потери хлорофилла при кипячении в течении 20 минут составляют не более 15-17%. Это открывает возможность использования данного хлорофилла в качестве функциональной добавки в пищевых продуктах, в технологии которых не требуются жесткие режимы стерилизации.

БИЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Никифоров Л.А., Дмитрук С.Е. Изучение биоэлементного состава *Lemna minor* и *Lemna trisulca* // Микроэлементы в медицине. 2008. Т. 9, № 12. С. 23–24.

2. Никифоров Л.А., Охотина Н.С., Дмитрук С.Е. Сравнительный анализ изучения химических и фармакологических свойств растений рода *Lemna* // VII Межрегиональная научно-практическая фармацевтическая конференция «Биологически активные соединения в профилактике заболеваний и укреплении здоровья нации». Новосибирск, 2007. С. 24–26.

3. Патент RU 2183127, 10.06.2002 ПМК С07D487/22, Способ синтеза производных хлорофилла с двумя N,N-диметиламетильными группами/Белых Дмитрий Владимирович, Кучин Александр Васильевич, Тарабукина Ирина Степановна; Институт химии Коми - № 2007113245/04, заяв. 09.04.2007, опубл. 27.10.2008, Бюл№1. 5 с.

4. Смашевский Н.Д. Практикум по физиологии растений / Уч. пос.-Астрахань: Астраханский государственный университет, 2011. 77с .

5. Штяхтин С.В., Трухачева Т.В. Возможности и перспективы использования производных хлорофилла для создания эффективных и безопасных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии // Вестник фармации. 2010. № 2. С.87 - 106.

УДК 664.681.9

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА КОРЖИКОВ ПРИ ХРАНЕНИИ

С.И. Лукина С.И., А.А. Журавлев, И.П. Пешкина

Воронежский государственный университет инженерных технологий,
394036, г. Воронеж, проспект Революции, 19, lukina.si@yandex.ru

Исследовано изменение показателей качества коржиков в процессе их хранения. Установлено, что применение композитной смеси из муки нутовой, рисовой и кукурузной, а также инвертного сиропа в рецептуре коржиков позволяет улучшить физико-химические и структурно-механические показатели качества изделий и продлить срок их хранения.

Библиогр. 3 назв.

Ключевые слова: коржики, показатели качества, срок хранения.

Основной задачей хлебопекарной и кондитерской промышленности сегодня является разработка технологий производства качественно новых продуктов функционального назначения, потребление которых будет способствовать профилактике и укреплению здоровья россиян. С целью повышения пищевой и биологической ценности коржиков, пользующихся популярностью у детей дошкольного и школьного возраста, желательна замена большей части муки пшеничной высшего сорта на нетрадиционные виды муки, которые характеризуются повышенным содержанием белка, полиненасыщенных жирных кислот, пищевых волокон и микронутриентов.

Проведенные нами исследования показали целесообразность применения в технологии коржиков таких нетрадиционных видов муки, как нутовая, рисовая и кукурузная в виде мучной композитной смеси, с целью улучшения показателей качества и пищевой ценности изделий. Разработан способ производства мини-коржиков «Веселые смайлики», предусматривающий внесение муки нутовой – 24 %, рисовой и кукурузной – по 18 % от общей массы муки в рецептуре [1, 2].

Цель данной работы – исследование изменения показателей качества разработанных изделий в процессе хранения.

Объектами исследования являлись образцы коржиков: 1 – молочный (контроль) [3], 2 – мини-коржики «Веселые смайлики», приготовленные на сахаре-песке; 3 – мини-коржики «Веселые смайлики», приготовленные на инвертном сиропе. Образцы хранили в течение 5 сут при температуре (16 ± 2) °С и относительной влажности воздуха 70-75 %. Качество изделий оценивали по изменению физико-химических, структурно-механических и микробиологических показателей.

Установлено, что при хранении от 1 до 5 сут влажность коржиков снижалась: контрольного – от 14,3 до 9,1 % (на 36 %), образца 2 – от 13,9 до 10,9 % (на 21,6 %), образца 3 – от 13,5 до 11,9 % (на 12 %). В процессе хранения уменьшалась масса изделий. Наибольшая убыль массы (10 %) наблюдалась у коржика молочного, наименьшая (3,8 %) – у образца, приготовленного на инвертном сиропе, среднее значение (7 %) имел образец, приготовленный на сахаре-песке. Инвертный сироп характеризуется антикристаллизационными свойствами, способствующими меньшей потере влаги в изделии.

Таблица 1. Структурно-механические показатели коржиков

Наименование показателей	Образец	Продолжительность хранения, сут				
		1	2	3	4	5
Предельная относительная деформация	1	0,0148	0,0121	0,0098	0,005	0,005
	2	0,0156	0,114	0,0084	0,007	0,00
	3	0,0179	0,0171	0,0138	0,012	0, 08
Предельное напряжение изгиба, Па	1	1,3	1,4	1,45	1,74	2,03
	2	1,1	1,12	1,2	1,26	1,4
	3	1,2	1,24	1,30	1,38	1,41
Модуль упругости, МПа	1	218,0	249,0	284,0	305,0	323,0
	2	45,0	98,0	115,0	134,0	158,0
	3	74,5	82,2	12 ,0	134,0	170,0

В процессе хранения снижается способность изделия к набуханию и поглощению воды. Поэтому степень свежести изделий можно определить по изменению гидрофильных свойств их коллоидов. Намокаемость изделий при хранении до 5 сут уменьшалась,

причем более значительные изменения были выявлены у контрольного образца (на 30 %), что 1,5 раза превышало значение данного показателя у коржиков «Веселые смайлики». В процессе хранения изменялись структурно-механические показатели изделий: увеличивались предельное напряжение изгиба и модуль упругости, снижалась предельная относительная деформация (табл. 1).

В образцах наблюдалось увеличение относительной упругости изделий, причем наибольшие изменения были отмечены в контрольном образце на протяжении всего периода хранения.

Проведенный микробиологический анализ показал (табл. 2), что по количеству мезофильных аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов, дрожжей и плесени коржики «Веселые смайлики» на 5-е сутки хранения соответствовали требованиями СанПиН 2.3.2.1078-01.

Таблица 2. Микробиологические показатели коржиков «Веселые смайлики»

Наименование показателей	Значения для исследуемой пробы	Норма по СанПиН 2.3.2.1078 – 01
КМАФАнМ, КОЕ/ г	2,0·10 ³	Не более 2,5·10 ³
Плесени, КОЕ/ г	20	Не более 50
Дрожжи, КОЕ/ г	10	Не более 50

На основании результатов анализа рекомендован максимальный срок хранения мини-коржиков «Веселые смайлики» в течение 5 сут при температуре $(16 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха не более 75 %.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Журавлев, А.А. Разработка состава мучной композитной смеси для коржиков [Текст] / А.А. Журавлев, С.И. Лукина, К.С. Савилова // Материалы IV Международной научно-технической конференции «Новое в технологии и технике функциональных продуктов питания на основе медико-биологических воззрений». – Воронеж: ВГУИТ, 2014. – С. 259-262.

2. Лукина, С.И. Технология коржиков с нетрадиционными видами муки [Текст] / С.И. Лукина, А.А. Журавлев, К.С. Савилова // Международный научно-исследовательский журнал: Сборник по результатам XXIII заочной научной конференции Research Journal of International Studies. - Екатеринбург: МНИЖ. – 2014. - № 11, Ч. 2. – С. 44-46.

3. Сборник технологических нормативов: Сборник рецептов на торты, пирожные, кексы, рулеты, печенье, пряники, коврижки и сдобные булочные изделия [Текст] / сост. В.Т. Лапшина, Г.С. Фонарева, С.Л. Ахиба; под. ред. А. П. Антипова. – М.: Хлебпродинформ, 2000. – 720 с.

УДК 664.951 (06):663.1

БИОПОТЕНЦИАЛ РЫБНОЙ ЧЕШУИ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ТЕХНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ

О.Я. Мезенова, Л.С. Байдалинова, В.И. Воробьев, Н.Ю. Мезенова

ФГБОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет», 236022, Калининград, Советский проспект,1: mezenova@klgtu.ru; baydalinova@nevmail.ru; mobi.dik.10@mail.ru
lost_13@inbox.ru;

Рассмотрен химический состав чешуи леща, сардинеллы, судака. Определены аминокислотный и жирнокислотный составы белков и липидов чешуи, на основе которых рассчитаны показатели их биологической ценности. Идентифицирован состав минеральных веществ чешуи. Показано рациональное использование чешуи рыб в составе биологически активных добавок для спортсменов и рецептов кормов для рыб в аквакультуре.

Библиография 4 названия.

Ключевые слова: рыбная чешуя, гидролизаты, спортивное питание, биологически активные добавки, кормовые добавки, аквакультура

Рыбная чешуя является вторичным сырьем (или отходами) при производстве пищевой рыбной продукции и в настоящее время практически не используется. В Калининградской области накопи-

вается около 140 т чешуи за год, при этом наибольший удельный вес приходится на чешую сардины и сардинеллы, идущих на производство консервов, а также на чешую леща и судака Балтийского моря, из которых производят кулинарную продукцию. Известно, что в состав чешуи рыб входят многие ценные биологически активные вещества (БАВы), необходимые как организму человека для активного развития [1, 2], так и тканям рыб, выращиваемых в аквакультуре. Это обусловило актуальность данной работы.

Целью исследований являлось определение химического состава и содержания индивидуальных биологически активных веществ в чешуе сардинеллы, судака и леща для обоснования ее использования в пищевых и кормовых целях.

Чешуя, в зависимости от вида рыб, составляет от 0,8 до 6,0% ее массы, при этом содержание в ней БАВ-нутрицевтиков может колебаться при влажности чешуи 50,9 – 60,4% в пределах (% массы): 0,3 – 0,8 (липиды); 12,8 – 20,5 (протеины); 14,4 – 23,0 (минеральные вещества). Особое значение имеет основной белок чешуи – коллаген, содержание которого может достигать 20% и более массы чешуи [2].

Особенностью рыбного коллагена является содержание в нем практически всех незаменимых аминокислот, за исключением триптофана, он имеет повышенное количество глицина, пролина, оксипролина, аланина, присутствует таурин. При этом в нем отмечено более низкое, чем в коллагене животных, содержание некоторых разветвленных аминокислот (гистидин, фенилаланин, лизин, лейцин, валин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты), следовательно, он имеет меньшее число поперечных связей между линейными макромолекулами. Следствием этого является его повышенная усвояемость, пониженная температура застудневания и плавления. Другой спецификой рыбного коллагена является несколько иной аминокислотный состав одной из цепей, содержащих гидроксипролин и гидроксизин, следствием чего является пониженная температура сокращения и разложения коллагена рыбы относительно аналогичной температуры теплокровных животных. Так, если коллаген говядины после нагревания в течение 2,5 мин подвергается желатинизации примерно на 10%, то коллаген рыбы при тех же условиях нагревания разрушается на 50-60% (75%) [2].

В последнее время роль коллагена в питании пересмотрена. На основании доказанных эффектов рыбный коллаген и его фракции (особенно в случае незначительного теплового воздействия) являются источниками не только легкоусвояемого соединительнотканного белка, способного участвовать в регуляции липидного обмена и поддержании жизнедеятельности внутренних органов. В продуктах питания он может быть использован в качестве пищевого волокна, влагосвязывающей, желеобразующей и эмульгирующей добавок, а также частично заменять мясо. Известно, что при оптимальном сочетании мышечных белков и коллагенов показатель чистого усвоения белка максимален [2].

Коллаген – самый распространенный белок в организме, составляющий 30% массы всех белков. В растущем и активно двигающемся организме потребность в предшественниках белка на 30 % обусловлена коллагеном. Было обнаружено, что наибольшей аттрактантной активностью обладают такие аминокислоты (в отдельности и в различных сочетаниях), как глицин, пролин, аланин и др. При добавлении в корм этих аминокислот у японских угрей, например, потребление пищи возросло втрое. Приведённые факты свидетельствуют о важной роли рассматриваемых аминокислот в процессе роста [3, 4].

Коллагеновые композиции натуральных аминокислот сегодня незаменимы в спортивном питании, где они используются для направленного воздействия на ключевые реакции обмена веществ в организме, чтобы вызвать значительное улучшение физической работоспособности человека [1]. Пептидные композиции, полученные гидролизом коллагена, – это эффективный строительный материал организма спортсмена, необходимый для роста и поддержания структурной целостности активно функционирующих органов и тканей [2]. Доказано анаболизующее действие активных пептидов и отдельных аминокислот по стимуляции выделения гормонов, ответственных за увеличение массы работающих мышц и повышение силовых возможностей спортсмена [1]. В спортивной практике наиболее значимыми аминокислотами являются аргинин, орнитин, лейцин, изолейцин, валин, лизин, глутамин, глицин, гистидин, аланин, таурин, присутствующие в коллагене чешуи рыб [1].

Таблица 1. Аминокислотный (АК) состав белков чешуи леща и сардинеллы

Название аминокислоты	Содержание аминокислоты в сухой чешуе			
	Лещ		Сардинеллы	
	г/100 г белка	г/100 г че- шуи	г/100 г белка	г/100 г че- шуи
Аланин	9,96	6,84	11,2	5,6
Аргинин	4,33	2,98	7,9	4,0
Аспарагин	1,30	0,89	0,1	0,1
Аспарагиновая кислота	7,79	5,36	4,9	2,5
Карнозин			0,1	0,01
Цистин	0,87	0,6	0,0	0,0
Глютамин	1,30	0,89	0,8	0,4
Глютаминовая кислота	6,93	4,76	8,5	4,3
Глицин	29,44	20,23	26,0	13,1
Гистидин	2,16	1,49	1,2	0,6
Гидроксипролин	4,33	2,98	10,7	4,4
Лейцин (н)	1,73	1,19	2,7	1,3
Изолейцин (н)	0,00	0,00	1,0	0,5
Лизин (н)	2,16	1,49	4,0	2,0
Метионин (н)	1,73	1,19	0,0	0,0
Фенилаланин (н)	2,60	1,79	2,2	1,1
Фосфоэтаноламин	0,43	0,3	0,0	0,0
Пролин	6,93	4,76	11,7	5,9
Серин	9,09	6,25	2,9	1,5
Таурин	2,16	1,49	0,0	0,0
Треонин (н)	2,60	1,79	2,1	1,1
Тирозин	1,73	1,19	0,6	0,3
Валин (н)	0,43	0,3	1,5	0,8
Сумма незаме- мых АК	11,25	7,75	13,5	6,8

Исследования проводились на кафедрах пищевой биотехнологии и химии КГТУ, в научно-исследовательских лабораториях Адлерсхофа (ANiMOX) и Атландсберга (UBF) (Берлин, Германия). Чешую сардинеллы доставляли с рыбоконсервного комплекса ОАО «РосКон» (г. Пионерский, Калининградская обл.). Чешую леща и судака использовали с ОАО «Рыболовецкий колхоз «За Родину» (п. Взморье, Калининградская обл.). Гидролиз чешуи осуществляли ферментативным путем с применением фермента коллагеназы (ОАО «Биопрогресс», п. Биокомбинат, г. Щелково), а также кислой и нейтральной протеаз микробного происхождения.

Исследования аминокислотного состава чешуи представлены в таблице 1.

Из данных табл. 1 видно, что чешуя рыб является источником почти всех незаменимых (кроме триптофана) и ценных заменимых аминокислот.

Биологическую ценность белков чешуи определяли по нескольким показателям. Сбалансированность аминокислотного состава относительно «идеального» белка оценивали по аминокислотному скору (АКС,%); избыточное количество незаменимых аминокислот – по коэффициенту различия аминокислотных скоров (КРАС,%), а через него определяли биологическую ценность (БЦ, %). Рациональности аминокислотного состава считали по коэффициенту R_c (в долях единицы) и показателю сопоставимой избыточности σ (мг/г белка). Значения данных характеристик приведены в таблице 2.

Значения коэффициентов свидетельствуют о достаточно высокой биологической ценности белков чешуи леща (55,5) и сардинеллы (62,8%), однако аминокислотные скоры у многих незаменимых аминокислот были не достаточными для полноценного белкового питания (10,2 – 95,3%), что отражено в значениях коэффициентов КРАС (44,5-37,2) и рациональности аминокислотного состава (0,2-0,4). Полученные данные свидетельствуют о целесообразности введения в состав пищевой композиции, предназначенной для спортивного питания, дополнительного источника незаменимых аминокислот, что повысит сбалансированность данной БАД по скору. В качестве этого источника использовали цветочную пыльцу, богатую многими ценными БАВми, в том числе и незаменимыми аминокислотами,

натуральными мужскими гормонами, витаминами, минеральными и др. БАВми.

Таблица 2 – Биологическая ценность белков чешуи исследуемых видов рыб

Название АК	Содержание АК в эталонном белке (ФАО ВОЗ), г/100 г белка	Чешуя леща		Чешуя сардинеллы	
		Содержание АК, г/100г белка	Аминокислотный скор, АКС, %	Содержание АК, г/100г белка	Аминокислотный скор, АКС, %
Лейцин (н)	4,8	1,73	36,04	2,7	56,25
Лизин (н)	4,2	2,16	51,43	4,0	95,24
Изолейцин (н)	4,2	0	0	1,0	23,80
Метионин (н)	2,9	1,73	41,19	0	0
Фенилаланин (н)	2,8	2,60	92,86	2,2	78,57
Треонин (н)	2,8	2,60	92,86	2,1	78,57
Триптофан (н)	1,4	0	0	0	0
Валин (н)	4,2	0,43	10,24	1,5	33,33
Сумма:	27,3	11,25		13,25	
Коэффициент различия аминокислотных скоров КРАС, %		44,53		37,16	
Биологическая ценность, БЦ, %		55,47		62,84	
Коэффициент рациональности аминокислотного состава, R _c		0,2		0,41	

При проведении гидролиза чешуи ферментативным путем дозировки ферментов составляли 2% к массе измельченной чешуи при гидромодуле 11,5. Результаты анализа содержания аминного азота в

водорастворимой части гидролизата показали, что наибольшей активностью по отношению к белкам чешуи обладает коллагеназа, а рациональной продолжительностью гидролиза является 48 ч, в течение которого содержания аминного азота достигает 81,2 мг/100 г.

Исследования минерального состава чешуи показали, что он зависит от вида рыбы. Так, чешуя леща является прекрасным источником (в г/кг) фосфора (79), кальция (16,6), серы (3,15), магния (2,68) и натрия (2,08). Среди минеральных веществ чешуи судака существенно преобладающим (в г/кг) является кальций (206) и фосфор (84,7), в меньших количествах содержатся сера (2,32) и магний (3,10).

Исследования жирнокислотного состава чешуи сардинеллы показали, что в составе жировой фракции доля насыщенных кислот абсолютно максимальна (66,4%), причем почти половину (34,9%) составляет пальмитиновая кислота. Доля мононенасыщенных жирных кислот составляет 22,9%, причем эту фракцию составили жирные кислоты класса омега 9 и омега 7 (18:1 -элаидиновая - 13,4% и 16:1- пальмитолеиновая – 9,5%). Сумма полиненасыщенных жирных кислот составляет 10,7% массы всех ЖК, при этом на долю полиненасыщенных жирных кислот класса омега 3 приходится 6,38% (в том числе на 18:3 –линолевая 3,6%, 20:5 –эйкозапентаеновая - 1,0%, 22:6 -докозапентаеновая ЖК – 1,7%). Известно, что ЖК омега 3 имеют незаменимое физиологическое значение для всех живых существ, не синтезируются в организме, участвуют в поддержании гомеостаза воспалительных реакций, нормализации сердечно-сосудистой и опорно-двигательных функций, мозговой деятельности, синтезе промбксанов, простагландинов и лейкотриенов — высоко активных иммуно-воспалительных регуляторов [2].

Введение в состав гидролизатов чешуи пчелиной пыльцы и желатина (для структурообразования) позволило получить желатиновые БАДы для спортивного питания штучной массы 20-25 г каждая. Общий химический состав композиции составлял: 2,8% воды, 97,2% сухих веществ, в том числе 62,9-78,5% протеина; 23,4-27,7% углеводов; 0,57-1,04% жира; 1,71-1,75% минеральных веществ. С учетом содержания функциональных веществ (глицина, оксипролина, кальция, фосфора, эссенциальных углеводов) рекомендовано

употреблять данные БАДы 2 раза в день по 50 г спортсменам скоростно-силовых видов спорта после тренировок.

На кафедре химии КГТУ были разработаны способы получения кормовой белково-минеральной муки с использованием термически обработанной фрикционным способом при измельчении и одновременно высушенной чешуи судака. В состав исходного сырья входит (% массы): 40-60 (белка); 1,5-8,4 (липидов); 35-58 (минеральных веществ).

Комплексная рыбоводная и физиолого-биохимическая оценка компонента чешуи, как нетрадиционного кормового средства, в комбикормах при выращивании форели НВХ «Прибрежное» в течение 70 дней показала, что наибольший абсолютный прирост массы был отмечен у молоди форели, выращиваемой на комбикорме с 20% массы чешуи. Биохимические анализы тканей форели показали низкий уровень фагоцитарных клеток в крови рыб, что свидетельствует об отсутствии воспалительных процессов, нормальном функционировании иммунной системы и о здоровье рыбы в целом, выращиваемой на кормах с 15-20% коллагенсодержащего компонента. Расчеты свидетельствуют, что компонент корма из чешуи рыб позволяет без ущерба для здоровья рыб заменить 30-45% рыбной муки в составе комбикормов для молоди форели.

Таким образом, можно констатировать, что рыбная чешуя обладает высоким белково-минеральным биопотенциалом, является источником ценных жирных кислот класса омега 3, что позволяет рекомендовать ее использовать в спортивном питании и в качестве компонента комбикорма для выращивания рыб.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Волков, Н.И. Эргогенные эффекты спортивного питания. / Н.И.Волков, В.И.Олейников - М.: Издательство «Советский спорт», 2012. - 99 с.
2. Bioactive Marine Peptides: edited by S.K. Kim / Academic Publishers Tokio University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan, 2012.-132 p
3. Пат. 2262861 С2 МПК7 А23К 1/10. Способ получения кормовой белково-минеральной муки / В.И. Воробьев, Н.Т. Сергеева (Россия). - № 2001108484.

4. Спецвыпуск. Обзор рынка аквакультуры России и мира, интернет / novovremya.ru media/2014/19aug2014/obzor_rynka

УДК 664.622:633.11:664.642

**ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ
ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ ПОВЫШЕННОЙ ПИЩЕВОЙ
ЦЕННОСТИ**

Е.И. Пономарева, Н.Н. Алехина, И.А. Бакаева, А.А. Напрасникова

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»,
394036, Россия, г. Воронеж, пр. Революции, д. 19,
irina_losevo@mail.ru

При производстве зернового хлеба большое значение имеет подготовка зерна, одним из этапов которой является его набухание. Продолжительность увлажнения зерна колеблется от 18 до 24 ч, что может негативно сказаться на его микробиологические показатели. В связи с этим актуальными являются исследования в области повышения микробиологической чистоты зернового хлеба и улучшения качества готовой продукции.

Библиограф. 4 назв.

Ключевые слова: хлеб, биоактивированное зерно пшеницы, микробиологическая чистота, закваска

Зерновой хлеб является продуктом повышенной пищевой и биологической ценности благодаря сохранению питательных и биологически активных веществ в целом зерне. Однако, в связи с тем, что основной стадией подготовки зерна является его набухание, где создаются благоприятные условия для развития и размножения эпифитной микрофлоры, необходим более тщательный микробиологический контроль изделий [1].

Так как производство продуктов питания высокого качества является главной задачей пищевой промышленности, актуальными являются исследования экологически безопасных способов преду-

преждевения микробиологической порчи хлебобулочных изделий, продлевающих срок их хранения.

На кафедре «Технологии хлебопекарного, кондитерского, макаронного и зерноперерабатывающего производств» Воронежского государственного университета инженерных технологий ранее разработаны зерновые хлебобулочные изделия «Лучик», «Экохмель» и «Элит» на основе закваски из биоактивированного зерна пшеницы [2].

Целью проводимых исследований явилось изучение микробиологических показателей в разработанных изделиях.

При подготовке зерна пшеницу очищали от сорной и зерновой примеси, промывали и выдерживали 24 ч при $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в воде из разводной сети. При приготовлении закваски зерно подвергали только набуханию в воде, а при получении теста его дополнительно проращивали в течение 10-12 ч. Для приготовления густой закваски к измельченной зерновой массе добавляли воду и замешивали полуфабрикаты влажностью 50 %, которые выдерживали в течени 24 ч при температуре $40 ^\circ\text{C}$. Закваску готовили двумя способами: 1 - для хлеба «Экохмель» и «Элит» на стадии замешивания в нее добавляли композицию хмелевую (КХ), в количестве 0,05 г на 100 г сухого нешелушенного зерна; 2 - для хлеба «Лучик» (контроль) ее готовили без КХ, но на стадии замачивания зерно предварительно выдерживали 10 ч в электроактивированном водном растворе (рН 2,5). На полученных полуфабрикатах замешивали тесто влажностью 48 %. В рецептуру для хлеба «Элит» дополнительно вносили 6 % муки из жмыха зародышей пшеницы.

Таблица 1. Общая обсемененность хлеба из биоактивированного зерна пшеницы

Микробиологические показатели	Значение показателей в хлебе		
	«Лучик»	«Экохмель»	«Элит»
КМАФАнМ, КОЕ/г	$1,0 \cdot 10^2$	$0,5 \cdot 10^2$	$0,3 \cdot 10^2$
Плесени, КОЕ/г	менее 10	менее 10	менее 10
Дрожжи, КОЕ/г	менее 10	менее 10	менее 10

Установлено, что в хлебе «Элит» общая обсемененность была ниже на 50,0 % по сравнению с хлебом «Лучик», в хлебе «Экохмель» – на 30,0 % (табл. 1).

При исследовании изделий на наличие плесени в образцах были установлены незначительные различия. В зимний период времени она появлялась на шестые сутки хранения, в хлебе «Лучик» через 144 ч, в хлебе «Экохмель» и «Элит» – через 130 ч, в летний период у всех образцов на пятые сутки – через 100-105 ч.

При исследованиях на наличие в изделиях картофельной болезни в процессе их хранения ни в одном образце она не была найдена.

Установлено, что хлеб «Экохмель» и «Элит» обладали лучшими микробиологическими показателями по сравнению с хлебом «Лучик». Это связано с тем, что на стадии приготовления закваски дополнительно использовалась композиция хмелевая, обладающая антимикробными свойствами.

Большая чистота хлеба «Элит» по сравнению с другими изделиями объясняется тем, что часть биоактивированного зерна пшеницы, идущего на приготовление теста, заменяется мукой из жмыха пшеничных зародышей, обладающей меньшей микробиологической обсемененностью, чем набухшее зерно.

Доказано, что внесение густой закваски из биоактивированного зерна пшеницы позволяет повысить микробиологическую чистоту изделий. Она содержит молочную и уксусную кислоты, которые обладают бактериостатическим (приостанавливают рост бактерий) и фунгицидным (воздействие на грибы) эффектами. В результате чего погибает вегетативная форма бактерий. При внесении заквасок также возможно образование антибиотиков, органических кислот и других протекторов, которые препятствуют плесневению хлеба [3, 4].

Проведенные исследования по микробиологическим показателям хлеба показывают, что хлеб «Элит» повышенной пищевой ценности в меньшей степени обсеменен посторонней микрофлорой. Повышение его микробиологической чистоты происходило за счет снижения зерновой массы, идущей на приготовление теста, а также антибактериального действия хмелевых экстрактов, содержащихся в закваске из биоактивированного зерна пшеницы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Жаркова, И. М. Безопасность продовольственного сырья и продуктов питания [Текст] / И. М. Жаркова, Т. Н. Малютина // Современные проблемы науки и образования. – 2009. - № 1. – С. 28-29.
2. Исследование состава органических кислот в закваске из биоактивированного зерна пшеницы [Текст] / Н. Н.. Алехина, Е. И. Пономарева, И. А. Бакаева и [др.] // Хлебопродукты. - 2015.– № 1. – С. 62-63.
3. Афанасьева, О. В. Микробиология хлебопекарного производства [Текст] / О. В. Афанасьева. – СПб. : Береста, 2003. – 224 с.
4. Как продлить жизнь хлебу? [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.lesaffre.ru> . - Заглавие с экрана.

УДК 664

ВЛИЯНИЕ 2-ГИДРОКСИЭТИЛАММОНИЕВЫХ ИОННЫХ ЖИДКОСТЕЙ НА ПРИРОСТ БИОМАССЫ СПИРТОВЫХ ДРОЖЖЕЙ

Потапова В.В.¹, Привалова Е.А.¹, Адамович С.Н.²

¹Институт пищевой инженерии и биотехнологии ИРНТУ,
г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83
epriv@istu.edu

²Институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск

Культивирование микроорганизмов в биотехнологических процессах осуществляется на питательных средах, в состав которых, как правило, входят биологически активные вещества, стимулирующие рост клеток. В качестве стимуляторов используются как отдельные вещества, так и комплексные препараты, перечень которых на сегодняшний день весьма обширен. К стимуляторам относят аминокислоты, витамины, биотин, фолиевую кислоту, инозит, микроэлементы, поверхностно-активные вещества и др. Использование стимуляторов приводит к повышению эффективности использования питательных веществ субстрата, увеличению биомассы и улучшению физиологического состояния микроорганизмов, что в свою очередь положительно влияет на биотехнологический процесс и выход метаболитов.

С целью стимулирования роста спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* расы XII в данной работе были использованы синтезированные в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского на основе биогенных 2-гидроксиэтиламинов и биологически активных арилхалькогенилуксусных кислот 2-гидроксиэтиламмониевые ионные жидкости (ИЖ) формулы $[N(CH_2CH_2OH)_3H]^+ \cdot O(O)CCH_2YAr$, где Ar = арил; Y = O, S, SO₂. Соединения этой группы обладают низкой токсичностью для человека и животных и хорошо выраженной рост-стимулирующей активностью [1].

Характеристика ионных жидкостей приведена в таблице.

Обозначение	Брутто формула ИЖ	Молекулярная масса	Температура плавления, °С
ИЖ1	C ₁₄ H ₂₂ CINO ₅ S	351,88	77-78
ИЖ2	C ₁₄ H ₂₂ CINO ₇ S	383,88	92-94
ИЖ3	2-C ₁₄ H ₂₂ CINO ₆	335,78	80
ИЖ4	4-C ₁₄ H ₂₂ CINO ₆	335,78	80-82

Ранее проведенные исследования показали, что эти ИЖ в низких концентрациях стимулируют процессы дрожжегенерирования и ферментации глюкозных субстратов [2-4].

Культивирование спиртовых дрожжей проводили на синтетической среде Ридера состава (г/л): сахароза – 20; (NH₄)₂SO₂ – 3; MgSO₄ – 0,7; NaCl – 0,5; KH₂PO₄ – 1; K₂HPO₄ – 0,1. Ионные жидкости вводили в состав питательной среды в соответствии с определенными в работе [4] концентрациями, оказывающими наиболее ярко выраженный стимулирующий эффект. Контрольные опыты проводили с добавлением в питательную среду дистиллированной воды вместо раствора ионной жидкости.

Посевной материал выращивали из музейной культуры на скошенном сусло-агаре с дальнейшим смывом выращенной культуры синтетической средой Ридера. Содержание дрожжевых клеток в посевном материале составляло $7,7 \cdot 10^6$ кл/мл; норма задачи посевного материала составляла 1 мл на 20 мл питательной среды. Культивирование проводили при температуре 30°C в течение 36 ч. Определение биомассы дрожжей проводили весовым методом [5], содержание белка в биомассе определяли колориметрически с амидо-черным [6].

Суммарное накопление биомассы дрожжей через 36 ч в зависимости от вида и концентрации ионной жидкости представлено на рис. 1.

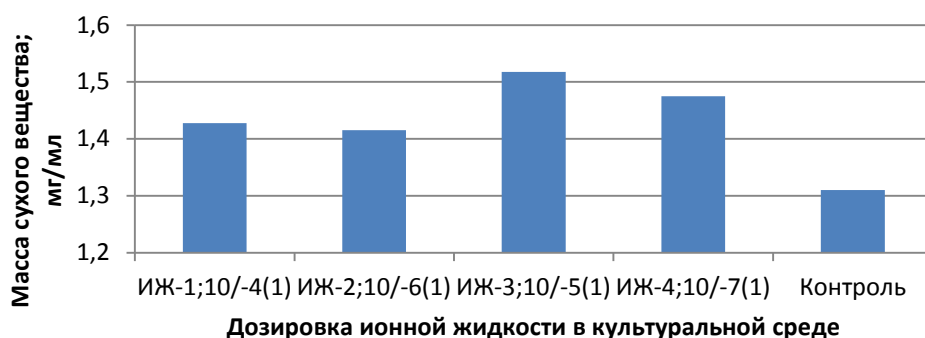


Рис. 1. Накопление биомассы дрожжей

Как видно из представленной диаграммы, все исследованные соединения оказывают стимулирующее воздействие на прирост биомассы дрожжей. Увеличение биомассы по сравнению с контролем составило 8-16%, причем наибольший прирост наблюдался в случае введения в питательную среду ИЖ3 в концентрации 1×10^{-5} % масс.

В биомассе дрожжей было определено содержание белка, представленное на рис. 2.

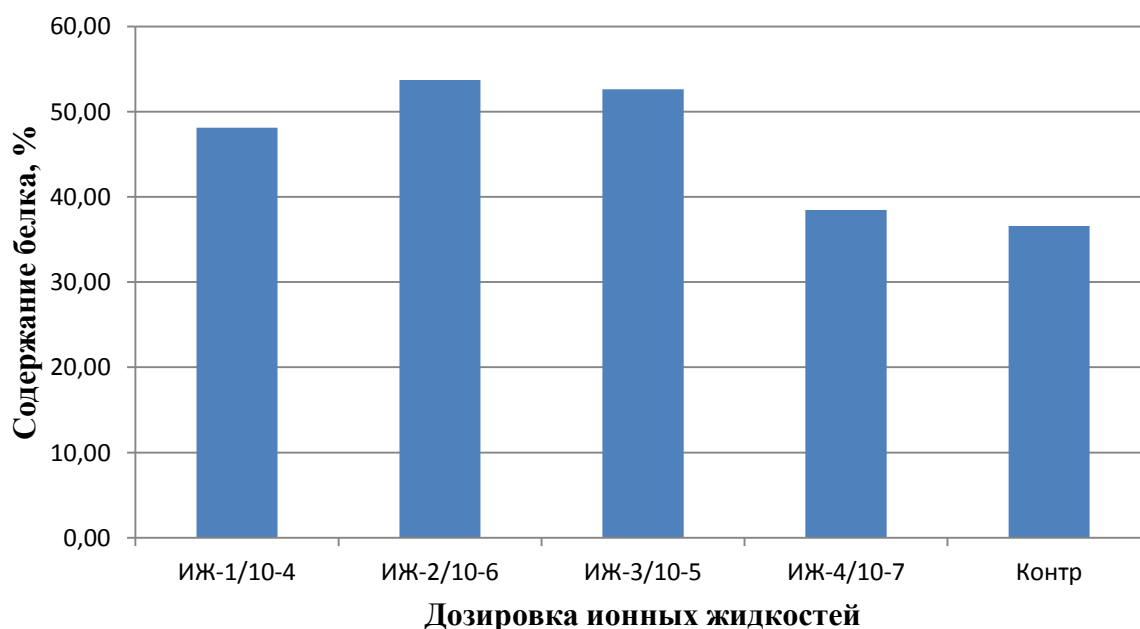


Рис. 2. Содержание белка в биомассе дрожжей

Можно отметить увеличение содержания белка в биомассе на 2-15% при культивировании дрожжей в присутствии ионных жидкостей по сравнению с контролем. Стимулирующее действие на накопление белка также оказывают все исследованные соединения, но отмеченный эффект наиболее выражен в присутствии ИЖ2 в концентрации 1×10^{-6} % масс и ИЖ3 в концентрации 1×10^{-5} % масс.

Таким образом, можно отметить положительное влияние 2-гидроксиэтиламмониевых жидкостей на прирост биомассы и физиологическое состояние спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* расы XII. Увеличение биомассы в процессе культивирования засеваемых дрожжей позволяет сократить затраты сбраживаемых сахаров на дрожжегенерирование, вследствие чего повышается выход спирта с единицы переработанного сырья. Повышение содержания белка увеличивает пищевую ценность дрожжей.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Мирскова А.Н. Алканоламмониевые соли органилсульфанил-(сульфонил)уксусных кислот – новые стимуляторы биологических процессов // Журнал органической химии, 2008. – Т.44. – Вып.10. – С. 1501-1508

2. Лобанова А.Ю., Потапова В.Н., Молокова К.Н., Привалова Е.А., Адамович С.Н. Ферментация модельных субстратов в присутствии биологических стимуляторов. Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы развития технологии переработки углеводородных, растительных и минеральных ресурсов. – Иркутск, 2014. – С. 216-218.

3. Молокова К.В., Привалова Е.А., Адамович С.Н., Мирскова А.Н., Мирсков Р.Г. Влияние протонных ионных жидкостей на бродильную активность спиртовых дрожжей // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, 2014. – № 1(6). – С. 70-74.

4. Лобанова А.Ю., Потапова В.Н., Привалова Е.А., Адамович С.Н. Влияние 2-гидроксиэтиламмониевых ионных жидкостей на процесс дрожжегенерирования. Материалы I Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы химии и биотехнологии». – Иркутск, 2015. – С.48-55.

5. Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств. Практическое руководство. СПб.: Лань, 2012. – 224 с.

6. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного // Физиология растений, 1982. – Т. 29. – Вып. 1. – С. 198-204.

УДК 664.665

РАЗРАБОТКА РЕЦЕПТУРЫ БЕЗДРОЖЖЕВОГО ХЛЕБА НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИКА А

К.П. Седых, О.В. Куприна

Институт пищевой инженерии и биотехнологии ИРНИТУ
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83, v35@istu.edu

Технология производства бездрожжевого хлеба - динамично развивающееся направление современного хлебопекарного производства. Бездрожжевой хлеб предпочтителен для диетического питания людей, страдающих в первую очередь заболеваниями желудочно-кишечного тракта. В то время как систематическое употребление хлеба, приготовленного по традиционной технологии с использованием в качестве разрыхлителя дрожжей, негативно влияет на иммунную систему [1].

Совершенствование технологий производства бездрожжевого хлеба актуально в наши дни. С этой целью разрабатываются способы производства бездрожжевого хлеба, основанные на повышении качества хлеба, пищевой ценности и замедлении процесса черствения, увеличении выхода готовых изделий, интенсификации процесса приготовления теста, повышении лечебно-профилактических свойств.

Известны патенты [1-7] на производство бездрожжевого хлеба на основе хмелевой закваски, биоактивированного зерна, пророщенного зерна пшеницы. Данные способы имеют определенные достоинства и недостатки, оказывающие влияние на технологический процесс производства.

Цель научно-исследовательской работы – изучить влияния пробиотика А (кефира индийских йогов или сухой обезжиренной

простокваши) на технологию производства бездрожжевого хлеба и клейковинный каркас теста из пшеничной муки высшего сорта.

В качестве объекта исследования использовали бездрожжевое тесто на основе пробиотика А, рецептура которого представлена в таблице 1.

Таблица 1. Унифицированная рецептура бездрожжевого теста

Наименование сырья	Содержание сухих веществ, %	Расход сырья	
		в натуре, г	в сухих веществах, %
Мука пшеничная высшего сорта	85,5	300	256
Пробиотик А	11	200	22
Итого	-	500	278

Для активации пробиотика А, изготовленного по ГОСТу 10382-85 (изготовитель - ИП Тюменцев, Иркутск), смешивали пробиотик А с молоком в количестве 1,2 г пробиотика А на 200 мл молока. Полученный полуфабрикат выстаивали в течение 24 часов при температуре 20-22°C.

Приготовление бездрожжевого теста проводили путем внесения к пробиотику А Алтайской пшеничной муки высшего сорта и расчетное количество воды до влажности теста 43,5% и перемешивания до однородной массы. Далее в течении 48 часов исследовали бездрожжевое теста путем отмывания клейковины из теста с интервалом 1 час и проведением пробных выпечек хлеба. Кроме того, на основе активированного пробиотика А вырабатывали жидкую закваску (влажность 60%) без или с добавлением меда. Жидкую закваску на основе пробиотика А вносили в количестве от 30 до 90% к массе муки в тесте, также заменяли полностью расчетное количество воды на витаминный концентрат, а часть пшеничной муки в/с в составе теста заменяли на ржаную муку цельносмолотую.

Результаты исследования представлены в таблице 2.

На основе анализа полученных данных, представленных в таблице 3, можно сделать следующие выводы:

- пробиотик А оказывает сильное протеолитическое влияние на клейковинный каркас пшеничной муки высшего сорта;
- в процессе брожения количество отмываемой клейковины уменьшается, а качество изменяется от 1 группы до неудовлетворительно крепкой короткорвущейся 3 группы;
- образцы бездрожжевого хлеба на основе активированного пробиотика А имеют неразвитую пористость, подрывы и трещины боковых корок, непропеченный мякиш, плоскую верхнюю корку.

Таблица 2. Показатели качества отмывтой клейковины и бездрожжевого хлеба на основе пробиотика А

Время брожения теста, ч	Количество отмываемой клейковины, %	Качество отмываемой клейковины		Время брожения теста, ч	Органолептические показатели бездрожжевого хлеба	Физико-химические показатели бездрожжевого хлеба		
		ИДК ед.	группа			Влажность, %	Пористость, %	Объем, см ³
0	16,48	26	3	-	-	-	-	-
1	17,3	23,6	3	-	-	-	-	-
2	16,8	12,8	3	-	-	-	-	-
3	9,8	53,5	2	-	-	-	-	-
4	13,8	30	3	-	-	-	-	-
-	-	-	-	48	плоская верхняя корка; цвет: темно-коричневый; мякиш: непропеченный; вкус и запах: без постороннего привкуса и запаха	29	30,6	340
с добавлением жидкой закваски на основе пробиотика А к массе муки в тесто в количестве (с добавлением меда 5% к массе муки в закваску на основе пробиотика А): 50%								
-	-	-	-	72	соответствие цвета, неразвитая пористость, не	31,5	48	720

70%								
-	-	-	-	72	соответствие цвета, неразвита пористость,	31,4	42	700
90%								
-	-	-	-	72	непропеченный мякиш, неразвита пористость	27	44,2	680
с добавлением жидкой закваски на основе пробиотика А к массе муки в тесто в количестве (с добавлением меда 10% к массе муки в закваску на основе пробиотика А):								
30%								
-	-	-	-	72	куполообразная верхняя корка, минимальные подрывы боковых, развитая пористость, соответствие вкуса и запаха	24	55	680
40%								
-	-	-	-	72	куполообразная верхняя корка, минимальные подрывы боковых, развитая пористость, соответствие вкуса и запаха	29	53	700
50%								
-	-	-	-	72	состояние мякиша неудовлетворительное, соответствие вкуса и запаха	24,4	46	660
с добавлением жидкой закваски на основе пробиотика А к массе муки в тесто в количестве (с добавлением меда 10% к массе муки в закваску на основе пробиотика А) 30% :								
с добавлением ржаной муки в тесто в количестве 15% к массе пшеничной								
-	-	-	-	72	приятный внеш-	29,5	54	700

					ний вид, мелкие подрывы боковых корок, развитая			
					пористость, кислый вкус			
с заменой воды на витаминный концентрат								
-	-	-	-	72	приятный внешний вид, мелкие подрывы боковых корок, кислый вкус, развитая пористость	30,4	56	660

Примечание: исходное количество и качество клейковины для Алтайской пшеничной муки высшего сорта составляет 26,96% и 66,1 ед. ИДК (1 группа) соответственно.

- образцы с добавлением жидкой закваски на основе пробиотика А и меда в количестве 5% к массе муки в закваске имеют неудовлетворительные органолептические показатели, кислый вкус;

- образцы с добавлением жидкой закваски на основе пробиотика А и меда в количестве 10% к массе муки в закваске имеют наилучшие показатели качества (развитую пористость, соответствующие данному виду хлеба органолептические показатели);

- образцы с добавлением цельнозерновой ржаной муки в состав бездрожжевого теста на жидкой закваске на основе активированного пробиотика А имеют приятный внешний вид, развитую пористость, мелкие незначительный подрывы боковых корок, но более выраженный кислый вкус;

- образцы с полной заменой расчетного количества воды на витаминный концентрат имеют приятный внешний вид, развитую пористость, мелкие незначительный подрывы боковых корок, более развитую пористость по сравнению с предыдущими образцами, вкус также более выраженный кислый;

В дальнейшем планируется провести пробные выпечки бездрожжевого хлеба на жидкой закваски на основе пробиотика А в количестве 30% (с добавлением 10% меда к массе муки в закваску) к массе муки в тесте, заменив полностью расчетное количество воды

на витаминный концентрат и часть пшеничной муки в тесте на цельнозерновую ржаную муку.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Пат. 2411730 Российская Федерация, МПК⁷ Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00. Способ производства бездрожжевого зернового хлеба [текст] / Магомедов Г.О., Пономарева Е.И., Алехина Н.Н., Пономарева О.И., Рыжкова Е.А.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО Воронеж. гос. технологич. академия.- № 2009139589/13 ; заявл. 26.10.2009 ; опубл. 20.02.2011, Бюл. № 5

2. Пат. 2164748 Российская Федерация, МПК⁷ Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00. Способ приготовления хмелевой закваски, хмелевая закваска и способ приготовления хлебобулочного изделия на хмелевой закваске [текст] / Ямина Н.В.; заявитель и патентообладатель ООО «НАВЛАНИ». - № 99111463/13 ; заявл. 26.05.99 ; опубл. 10.04.01

3. Пат. 2101959 Российская Федерация, МПК⁷ Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00. Способ производства бездрожжевого хлеба из пророщенного зерна пшеницы [текст] / Хоперская О.А., Богданов М.Е., Огудин В.Л., Блинова Н.А.; заявители: Хоперская Ольга Анатольевна, Богданов Михаил Ердэниевич, Огудин Валентин Леонидович, Блинова Наталья Алексеевна ; патентообладатели: Хоперская О.А., Богданов М.Е., Огудин В.Л., Блинова Н.А. - № 95112158/13 ; заявл. 14.07.95 ; опубл. 20.01.98

4. Пат. 2148916 Российская Федерация, МПК⁷ Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00. Композиция ингредиентов для производства зернового бездрожжевого хлеба [текст] / Санникова М.А. ; заявитель и патентообладатель Санникова Мария Алексеевна.- № 98122602/13 ; заявл. 15.12.98 ; опубл. 20.05.00

5. Пат. 2314698 Российская Федерация, МПК⁷ Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00. Способ получения жидкой ржаной закваски [текст] / Магомедов Г. О., Дерканосова Н. М., Белокурова Е. В., Белокурова Л. В. ; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО Воронеж. гос. технологич. академия. - № 2006110826/13

6. Пат. 2316966 Российская Федерация, МПК⁷ Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00. Способ приготовления хмелевой закваски и хмелевая за-

кваска [текст] / Жумадильдаева Г. С., Жумадильдаева И. С. ; заявитель и патентообладатель Религиозная организация «Свято-Николо-Шартомский монастырь» Русской Православной Церкви. - № 2006116718/13 ; заявл. 15.05.2006 ; опубл. 2008

7. Пат. 2363159 Российская Федерация, МПК⁷ Н 04 В 1/38, Н 04 J 13/00. Способ приготовления хмелевой закваски для производства хлеба [текст] / Шипицина М.И.; заявитель и патентообладатель ООО научно-производств. центр «Русский рецепт»; опубл. 10.08.09

**III. БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ
БИОРАЗНООБРАЗИЯ.
ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ, БИОКОНВЕРСИЯ И
БИОЭНЕРГЕТИКА**

УДК 633.81:57.085.2

**РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ НЕКОТОРЫХ СОРТОВ
РОЗЫ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ И АНАЛИЗ
МОРФО-АНАТОМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РЕГЕНЕРАНТОВ**

И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, В.А. Браилко,
Н.П. Лесникова-Седошенко

Государственное бюджетное учреждение Республики Крым «Никитский ботанический сад – Национальный научный центр»
298648, Россия, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, Никитский спуск, 52, (83654) 33-55-30, irimitrofanova@yandex.ru

*Изучены морфогенетические потенции меристематических тканей розы эфиромасличной сортов Фестивальная, Радуга и Лань в условиях *in vitro*. Представлен протокол клонального микроразмножения исследуемых сортов, состоящий из отдельных последовательных этапов. Наряду с этим изучено морфо-анатомическое строение листа регенерантов розы эфиромасличной. Выявлен сорт Фестивальная с высокой адаптационной способностью к водному стрессу и высоким регенерационным потенциалом.*

Библиогр. 7 назв.

*Ключевые слова: роза эфиромасличная, меристема, микроразмножение *in vitro*, морфо-анатомическая характеристика листа, адаптационный потенциал*

Роза с давних времен является наиболее ценной эфиромасличной культурой и используется в парфюмерно-косметической, пищевой промышленности и медицине. Традиционное вегетативное размножение роз обычно проводится

черенкованием, прививкой или окулировкой, которое, как известно, является сложным длительным процессом, и не всегда эффективно [7]. В связи с этим культура органов и тканей становится все более популярной как альтернатива вегетативному размножению, позволяя за короткий период получить и размножить большое количество высококачественного здорового посадочного материала розы [4]. Вместе с тем, важной проблемой является процесс адаптации растений к новым условиям культивирования. Для изучения адаптивных возможностей полученных *in vitro* регенерантов необходимо учитывать их способность регулировать водный режим.

Целью данной работы было исследование особенностей регенерации растений на разных этапах клонального микроразмножения и изучение некоторых морфо-анатомических и физиологических параметров в условиях *in vitro* у регенерантов трех сортов розы эфиромасличной.

Объектом исследований были перспективные сорта розы эфиромасличной: Фестивальная – селекции ГБУ РК «НБС-ННЦ», Лань и Радуга – селекции ГБУ РК «Институт сельского хозяйства Крыма» из селекционно-коллекционного участка Никитского ботанического сада. Исходный растительный материал (побеги с вегетативными почками) был отобран с пятилетних растений изучаемых сортов. В работе применяли общепринятые и разработанные нами методы культуры органов и тканей [1, 2, 4]. Были использованы 3 типа ступенчатой стерилизации эксплантов (сегментов побега с вегетативной почкой). Работы по выделению и введению меристематических тканей на питательные среды проводили в условиях ламинарного бокса. Меристемы размером 0,2-0,4 мм выделяли из вегетативных почек под бинокулярным микроскопом Discovery 12. В исследованиях использовали модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга (MS) [6], содержащую макро- и микроэлементы и витамины по прописи MS, дополненную регуляторами роста (6-БАП, ИМК, НУК, ГК₃) в разных сочетаниях и концентрациях. pH среды доводили до 5,6 до автоклавирования 0,1 н. раствором NaOH. Для гарантированного получения безвирусных регенерантов в состав питательной среды вводили вироцид рибавирин (виразол, 1-бета-D-Рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-карбоксамид, «Sigma», США) в

концентрации 2-25 мг/л. Для оценки достоверности полученных результатов статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office.

В результате проведенных исследований нами установлено, что лучшим сроком отбора эксплантов розы эфиромасличной сортов Фестивальная, Лань и Радуга для введения в культуру *in vitro* был февраль-март. При этом частота развития эксплантов составила 93%, 96% и 100% у сортов Лань, Радуга и Фестивальная, соответственно. Экспериментально были определены оптимальные условия стерилизации эксплантов путем последовательного погружения их в растворы 70% этанола с экспозицией 1 мин, 1% Thimerosal – 7-10 мин с 3-кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде, 3% NaClO в течение 15-17 мин с последующей 4-кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Такой способ стерилизации позволил получить 76-98% свободных от контаминации и жизнеспособных первичных эксплантов в зависимости от генотипа растения-донора.

Меристематические ткани размером 0,2-0,4 мм выделяли из вегетативных почек и вводили на модифицированную питательную среду MS, дополненную 0,1-2,0 мг/л БАП, 0,05-0,5 мг/л НУК, 0,25-2,0 мг/л ГК₃, 0,05-0,2 мг/л рибофлавина, 1,0-5,0 мг/л тиамина, 1,0-4,0 мг/л глицина, 2-25 мг/л вирицида, 30,0 г/л сахарозы, 8 г/л агара. Культуральные сосуды с меристемами выставляли в камеру искусственного климата с температурой 24±1°C, интенсивностью освещения 2-2,5 клк и 16-часовым фотопериодом.

На контрольной среде без регуляторов роста было отмечено аномальное развитие меристем. При этом добавление в среду ГК₃ индуцировало развитие меристем и образование микропобегов. Культивирование изолированных меристем на модифицированных питательных средах, дополненных БАП в разных концентрациях, значительно увеличивало регенерацию микропобегов и стимулировало формирование листьев. Определена оптимальная концентрация БАП в питательной среде: для сортов Фестивальная и Радуга – 0,5 мг/л, для сорта Лань – 1,5 мг/л. На 21 сут культивирования на этих средах средняя длина микропобегов сортов Радуга и Фестивальная составила 0,67±0,04 см и 0,95±0,06 см, соответственно, а у сорта Лань – 0,66±0,03 см. В это же время у изучаемых сортов розы

эфиромасличной отмечали регенерацию одного микропобега с 1-4 сложными листьями. Эти микропобеги переносили на свежеприготовленные среды.

Основной задачей этапа собственно микроразмножения является получение множественного побегообразования, что часто лимитируется генотипом исходного растения, условиями культивирования эксплантов и другими факторами [2,4]. Для оптимизации процесса регенерации микропобеги, полученные на первом этапе культивирования, переносили на модифицированную питательную среду MS, дополненную 1,25-2,0 мг/л БАП, 0,05-0,2 мг/л НУК, 0,5-2,0 мг/л ГК₃, что спустя 2-3 недели стимулировало множественное побегообразование. При этом частота регенерации микропобегов зависела от концентрации БАП в питательной среде и числа субкультивирований. После 2-3 субкультивирований на этапе собственно микроразмножения количество микропобегов у сортов Фестивальная, Лань и Радуга в среднем составило $4 \pm 0,1$ шт. / эксплант. Высокий коэффициент размножения отмечали у сорта Фестивальная (1:5 – 1:6), у сортов Лань и Радуга коэффициент размножения составил 1:4. Максимальная длина микропобега ($1,28 \pm 0,13$ см) была получена у сорта Фестивальная при концентрации 1,5 мг/л БАП в питательной среде. У сорта Радуга максимальная длина микропобега составила $0,91 \pm 0,17$ см при концентрации 0,5 мг/л БАП, а у сорта Лань – $0,71 \pm 0,05$ см при 1,5 мг/л БАП.

Для оценки морфогенной способности сортов розы эфиромасличной в условиях *in vitro* учитывали количество сформировавшихся листьев. Сорта Радуга, Лань, Фестивальная образовывали в среднем от 4 до 7 листьев / микропобег. Количество листьев способствовало повышению пластичности сорта и его дальнейшей адаптивности к различным факторам культивирования.

Для выявления генотипа с наибольшим адаптационным потенциалом были проведены морфо-анатомические исследования микропобегов и регенерантов. Высота изучаемых регенерантов составляла от 2,4-3,2 см у сорта Радуга до 3,6-4,2 см у сорта Лань. Листья у описываемых сортов розы эфиромасличной тройчатосложные с перистым жилкованием. На каждом микропобеге в среднем 6-7 листьев. При этом листовые пластинки сортов Радуга и Фестивальная мельче, чем у сорта Лань: длина простого листа $0,63-0,67$ см и $0,87$

см соответственно. По структурным особенностям, они имеют как общие, так и специфические анатомические характеристики. Листья бифациального типа, гипостоматические, тонкие, средняя их толщина составляет от 79,30 мкм до 121,52 мкм. Адаксиальная и абаксиальная эпидерма однослойная, клетки имеют неправильную форму с извилистыми краями. Кутикулярный слой и железистые волоски отсутствуют. Устьичные аппараты аномоцитного типа, в условиях *in vitro* большая часть устьиц находится в открытом состоянии. Устьица мелкие, их длина составляет 19,00 – 20,14 мкм (на 1 мм² площади абаксиальной эпидермы располагается 77-88 устьиц, наибольшее значение характерно для сорта Радуга). Мезофилл дифференцирован на палисадную и губчатую ткань (клетки хлоренхимы расположены рыхло, на срезах видны воздухоносные полости). Губчатая паренхима по толщине превышает палисадную, только у одного сорта Фестивальная толщина этих тканей практически равна (38,09 мкм и 37,24 мкм соответственно). Клетки палисадного мезофилла цилиндрические, вытянуты перпендикулярно листовой поверхности, располагаются в 1 (реже 2) слоя. Подсчитано количество хлоропластов в клетках этой ткани – от 8,0 до 9,6 шт. / клетку (максимальные значения характерны для сорта Фестивальная). Этот показатель можно рассматривать, как признак мощной фотосинтетической системы, обеспечивающий значительную продуктивность данному генотипу. Губчатая ткань представлена 2-3 слоями горизонтально расположенных округлых или овальных клеток, пластиды в которых имеют пристенное расположение и ориентированы к адаксиальной стороне.

Заключительным этапом в протоколе клонального микроразмножения является этап укоренения микропобегов. Для разработки способа укоренения в опытах были использованы различные вещества ауксинового типа действия (ИМК, НУК, ИУК). Положительные результаты были получены при введении микропобегов на питательную среду $\frac{1}{2}$ MS (макро- и микроэлементы и витамины), дополненную 20 г/л сахарозы и ИМК в концентрации 0,5-2,0 мг/л. Процент укорененных микропобегов у исследуемых сортов Фестивальная, Лань и Радуга увеличивался при повышении концентрации ИМК от 0,75 до 1,5 мг/л.

Таким образом, нами разработан протокол клонального микроразмножения трех сортов розы эфиромасличной и определены их

структурные и физиологические особенности. Среди изученных сортов наибольшим адаптационным потенциалом по комплексу морфо-анатомических характеристик обладает сорт Фестивальная, благодаря большему количеству удлиненной формы листьев на регенерант (соотношение ширины к длине 0,65 по сравнению с 0,68 и 0,73 – у сортов Радуга и Лань, соответственно), развитости палисадной паренхимы и максимальному количеству хлоропластов в клетках палисадного мезофилла.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-50-00079.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.

2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наук. думка, 1980. 488 с.

3. Кириченко Е.Б., Фернандо Ш.С., Кузьмина Т.А., Чернядьев И.И. Особенности органогенеза эфиромасличных роз при клональном микроразмножении // Бюлл. ГБС. 1993. Вып. 167. С. 96-102.

4. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур // Методология биотехнологических и вирусологических исследований ценных многолетних культур: Сб. науч. трудов ГНБС. 2014. Т. 138. С. 5-56.

5. Прозина М. Н. Ботаническая микротехника. М.: Высшая школа, 1960. 208 с.

6. Murashige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, N 13. P. 473–493.

7. Pati P.R., Rath S.P., Sharma M., Sood A., Ahuja P.S. *In vitro* propagation of rose: A review. *Biotech. Adv.* 2006. 24. P. 94-114.

УДК 579.64: 631.46

СКРИНИНГ БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ

Л.А. Беловежец¹, М.С.Третьякова², Ю.А. Маркова²

¹Институт Химии им. А.Е. Фаворского, СО РАН, г. Иркутск, 664033, e.mail: lyu-sya@yandex.ru

²Институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, 664033, e.mail: marina-tretjakova@yandex.ru

Из эндосферы и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной почве, выделены культуры бактерий. В лабораторных условиях исследовали их деструктивную активность по отношению к нефти. Выявлено, что наибольшей нефтедеградирующей активностью обладали 8 культур бактерий, которые за 2 месяца культивирования утилизировали около 50 % нефти. Полученные результаты являются перспективными для разработки препарата, способствующего очищению почвы от нефтепродуктов.

Ключевые слова: нефтедеструкторы, скрининг, биодegradация нефти.

Проливы нефти и нефтепродуктов занимают первое место среди экологических проблем во всем мире. Самой уязвимой с точки зрения экологической безопасности является почва за счет ее огромной адсорбирующей поверхности. Она способна аккумулировать загрязнения в больших количествах, что приводит к изменению ее физических, агрохимических, микробиологических характеристик, утрате сельскохозяйственного значения [1]. Среди всех методов очистки нефтезагрязненных территорий наиболее перспективным является микробиологический, основанный на стимулировании роста и активности природных микроорганизмов (биостимуляция) или внесении в почву активных микроорганизмов-деструкторов (биоаугментация) [2-3]. Однако, для эффективной нефтедеструкции необходимо создание собственных микробных препаратов, в состав которых входят только аборигенные микроорганизмы.

В последнее время, особое внимание отводится роли эндофитных и ризосферных бактерий в биоремедиации почвы. Есть сведения, указывающие, что растения, выросшие в условиях нефтезагрязнения, селективно накапливают эндофитную микрофлору, имеющую плазмиды для утилизации нефтепродуктов [4]. Также, численность микроорганизмов, способных к деструкции загрязнения, в ризосфере растений существенно больше, чем вне ее [5,6].

Целью данной работы было выделение эндофитных и ризосферных микроорганизмов из растений, произрастающих на почвах, загрязненных нефтепродуктами, и их скрининг по способности к деструкции нефти.

Из эндосферы и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории Иркутской области (п.Тыреть) выделено 115 культур бактерий, способных расти на нефтепродуктах, как единственном источнике углерода. Из них для дальнейшего исследования отобраны 60 культур бактерий, которые охарактеризовали по морфологическим и тинкториальным признакам. Все культуры оказались палочками, по Граму окрашивались всего 10 культур. Наиболее существенную нефтеразлагающую активность показали 8 культур бактерий (табл. 2).

При визуальном исследовании выяснилось, что бактерии У102, 108, 109, 138, 64, 90, показавшие себя наиболее эффективными деструкторами, разлагали до 50 % нефти с образованием эмульсии (рис. 1). Данный факт свидетельствует о том, что эти штаммы бактерий способны синтезировать и секретировать сурфактанты (7-8).

Убыль нефти при культивировании штаммов У 112 и 114 составляла 50 и 54 процентов соответственно. При этом не происходило эмульгирование нефти, но наблюдалось истончение нефтяной пленки, ее обесвечивание. Культуральная жидкость становилась мутной за счет увеличения биомассы бактерий, отмечалось выраженное газообразование (рис. 2). При экстракции отмечено, что часть вещества не растворялась ни в водной фазе, ни в гексане, образуя соломенно-желтую, желеобразную субстанцию. Мы считаем, что в данном случае происходит преимущественное разложение ароматической составляющей нефти.

Таблица 2. Биотрансформация нефти в жидкой минеральной среде бактериями, ассоциированными с растениями

	Убыль нефти, массовые %	Бактерии
Слаборазрушающие	5-10	У59, 111
	15-20	У83, 91, 129, 120, 133, 77, 78, 104, 136, 131, 89, 74, 116, 106, 140, 141, 142
Среднеразрушающие	20-30	У98, 99, 100, 121, 124, 130, 132, 82, 139
	30-35	У81, 88, 92, 94, 96, 97, 105, 122, 76, 137, 60, 86
Сильноразрушающие	40-45	У102, 109, 138, 64
	45-54	У108, 112, 114, 90

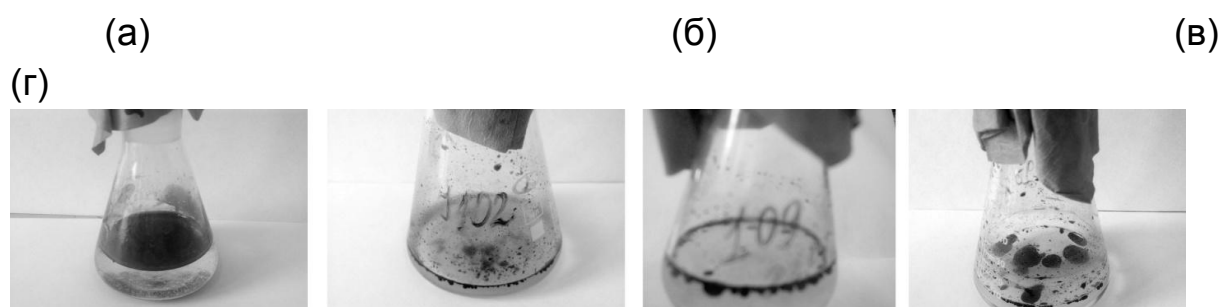


Рис. 1 Дегградация углеводородов нефти в жидкой минеральной среде (а) контроль - нефть, (б) добавление в среду У102, (в) У109, (г) У138

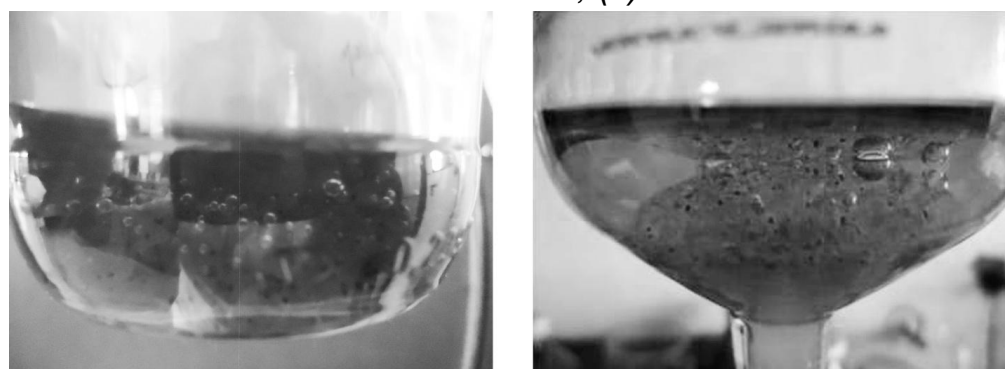


Рис.2. Образование газов штаммом У112 при разложении сырой нефти

Таким образом, культуры бактерий утилизируют нефть с разной эффективностью. Наибольшую деградирующую способность показали штаммы У102, 108, 109, 112, 114, 138, 64, 90, которые будут нами использованы для дальнейших экспериментов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-44-04094 р_сибирь_а.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Киреева Н.А. // Биотехнология. 1996. №1. С. 51-54.
2. Коронелли Т.В. // Прикл.биохимия и микробиология.1996. Т. 32. № 6. С. 579-585.
3. Вельков В.В. // Биотехнология. 1995. № 3-4. С. 20.
4. Siciliano S.D. et al., 2001. Appl. Environ. Microbiol., 66,4673-4678.
5. Binet P., Portal, J.M., Leyval C. // Soil Biol. Biochem, 2000. V. 32. 2011-2017 p.
6. Banks M.K., Schwab P., Liu B., et al. / Biotechnol, 2003. V. 78. 75-96 p.
7. Makkar R.S., Cameotra S.S. Ann update on the USA of Unconventional Substance for biosurfactant proction and their new application// Applied Microbiology Biotechnology, 2002. V. 58. 428-434 p.
8. Kitamoto D., Isoda H..Review of functions of glicolipids biosurfactants // Journal of Biotechnology, 2002. V. 3. 187-201 p.

УДК 561.284.579.61

ГЛУБИННЫЙ МИЦЕЛИЙ *PLEUROTUS OSTREATUS*

И *PLEUROTUS DJAMOR*

КАК ИСТОЧНИК ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В. В. Тарнопольская, О. В. Киселева, Е. В. Алаудинова,
П. В. Миронов

Сибирский государственный технологический университет
660049 Красноярск, пр. Мира, 82, e-mail: veronichkat@mail.ru

*Исследован состав жирных кислот омыляемой фракции липидов глубинного мицелия *Pleurotus ostreatus* и *Pleurotus djamor*. Определено, что в биомассе *Pleurotus djamor* содержание суммарных липидов втрое выше, чем у *Pleurotus ostreatus*. В составе липидов обоих видов преобладают C₁₈ ненасыщенные жирные кислоты, среди которых доминирует незаменимая линолевая кислота.*

*Ключевые слова: ксилотрофные базидиомицеты, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor*, глубинный мицелий, липиды, жирные кислоты.*

Одной из актуальных задач современной науки и технологии является поиск экологически чистых, безопасных и возобновляемых источников физиологически активных веществ, белка, ферментов и антибиотиков. В связи с этим высшие базидиальные грибы привлекают к себе все возрастающее внимание исследователей в качестве продуцентов широкого спектра биологически активных компонентов; они способны к биосинтезу белков, полисахаридов, ферментов, антибиотиков, витаминов, а также могут накапливать значительное количество биологически активных веществ (БАВ) липидной природы [1,2].

Настоящая работа является частью комплексного исследования по культивированию мицелия базидиальных грибов и посвящена изучению жирнокислотного состава липидов глубинного мицелия вешенки обыкновенной (*P. ostreatus*) и вешенки розовой (*P. djamor*). Ранее нами было показано, что биомасса глубинного мицелия штаммов базидиальных грибов из коллекции кафедры химической технологии и биотехнологии СибГТУ может служить источником полноценного белка и углеводов [4-6].

На сегодняшний день в научной литературе имеются данные о жирнокислотном составе плодовых тел ряда базидиомицетов, свидетельствующие о том, что они являются перспективным источником ненасыщенных жирных кислот (ЖК). Вместе с тем, получение плодовых тел базидиомицетов требует больших затрат энергии и времени. Современная биотехнологическая альтернатива традиционному грибоводству – получение вегетативного мицелия базидиомицетов погружным способом в биореакторах. К неоспоримым преимуществам этой технологии следует отнести существенное

сокращение производственного цикла, возможность получения биомассы с контролируемым химическим составом, стерильность получаемого продукта; кроме того, глубинный мицелий, не уступает, а зачастую превосходит плодовые тела по содержанию биологически активных веществ [7, 8].

Объектом исследования являлись штаммы базидиальных грибов PO-4.1 *Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*) – вешенка устричная и PD-3.2 *Pleurotus djamor* (*P. djamor*) – вешенка розовая, чистые культуры которых были выделены из коммерческих плодовых тел.

Культивирование штаммов проводили в поверхностных и глубинных условиях. Поверхностное культивирование осуществляли на агаризованном овсяном отваре при температуре 26 ± 1 °C в течение 7 суток; полученные поверхностные культуры использовали в качестве инокулята для глубинного культивирования.

Глубинное культивирование осуществляли в стационарном лабораторном биореакторе «CeCa-Cx650, Великобритания» в течение 96 часов при температуре 26 ± 1 °C, pH 5,0 и непрерывном барботировании стерильным воздухом. В качестве питательной среды использовали раствор крахмала с добавками минеральных солей.

Выделение липидов из глубинного мицелия проводилось по методу Блайя и Дайера смесью растворителей хлороформ-изопропанол [3]. Для удаления нелипидных примесей экстракт промывали водой. Дополнительную очистку суммарных липидов от остатков углеводов проводили методом гель-фильтрации через сефадекс G-25. После щелочного гидролиза суммарных липидов жирные кислоты анализировали в виде их метиловых эфиров с использованием диметилацетата в качестве метилирующего агента.

Экстракты липидов исследовались методом хромато-масс-спектрометрии. Анализ проводили на газожидкостном хроматографе «Agilent Technologies» фирмы «Хьюлетт-Паккард» (США) модель 6890N с масс-селективным. Идентификацию компонентов проводили по масс-спектрам (библиотека масс-спектров NIST 02.L), индексам удерживания, сравнением со стандартами (фирмы Sigma, Serva); положение двойных связей уточняли по диметилдисульфидным и оксозолиновым производным.

Коэффициент ненасыщенности (K_n) жирных кислот определяли как отношение суммы ненасыщенных ЖК к сумме насыщенных ЖК.

В данной работе на первом этапе определено содержание суммарных липидов в исследуемом сырье с последующим разделением липидного экстракта на две основные фракции – омыляемую и неомыляемую, результаты представлены в таблице 1.

Полученные данные свидетельствуют о значительно более высоком содержании суммарных липидов в глубинном мицелии *P. djamor* по сравнению с мицелием *P. ostreatus* – примерно в 3 раза; одновременно содержание омыляемой фракции в мицелии *P. djamor* выше в 2,5 раза.

Таблица 1. Содержание липидов в глубинном мицелии *P. djamor* и *P. ostreatus*

Содержание липидов, % а.с.м. мицелия	Мицелий <i>P. djamor</i>	Мицелий <i>P. ostreatus</i>
Суммарные липиды:	8,07±0,38	2,78±0,13
омыляемая фракция	6,83±0,32	2,35±0,11
неомыляемая фракция	1,24±0,06	0,43±0,02

На следующем этапе методом хромато-масс-спектрометрии был установлен состав жирных кислот (ЖК) липидов омыляемых фракций.

В омыляемой фракции липидов *P. djamor* обнаружено 20, а у *P. ostreatus* – 18 индивидуальных жирных кислот, различающихся по числу углеродных атомов и двойных связей. В общем пуле ЖК идентифицированы соединения с числом углеродных атомов от 10-ти (каприновая) до 24-х (лигноцереновая).

Наибольшую долю среди всех соединений составляют кислоты с 16-ю и 18-ю атомами углерода, их сумма у обоих видов достигает 90-91 %. У обоих видов C₁₆ и C₁₈ кислоты представлены одинаковыми компонентами: пальмитиновой, дигидроксипальмитиновой, пальмитолеиновой (на их долю приходится около 30 % от суммы ЖК) и стеариновой, олеиновой, линолевой, линоленовой (их доля – около 60 %).

Низкомолекулярные компоненты с числом атомов углерода от 10 до 13 обнаружены у обоих видов в следовых количествах. Также невелико содержание длинноцепочечных ЖК (C_{>20}), оно составляет примерно 1 % в мицелии *P. ostreatus* и 2,5 % у *P. djamor*.

Содержание насыщенных ЖК у *P. ostreatus* составляет 41,11 %; у *P. djamor* – 48,02 %. У обоих видов около 80 % от суммы насы-

щенных ЖК приходится на долю пальмитиновой и стеариновой кислот.

Общей чертой *P. djamor* и *P. ostreatus* является преобладание в составе омыляемой фракции липидов ненасыщенных жирных кислот (НЖК). Для глубинного мицелия *P. djamor* этот показатель составляет 51,98 % от суммы ЖК, для мицелия *P. ostreatus* – 58,89 %.

Содержание основных групп ненасыщенных жирных кислот приведено на рисунке 1.

Мононенасыщенные жирные кислоты в исследованных образцах представлены в основном пальмитоолеиновой и олеиновой кислотами. Олеиновая кислота составляет основную долю – около 42 % у *P. djamor* и 30 % у *P. ostreatus*.

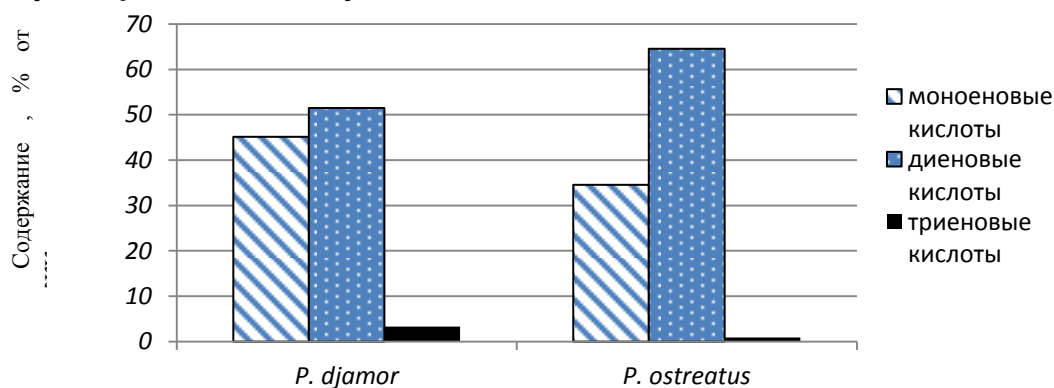


Рис. 1. Содержание основных групп ненасыщенных жирных кислот у *P. djamor* и *P. ostreatus*

Диеновые и триеновые полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) в исследованных образцах биомассы представлены незаменимыми линолевой и линоленовой кислотами. Линолевая ЖК содержится в обоих исследованных образцах в наибольшем количестве: около 52 % у *P. djamor* и около 65 % у *P. ostreatus* от суммы НЖК, что делает мицелии ценным источником БАВ липидной природы. Суммарное содержание линолевой и линоленовой кислот у *P. djamor* примерно 30 % от суммы ЖК, что соответствует 55 % от общего содержания НЖК. У *P. ostreatus* эти показатели выше и составляют около 40 % от суммы ЖК и 65 % от общего содержания НЖК в липидах.

Для оценки возможности комплексного использования глубинного мицелия в качестве источника БАВ было рассчитано содержание биологически ценных липидных компонентов (рис. 2).

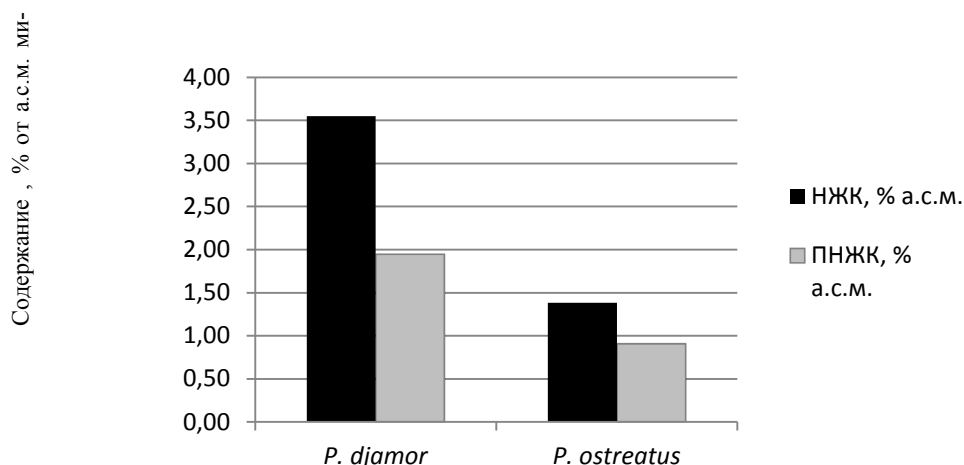


Рис. 2. Содержание ненасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в мицелии

С учетом содержания омыляемой фракции липидов в биомассе мицелия незаменимые ПНЖК у *P. ostreatus* составляют около 1 %, а у *P. djamor* – 2 %.

Таким образом, в ходе исследований были получены данные, свидетельствующие о том, что в целом жирнокислотный состав омыляемой фракции липидов глубинных культур *P. djamor* и *P. ostreatus* является благоприятным по содержанию незаменимых ПНЖК с точки зрения перспективы использования биомассы в качестве комплексных кормовых и пищевых добавок, а также выделения БАВ липидной природы. При этом необходимо отметить, что глубинный мицелий *P. djamor* почти в три раза превосходит мицелий *P. ostreatus* по содержанию суммарных липидов и в два раза по содержанию незаменимых ПНЖК.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т.1/ Под ред. С. П. Вассера. – Киев: Альтерпрес, 2011. – 212 с.
2. Гвоздкова, Т. С. Оценка возможности использования базидиальных грибов в качестве источников биоактивных липидных компонентов / Т. С. Гвоздкова, Т. В. Черноок, Т. В. Филимонова и др. // Успехи медицинской микологии. – 2007. – Т. IX. – С.151-154.
3. Кейтс, М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 322 с.

4. Киселева, О. В. Исследование химического состава и оценка возможностей использования глубинного мицелия серно-желтого трутовика для получения белковых пищевых и кормовых продуктов / О. В. Киселева, С. В. Терентий, В. В. Тарнопольская и др. // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. – 2014. – С. 420-422.

5. Тарнопольская, В.В. Характеристика углеводного состава некоторых видов базидиальных грибов / В.В. Тарнопольская, К.А. Квиткевич, И.А. Александрова и др. // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. – 2014. – С. 296-297.

6. Уфимцева, О. В. Получение биомассы мицелия грибов вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus* и серно-желтого трутовика *Laetiporus sulphureus* в глубинных условиях / О. В. Уфимцева, П. В. Миронов, Т. И. Громовых // Хвойные бореальной зоны. – 2009. – №2. – С. 294-296.

7. Papsyridi, L. M. Submerged fermentation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor as a promising alternative for effective production of bioactive metabolites / L. M. Papsyridi, N. Aligiannis, E. Topakas et al. // Molecules. – 2012. – Vol. 17. – P. 2714-2724.

8. Vamanu, E. Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms / E. Vamanu // Journal of Biomedicine and Biotechnology. - Vol. 2012, article ID565979. – 8 p.

УДК 577.154.2 + 542.952+ 579.22; 577.152.1
БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ
ТРИГЛИЦЕРИДОВ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ В БИОДИЗЕЛЬ

Г.А. Коваленко¹, Л.В. Перминова¹, А.Б. Беклемишев²

¹ Институт катализа СО РАН,
630090, Россия, Новосибирск, проспект Лаврентьева, 5, galina@catalysis.ru

² НИИ биохимии СО РАН,
630117, Россия, Новосибирск, ул. Тимакова, 2, beklem@soramn.ru

*Проведены исследования гетерогенного биокаталитического процесса переэтерификации растительных масел в этиловые эфиры жирных кислот с участием этанола или этилацетата и биокатализаторов, приготовленных путем включения в ксерогель диоксида кремния клеточных лизатов рекомбинантного штамма *rE.coli/lip*, продуцирующего термостабильную липазу из *Thermomyces lanuginosus*. Было показано, что этилацетат является оптимальным ацилирующим реагентом в изученной реакции переэтерификации. В отличие от этанола, этот реагент не инактивирует биокатализатор. Время полуинактивации биокатализаторов в изученных условиях процесса переэтерификации составило 720 ч при 40°С.*

Библиограф. 11 назв.

*Ключевые слова: биокатализаторы; *Escherichia coli*; штамм-продуцент; рекомбинантная липаза *Thermomyces lanuginosus*; включение в ксерогель диоксида кремния; переэтерификация триглицеридов*

Биодизель как альтернативное углеводородному горючее представляет собой метиловые (или этиловые) эфиры жирных кислот, и производится в процессе переэтерификации (этерификации) триглицеридов растительных масел в присутствии метанола (или этанола). Биодизель благодаря очень близким к дизельному топливу физико-химическим показателям (вязкости, теплотворности), используют в двигателях внутреннего сгорания, чаще всего, в смеси с традиционным углеводородным горючим [1]. Наиболее распространенной маркой является смесь B20, в составе которой 20% приходится на биодизель, 80% – на дизель (цифра после буквы «В» обозначает процентное содержание биодизеля в топливе). При применении смесей B5–B20 не требуется технических изменений в двигателях.

Технология получения биодизеля из растительного масла сравнительно проста, и мини-заводы по производству биодизеля могут быть установлены и вблизи крупных ресторанных комплексов, отходами которых являются использованные растительные масла и фритюры [1–3]. Процесс проводят путем метанолиза растительного

масла при 60°C, 1 атм в присутствии катализатора – КОН или NaOH. Легкие верхние фракции содержат эфиры жирных кислот (биодизель), нижние фракции (глицериновая фаза) – глицерин, метанол и щелочь. Глицериновая фаза представляет серьезную экологическую проблему из-за высокой щелочности и содержания токсичного метанола. Основные технические требования к процессу состоят в том, чтобы выход эфиров жирных кислот был не ниже 96%, и биодизель не содержал примеси воды, так как вода приводит к микробиологическому заражению и образованию жирных кислот, вызывающих коррозию металлических деталей.

В последнее время пристальное внимание уделяется изучению процесса получения биодизеля путем ферментативной переэтерификации с участием иммобилизованных липаз. В обзорных работах [4,5] описаны способы и условия проведения этого процесса, а также свойства используемых биокатализаторов. В 2007 г. одним из первых был реализован периодический процесс метанолиза отработанных пищевых масел мощностью 10 тыс. тонн, с участием биокатализатора, приготовленного путем иммобилизации липазы из *Candida* sp. [5].

Активным компонентом биокатализаторов процесса получения биодизеля является **липаза**. В водных средах этот фермент гидролизует эфирные связи в молекулах триглицеридов с образованием жирных кислот, глицерина, моно- и диглицеридов. В неводных средах липаза осуществляет обратные реакции синтеза, в том числе, реакцию этерификации жирной кислоты спиртом с образованием эфира этой кислоты. Следует обратить внимание на то, что для получения биодизеля используют **цельноклеточные биокатализаторы**, приготовленные на основе клеток штаммов-продуцентов, без проведения стадий выделения и очистки индивидуального фермента. Очевидно, что стоимость цельноклеточных биокатализаторов существенно ниже стоимости биокатализаторов, приготовленных на основе частично очищенного фермента. В работе [6] авторы оценили вклад стоимости ферментативно-активного компонента биокатализаторов в стоимость конечного продукта, и показали, что биодизель, произведенный с участием цельноклеточного биокатализатора, существенно (на 1–2 порядка) дешевле продукта, полученного с участием коммерческих биокатализаторов Lypozyme®

и Novozyme[®] (NOVOZYMES), приготовленных на основе очищенной липазы.

Современным направлением в гетерогенном биокатализе является конструирование микроорганизмов, продуцирующих «химерные» липазы, экспонируемые на наружной поверхности клеточной стенки из-за входящих в их состав трансмембранных («якорных») областей белков клеточных стенок различных микроорганизмов [6, 7]. Так, для приготовления цельноклеточных биокатализаторов в работе [6] использовали клетки *Pichia pastoris*, синтезирующих «**химерные**» липазы, содержащие аминокислотные последовательности якорной области α -агглютинаина и липазы В *Candida antarctica* или *Rhizomucor miehei*. Как отмечалось выше, химерные липазы были экспонированы на наружной поверхности клеточной стенки дрожжей посредством якорной области. Для таких биокатализаторов, во-первых, снимаются проблемы массопереноса триглицеридов внутрь клетки, что повышает активность биокатализаторов, во-вторых, появляются новые свойства, например, повышенная устойчивость в органических растворителях.

Процесс ферментативной переэтерификации масел проводят при 40–50°C. Поскольку растительное масло сравнительно плохо растворяется в спиртах, используют со-растворители – гексан, *трет*-бутанол. После реакции биокатализатор удаляют из реакционной среды фильтрацией или центрифугированием, промывают растворителем и возвращают в следующий реакционный цикл, продолжительность которого составляет десятки часов. Поиск и подбор оптимального состава реакционной среды (масло, растворитель и со-растворитель) для конкретной ферментативной реакции представляет непростую научно-практическую проблему.

Известно, что низшие спирты быстро инактивируют ферменты, поэтому для того чтобы уменьшить процесс инактивации, метанол в течение реакционного цикла добавляют порциями, ступенчато. В оптимальных условиях метанолиза с участием коммерческого биокатализатора Novozyme[®] конверсия масла в эфиры жирных кислот составила >99% за 50 ч при 45°C [8]. В работе [9] были проведены исследования реакции ферментативной переэтерификации масел с использованием другого акцептора ацильных групп – метилацетата. Даже при мольном соотношении масло : метилацетат = 1 : 12, этот

реагент не снижает активность коммерческого биокатализатора [9]. В оптимальных условиях работы Novozyme® выход эфиров составил 96%, при этом время полуинактивации увеличилось в 20 раз по сравнению с реакцией в метаноле [9]. При переэтерификации масел с участием метил- или этилацетата образуются различные ацил-производные глицерина, имеющие практическое значение. Например, ацетаты глицерина входят в состав отвердителей. Моно- и триацил производные глицерина используют в качестве топливной добавки. Триацилглицерин (триацетин) широко используют в пищевой промышленности благодаря его влагоудерживающим свойствам, а также в табачной промышленности для пропитки сигаретных фильтров.

В данной работе были проведены исследования биокаталитического процесса переэтерификации растительных масел в этиловые эфиры жирных кислот с участием этанола и этилацетата. Процесс осуществляли с помощью биокатализатора, приготовленного путем включения в ксерогель диоксида кремния лизатов рекомбинантного штамма *rE.coli/lip*, продуцирующего термостабильную липазу из *Thermomyces lanuginosus*. Процессы переэтерификации исследовали в периодическом режиме в реакторе смешения.

Рекомбинантный штамм-продуцент термостабильной липазы (обознач. *rE.coli/lip*) был сконструирован методами клонирования гена зрелой липазы из *T. lanuginosus* в клетках *E. coli* BL21(DE3) в составе вектора экспрессии pJexpress401 (DNA2.0, USA). Клеточные лизаты *rE.coli/lip* были получены при обработке клеток последовательно лизоцимом, ДНК_{азой}I и РНК_{азой}A и последующим озвучиванием в ультразвуковом дезинтеграторе, как описано в [10,11]. Биокатализаторы были приготовлены путем включения клеточных лизатов *rE.coli/lip* в ксерогель диоксида кремния [10,11]. Размер гранул биокатализаторов составил 1-1.5 мм, влажность 6 %.

В реакциях переэтерификации использовали смеси подсолнечного масла с этанолом и с этилацетатом. Мольные соотношения масла и ацилирующих агентов варьировали в диапазоне 1 : (2÷1000) соответственно. В качестве со-растворителя использовали *n*-гексан. Периодический процесс переэтерификации осуществляли в реакторе смешения при 40°C. Продолжительность одного реакционного цикла варьировалась от 5 час до 6 суток.

Анализ продуктов реакции переэтерификации – этиловых эфиров жирных кислот, осуществляли методами газовой (ГХ) и тонкослойной (ТСХ) хроматографий. Для ГХ-анализа использовали капиллярную колонку длиной 30 м и с внутренним диаметром 0.32 мм. Толщина пленки Карбовакса 20М (Supelco) составила 0.25 мкм. Количественный состав эфиров жирных кислот определяли методом внутреннего стандарта – гексанола, с учетом найденных экспериментально калибровочных коэффициентов. В методе ТСХ использовали хроматографическую камеру с растворителем следующего состава, в об. %: гексан / диэтиловый эфир / уксусная кислота = 80 / 20 / 1. После хроматографирования ТСХ-пластинки с нанесенным слоем SiO₂ (марок Silufol, Сорбфил) высушивали, затем проявляли в 5%-ном растворе фосфомолибденовой кислоты в этаноле с последующим прогреванием.

Расчет выхода продуктов (в %) реакции переэтерификации проводили, учитывая тот факт, что для приготовления биокатализаторов использовали специфичную рекомбинантную липазу из *T. lanuginosus*.

Приготовление и состав биокатализаторов. Метод приготовления цельноклеточных биокатализаторов, основанный на применении золь-гель процессов и приводящий к формированию неорганно-органических (гибридных) композитов, является оригинальной разработкой авторов данной работы. В данном случае неорганической матрицей является SiO₂-ксерогель, органической фазой – частично или полностью разрушенные бактериальные клетки, обладающие ферментативной активностью, и распределенные в неорганической матрице как наноразмерные включения, придающие синтезируемым материалам необходимые свойства. В SiO₂-ксерогель можно также вводить компоненты, выполняющие дополнительную функциональную роль: активаторы/стабилизаторы ферментов, влагоудерживающие агенты, наноструктурированный углерод [10, 11]. Выбор оптимального состава многокомпонентных биокатализаторов осуществляют при одновременном выполнении двух основных условий: во-первых, максимальная биокаталитическая активность в условиях реакции переэтерификации в безводных реакционных средах (с содержанием воды ~0.1–1 %), во-вторых, высокая механическая прочность гранул, обеспечивающая стабиль-

ную работу биокатализаторов. Оптимальный состав исследованных в данной работе биокатализаторов был следующим, в мас.% по сухим веществам: клеточные лизаты *rE.coli/lip* – 37÷39, мальтодекстрины – 10, наночастицы углерода – 0÷10, SiO₂ остальное.

Переэтерификация растительного масла этанолом. При исследовании кинетических закономерностей реакции этанолиза подсолнечного масла с участием приготовленных биокатализаторов было обнаружено, что максимальная скорость переэтерификации наблюдается при мольном соотношении 1 : (7÷9). Исследования показали, что этанол необратимо инактивирует липазу, и биокатализаторы теряют 80–90% первоначальной активности в течение трех реакционных циклов (в течение 72 ч работы) даже при низких концентрациях этанола (0.35 М).

Переэтерификация растительного масла этилацетатом. ГХ анализ продуктов реакции переэтерификации показал, что в изученных условиях образуются этиловые эфиры жирных кислот подсолнечного масла – пальмитиновой (16:0), стеариновой (18:0), олеиновой (18:1) и линолевой (18:2).

Изучение зависимости количества образовавшихся эфиров жирных кислот от начальной концентрации масла и этилацетата в реакционной среде показали, что максимальная скорость переэтерификации наблюдается при мольном соотношении масла и этилацетата, равном 1: (15÷20). Константа Михаэлиса для масла была близкой к величине 0.02 М, для этилацетата – 0.75 М.

Исследования операционной стабильности приготовленных биокатализаторов проводили в течение 25 реакционных циклов (более 1000 ч) при 40°C. Константа инактивации ($k_{ин}$) биокатализатора составила $1.6 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, что на ~2 порядка меньше $k_{ин}$ в реакции переэтерификации в масложировых смесях при 70°C [11]. Время полуйнактивации биокатализаторов 720 ч (рис. 1). По данным ГХ, выход эфиров жирных кислот через 260 ч и 600 ч работы биокатализатора, измеренный в соответствующем реакционном цикле, составил, соответственно, 60% и 35 %.

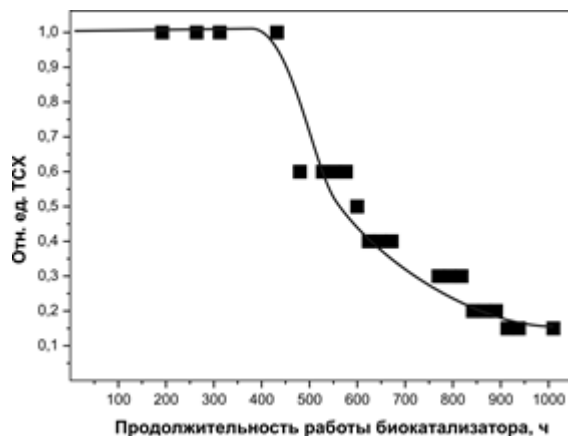


Рис. 1. Стабильность биокатализатора в периодическом процессе переэтерификации подсолнечного масла этилацетатом. Условия реакции: 40°C, 0.1 М масла, 2.3 М этилацетата, скорость перемешивания 150 об/мин

В данной работе были проведены исследования биокаталитического процесса переэтерификации растительного масла в этиловые эфиры жирных кислот с участием этанола и этилацетата в периодическом режиме. Процесс осуществляли с участием биокатализатора, приготовленного путем включения в ксерогель диоксида кремния клеточных лизатов рекомбинантного штамма *rE.coli/lip*, продуцирующего термостабильную липазу из *Thermomyces lanuginosus*.

Было показано, что в реакции образования этиловых эфиров жирных кислот этанол быстро и необратимо инактивирует фермент, тогда как в присутствии этилацетата приготовленные биокатализаторы работают в течение сотен часов при оптимальном мольном соотношении масло: этилацетат, равном 1: (15–20). Время полунактивации биокатализаторов в реакции переэтерификации подсолнечного масла этилацетатом составило 720 ч при 40°C; выход продуктов – 60 %.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Девянин С.Н., Марков В.А., Семенов В.Г.* Растительные масла и топлива на их основе для дизельных двигателей. М., 2008. 400 С.

2. Федоренко В.Ф., Колчинский Ю.Л., Шилова Е.П. Состояние и развитие производства биотоплива. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2007. С. 79–118.

3. Инновационные технологии производства биотоплива второго поколения. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2009. 68 С.

4. *Stoytcheva M., Montero G., Toscano L., Gochev V., Valdez B.* // Biodiesel – Feedstocks and Processing Technologies. 2011. P. 397.

5. *DiCosimo R., McAuliffe J., Poulouse A. J., Bohlmann G.* // Chem Soc Rev. 2013. V. 42 (15): P. 6434

6. *Zi Jin , Shuang-Yan Han, Li Zhang, Sui-Ping Zheng, Yong Wang, Ying Lin* // Bioresource Technology. 2013. V. 130. P. 102.

7. *Fukuda H., Hama S., Tamalampudi S., Noda H.* // Trends in Biotechnology. 2008. V. 26 No.12. P. 668.

8. *Hernandez-Martin E., Otero C.* // Bioresource Technol. 2008. V. 99 (2). P. 277–286.

9. *Wei Du, Yuanyuan Xu, Dehua Liu, Jing Zeng* // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2004. V. 30. P. 125.

10. *Kovalenko G.A., Beklemishev A.B., Perminova L.V., Mamaev A.L., Rudina N.A., Moseenkov S.I., Kuznetsov V.L.* // J.Mol.Catal. B: Enzym. 2013. V. 98. P.78–86.

11. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Ткаченко В.И.* // Биотехнология. 2013. № 6. С. 35–50.

УДК 577.152.321+579.26

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ цАМФ У РАСТЕНИЙ КАК ВОЗМОЖНЫЙ КРИТЕРИЙ УСТОЙЧИВОСТИ КУЛЬТУР К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ПОЧВ ФТОРИДАМИ

Л.А. Ломоватская, О.В. Кузакова, А.А. Симакова, Л.Г. Соколова,
А.С. Романенко

СИФИБР С РАН

664033, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317,

LidaL@sifibr.irk.ru

В работе использовали проростки пшеницы, редьки масличной, донника и ячменя, выращенные на вытяжках, полученных из

почвы с искусственно внесенным NaF и из почвы, загрязненной аэровыбросами ИРКАЗа, а также проростки и растения, выращенные до стадии урожая на почве с искусственно внесенным NaF и почве, загрязненной аэровыбросами ИРКАЗа. Определяли уровень цАМФ в органах растений и вес этих органов. Было показано, что устойчивость растений к данному абиотическому стрессовому фактору зависит от системной активации их аденилатциклазной сигнальной системы.

Ключевые слова: устойчивость к водорастворимым фторидам, цАМФ, системная активация аденилатциклазной сигнальной системы

CHARACTER OF cAMP LEVEL CHANGE IN PLANTS AS A PROBABLE CRITERION OF CULTIVARS RESISTANCE TO SOIL POLLUTION BY FLUORIDES

L.A. Lomovatskaya, O.V. Kuzakova, A.A. Simakova, L.G. Sokolova, A.S. Romanenko

Siberian Institute of Plant Physiology & Biochemistry
Siberian Branch of the Russian Academy of Science
664033, Russia, Irkutsk, Lermontov str., 132, p/b 317, LidaL@sifibr.irk.ru

The study was performed on the seedlings of wheat, oilradish, melilot and barley grown on the extracts acquired from the soil with artificially introduced NaF and from the soil polluted with IrkAZ air exhaust and with the seedlings and plants grown up to the yield phase on the soil with artificially introduced NaF and on the soil polluted with IrkAZ air exhaust. cAMP level in the plant organs and organs weight were determined. Plant resistance to this abiotic stress factor was shown to depend on systemic activation of adenylcyclasesignal system.

Keywords: plantresistancetowatersolublefluorides, cAMP, systemic activation of plant adenylcyclase signal system

Вопросам ранней диагностики устойчивости растений посвящено немалое количество работ, но, как правило, предлагаемая методология использует для оценки устойчивости единичный параметр, как то: скорость роста или содержание эндогенных сахаров. Такой подход не дает объективной оценки устойчивости растений к неблагоприятному фактору среды, поскольку отслеживает частные проявления защитных реакций растений.

Для того, чтобы экстраполировать полученные в ранней диагностике результаты на взрослое растений в полевых условиях, требуется выбор параметров, в полной мере отражающих особенности метаболизма растения в предлагаемых условиях. Кроме того, желательно, чтобы эти параметры регулировали реализацию конститутивных механизмов устойчивости. Это относится к сигнальным системам растений, поскольку именно они уже на этапе восприятия сигнала дифференцируют его и обеспечивают соответствующий защитный ответ растительной клетки.

Ранее исследования по воздействию биотического стресса на растения картофеля (возбудитель кольцевой гнили) показали, что характер изменения уровня цАМФ в растениях картофеля под воздействием инфекции зависит от их сортовой устойчивости: более быстрый и интенсивный системный ответ аденилатциклазной сигнальной системы (АСС) наблюдался у растений устойчивого сорта [1]. Такой ответ АСС вполне объясним и призван оперативно запускать защитные механизмы у растений.

В тоже время роль АСС в реализации механизмов устойчивости растений к абиотическому стрессу, в частности, к загрязнению почв водорастворимыми фторидами, остается совершенно не исследованной.

Поэтому задачей данной работы было дать сравнительную оценку реакции аденилатциклазной сигнальной системы ряда сельскохозяйственных культур на повышенный уровень фторидов в почве.

Для экспериментов использовали семена следующих культур: районированный сорт яровой пшеницы (Тулунская-12), редька масличная (линия ИргСХА), донник белый «Обский гигант», ячмень яровой. Исследования проводили на нескольких модельных системах: «проростки-почвенная вытяжка» - семена ряда сельскохозяй-

ственных культур проращивали на вытяжках из почвы с искусственно внесенным NaF и из почвы, загрязненной аэровыбросами ИРКАЗа, «первый лист-почва» - те же культуры выращивали в почве с искусственно внесенным NaF и почве, загрязненной аэровыбросами ИРКАЗа до фазы первого листа, и, «взрослые растения-почва» - те же культуры выращивали в аналогичных условиях до фазы урожая.

Вытяжку в соответствии с методом [5] получали из агросерой почвы («контроль»), вторая вытяжка была сделана из той же почвы, содержащей NaF (500 мг/г почвы – «NaF»), и третья вытяжка производилась из почвы, взятой из зоны загрязнения ИРКАЗа (содержание F 10 ПДК – «ИРКАЗ»). Семена проращивались 7 дней на каждой из вытяжек, затем у них определяли вес корней и листьев, а также содержание цАМФ отдельно в корнях и листьях. В поле растения выращивали в условиях мелкоделяночных опытов [2], где присутствовали те же варианты почв. Во всех случаях определяли те же параметры, а именно вес листьев и корней, а также уровень цАМФ в корнях и листьях по отдельности. Лабораторные эксперименты проводили в 4 биологических повторностях по 50 семян. В полевых экспериментах проводили 2 биологических повторности по три растения в каждой.

Концентрацию цАМФ определяли методом ИФА [8], расчет уровня цАМФ делали на г сырого веса. Количество аналитических повторностей – 8.

Статистическая обработка данных заключалась в определении ошибки среднего.

Прежде всего, следует сказать, что все полевые культуры отличались по эндогенному содержанию цАМФ, что отражает их видовые особенности. Наряду с этим у проростков и взрослых растений всех исследуемых культур была выявлена неодинаковая реакция на абиотический стрессор. Это выразилось в колебаниях как уровня цАМФ, так и веса корней и coleoptилей/листьев растений. Параметр «вес» был использован для более объективной оценки физиологического состояния растений.

У пшеницы в эксперименте «проростки-почвенная вытяжка» во всех вариантах вес проростков оставался практически на уровне контроля, также как и концентрация цАМФ.

Это свидетельствует о том, что проростки пшеницы в данных

условиях не испытывали стресса. В системе «первый лист-почва» при проращивании семян пшеницы на различных вариантах почв вес корней также оставался почти на уровне контроля, тогда как у листьев превышал его, особенно в варианте «ИРКАЗ». Однако, уровень цАМФ у таких растений значительно снижался (рис.1). В обоих экспериментах воздействию неблагоприятного фактора подвергались проростки, но в почвенном опыте присутствовали дополнительные негативные факторы, как то, нестабильная температура, ветер и осадки, что нашло свое отражение в резком понижении уровня цАМФ в органах проростков. По литературным данным, именно в период «всходы-кущение» пшеница наиболее уязвима для внешних воздействий [4]. Тем не менее, при этом в этих экспериментах растения сохраняли высокую биомассу, особенно листья, которые испытывали только косвенное влияние фторида в отличие от корней. Совокупность высокой биомассы органов растений с пониженным уровнем цАМФ, на наш взгляд можно рассматривать как адаптацию проростков пшеницы к высокому содержанию фторидов в субстрате роста. Если такой вывод справедлив, то это должно найти подтверждение в результатах экспериментов на растениях, выращенных в тех же условиях, на стадии сбора урожая. Результаты показали, что вес органов растений во всех вариантах эксперимента был выше контроля, что сопровождалось весьма существенным повышением уровня цАМФ, причем в большей степени в корнях в варианте «NaF», чем в «ИРКАЗ».

Как на почвенной вытяжке у проростков (вариант «NaF» и «Ирказ»), так и у взрослых растений (вариант «ИРКАЗ») при сборе урожая была отчетлива заметна системная активация АСС, что выражалось в повышенном уровне цАМФ не только в корнях, но и в колеоптилях или листьях пшеницы. Совокупность полученных данных указывает на то, что пшеница успешно адаптировалась к данному стрессору.

У растений редьки масличной реакция на неблагоприятное воздействие на уровне проростков, выращенных на почвенной вытяжке, была близка к таковой у пшеницы (рис.2). Однако, если в модели «проростки-почвенная вытяжка» вес корней и листьев во всех вариантах опыта мало отличался между собой, то реакция АСС существенно превышала контроль у проростков редьки как на поч-

ВЕННОЙ

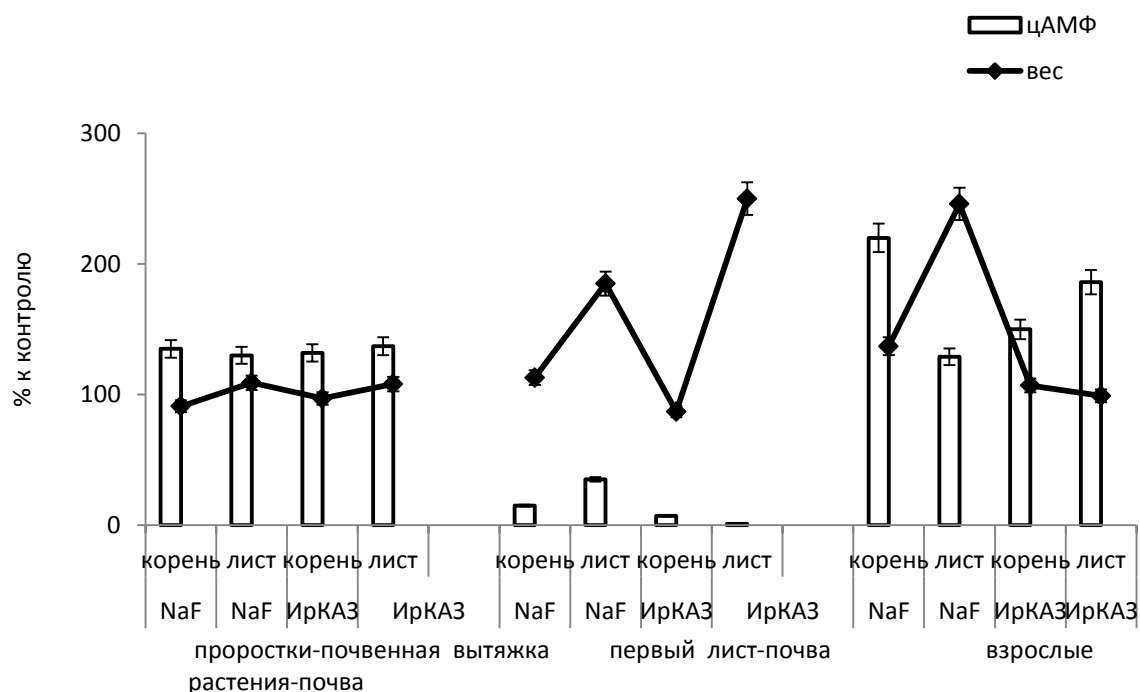


Рис.1. Изменение веса и активности аденилатциклязной сигнальной системы органов проростков/растений пшеницы под воздействием повышенной дозы водорастворимого фтора

вытяжке, так и особенно, в почве. В последнем случае обращает на себя внимание высокий уровень цАМФ как в корнях, так и в листьях редьки, что свидетельствует о развитии системного ответа АСС растений на абиотический стресс. При этом сохранение веса примерно на уровне контроля указывает на переход растений от стресса к успешной адаптации, что, в итоге, подтвердилось в экспериментах на взрослых растениях («взрослые растения-почва»), где вес их корней и листьев был выше контроля в 1,5-2,3 раза. Интересно, что это сопровождалось очень низким уровнем цАМФ, что, возможно связано с завершением вегетационного периода у этой культуры.

Донник во всех вариантах эксперимента (как на проростках, так и у взрослых растений) проявлял более интенсивную реакцию АСС, что сопровождалось снижением веса, как корней, так и листьев (рис.3). Такое распределение физиологических показателей указывает на то, что донник, начиная со стадии проростков, испытывал

сильный стресс, что привело в результате, к истощению адаптивного потенциала. Одной из причин этого явления может быть повышенный

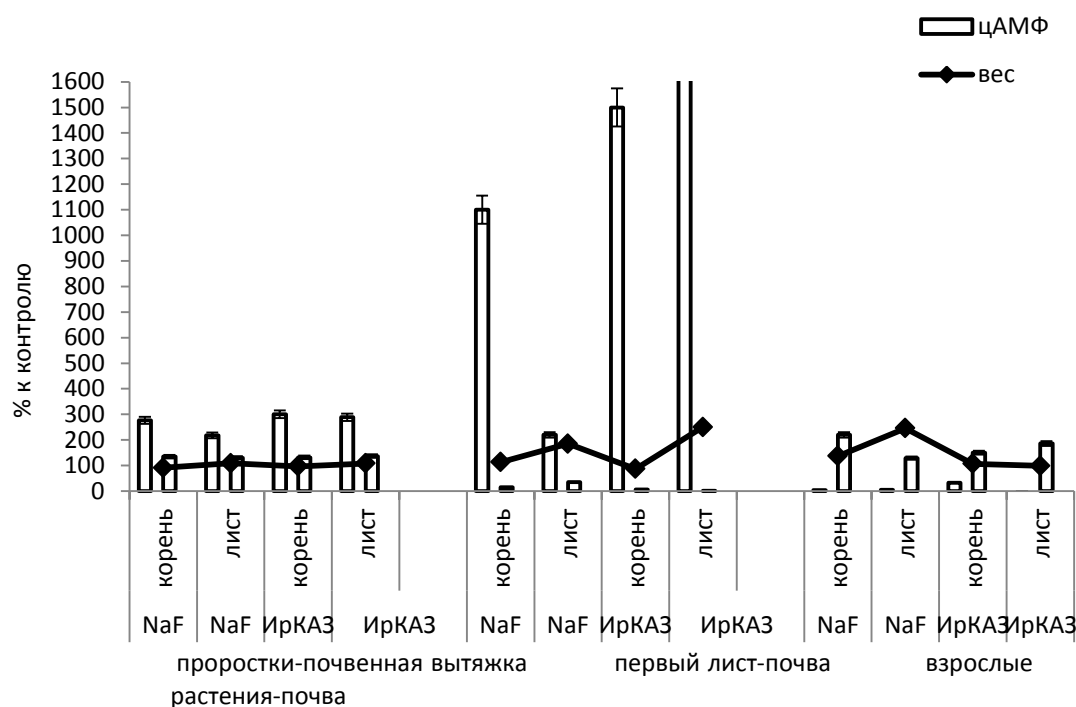


Рис. 2. Изменение веса и активности аденилатциклязной сигнальной системы органов проростков/растений редьки масличной под воздействием повышенной дозы водорастворимого фтора

расход АТФ, в том числе на синтез цАМФ.

Ячмень продемонстрировал в экспериментах с проростками совершенно иную стратегию стрессовых реакций (рис.4). На почвенных вытяжках высокий уровень цАМФ наблюдался только в корнях проростков как в варианте «NaF», так и в варианте «ИРКАЗ». При этом в coleoptilyах этот показатель был значительно ниже 100%, что указывает на блокирование системной реакции АСС. Однако, при этом вес органов проростков сохранялся на уровне, близком к контролю. Такая реакция проростков свидетельствует о развитии ранней неспецифической стрессовой реакции. Можно утверждать, что повышенная активность АСС только в корнях связана с повышенным содержанием в них ионов фтора.

Известно, что ионы фтора поступают в ткани корня пассивно [7], что может явиться причиной активации трансмембранной аденилатциклазы путем стимуляции активности соответствующего ГТФ-связывающего белка. Однако, резкое снижение уровня цАМФ в колеоптилях тех же проростков свидетельствует об ингибировании системной реакции АСС проростков ячменя. Это может быть отражением сложных метаболических событий, протекающих в проростках под воздействием поллютантов. Действительно, ионы фтора могут связывать многие потенциалобразующие ионы [3], прежде всего кальций, что нарушает нормальный электрохимический потенциал клеток корня и

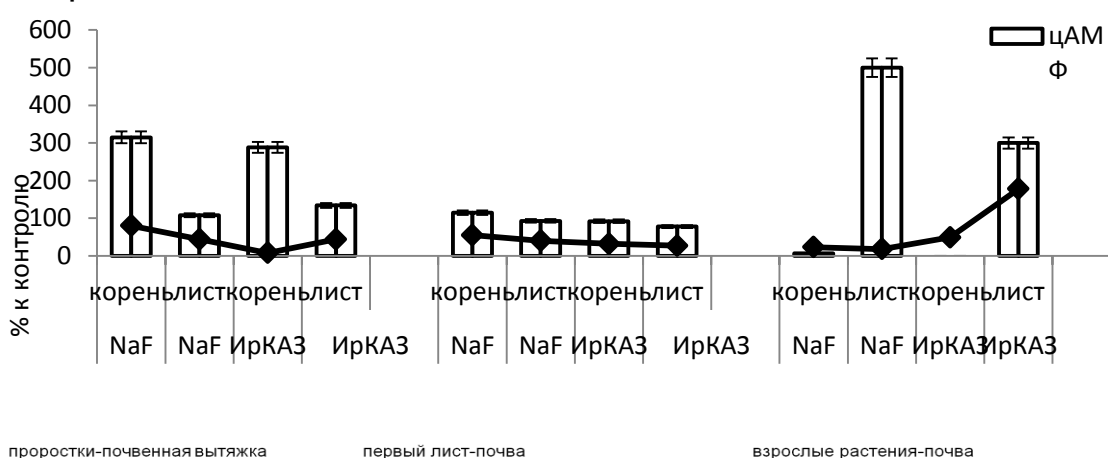


Рис. 3. Изменение веса и активности аденилатциклазной сигнальной системы органов проростков/растений донника под воздействием повышенной дозы водорастворимого фтора

ингибирует развитие системной реакции АСС. В то же время у проростков ячменя, находящихся в почве, была заметна существенная системная активация АСС. Можно предположить, что одним из механизмов этого явления является меньшее поступление в корни растений ионов фтора. Это возможно за счет его частичного удержания в почве [4]. Таким образом, на стадии проростков ячмень демонстрировал сильный стресс на загрязнение субстрата роста ионами фтора. На более поздней стадии роста, а именно, в период сбора урожая активность АСС у растений ячменя почти исчезала, а вес растений в варианте «NaF» был на 30% ниже контроля, тогда как в варианте «ИРКАЗ» превышал контроль всего на 18%. Такое сочетание уровня цАМФ и веса органов растений свидетельствует о

том, что стрессовая нагрузка на ранних стадиях роста не способствовала реализации у взрослых растений необходимых адаптационных механизмов. Это подтверждается и литературными данными о низкой устойчивости ячменя к загрязнению фторидами [3].

Аденилатциклазная сигнальная система растений, как и все остальные сигнальные системы, очень быстро реагирует на изменение условий окружающей среды. Однако механизмы, приводящие к модуляции активности данной системы в ответ на стрессоры биотической и абиотической природы, различны. Если при биотическом стрессе основная роль принадлежит специфическим лиганд-рецепторным взаимодействиям [9], то при абиотическом, в частности, при загрязнении почвы фторидами, наблюдается неспецифическая стрессовая реакция АСС. Она складывается из многих физиологических процессов, косвенно или прямо влияющих на ее активность, и, вероятно, прежде всего, зависит от пула поглощенного водорастворимого фтора. Испытанные виды растений, очевидно, отличаются между собой по способности накапливать фториды [3].

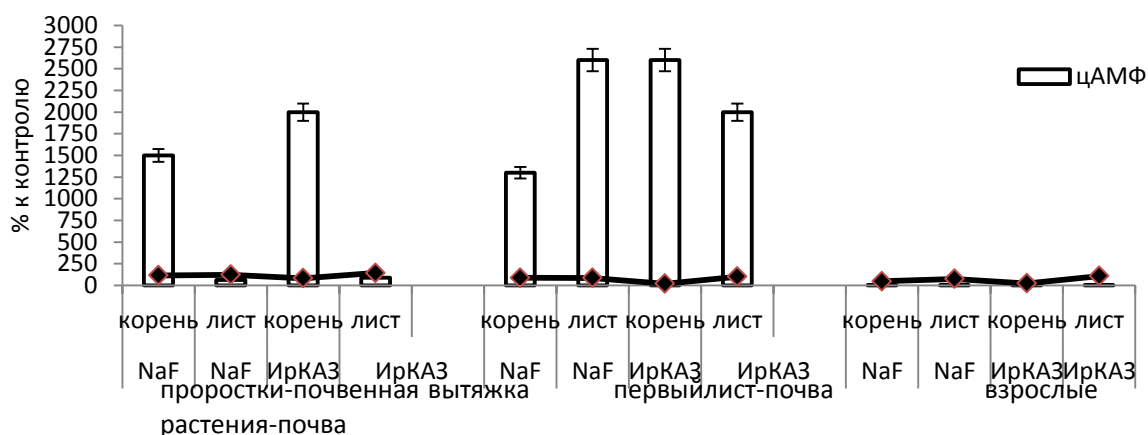


Рис. 4. Изменение веса и активности аденилатциклазной сигнальной системы органов проростков/растений ячменя под воздействием повышенной дозы водорастворимого фтора

Поступая в растение, ионы фтора могут частично утилизироваться: «сбрасываться» в вакуоль, связываться с органическими молекулами, а также образовывать комплексы с некоторыми катионами, например кальцием и магнием [3]. Последнее может оказывать значительное влияние на сигнальную сеть растений, затраги-

вая деятельность, например, кальциевой и липоксигеназной сигнальных систем [6], что ведет за собой разнообразные сдвиги в метаболизме. Если такие события происходят на ранних этапах роста растений, то это, несомненно, в дальнейшем приведет к различным расстройствам роста и развития, поскольку известно, что условия роста в ювенильный период определяют дальнейшее физиологическое состояние растений. Именно такое явление и наблюдалось в наших экспериментах. Если у пшеницы и у редьки масличной на уровне проростков, выращенных на почвенных вытяжках, наблюдалась системная активация АСС, то есть уровень цАМФ возрастал как в корне, так и в стебле, то у донника и ячменя наблюдался сильный перекоп по этому показателю. Уровень цАМФ существенно возрастал только в корне, а развитие системного ответа в листьях было заблокировано. Таким образом, избыток данной сигнальной молекулы в одном органе и резкий недостаток в другом не только нарушал баланс многих сигнальных систем, но и вероятно, в какой-то степени ингибировал включение защитных реакции: как-то синтез стрессовых белков или изменение пула фитогормонов. Таким образом, повышенная нагрузка ионами фтора оборачивается сильнейшим стрессом для донника и ячменя, и, что очень важно, невозможностью развития системного защитного ответа. В дальнейшем это приводит к потерям урожая у взрослых растений.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что для устойчивости растений к повышенным дозам фтора в почвах очень важна системная активация аденилатциклазной сигнальной системы растений уже на самых ранних этапах развития, когда формируется и реализуется адаптивный потенциал последних.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-05-00735

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Криволапова Н.В., Копытчук В.Н., Салаяев Р.К. Возможная роль эндогенного цАМФ картофеля в развитии системного сигнала при патогенезе кольцевой гнили // ДАН. 2004. Т. 394. № 5. С. 715-717.
2. Ломоватская Л.А., Рыкун О.В., Симакова А.А., Соколова Л.Г., Романенко А.С., Помазкина Л.В. Влияние повышенных доз фторидов в почве на активность аденилатциклазной сигнальной

системы растений // Известия ИГУ. Серия «Биология. Экология». 2014. Т. 7. С. 11–19.

3. Полонский В.И., Полонская Д.Е. Фторидное загрязнение почвы и фиторемедиация // Сельскохозяйств. биология. 2013. № 1. С. 3 - 14.

4. Помазкина Л.В., Котова Л.Г., Лубнина Е.В., Зорина С.Ю., Лаврентьева А.С. Устойчивость агроэкосистем к загрязнению фторидами. Иркутск, 2004. С. 225.

5. Семендяева Н. В., Мармулев А. Н., Добротворская Н. И. Методы исследования почв и почвенного покрова. Изд-во НГАУ, 2011. 202 с.

6. Тарчевский И. А. Метаболизм растений при стрессе. Казань, 2001. 448 с.

7. Усманов И.Ю., Рахманкулова З.Ф., Кулагин А.Ю. Экологическая физиология растений: учеб. пособие. М., 2001. 224 с.

8. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. Determination of cAMP in Plant Cells by the Modified Enzyme Immunoassay // Plant Cell Rep. 2011.Vol. 30. P. 125–132.DOI 10.1007/s00299-010-0950-5.

9. Vanderplank J. Host pathogen interaction in plant disease . N.Y., Acad.Press. 1982. 207 p.

REFERENCES

1. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Krivolapova N.V., Kopytchuk V.N., Salyaev R.K. Vozmozhnaya rol' endogennoy tsAMF kartofelya v razvitiy sistemnogo signala pri patogeneze kol'tsevoi gnili // DAN. 2004. Т. 394. № 5. S. 715-717.

2. Lomovatskaya L.A., Rykun O.V., Simakova A.A., Sokolova L.G., Romanenko A.S., Pomazkina L.V. Vliyaniye povyshennykh doz ftoridov v pochve na aktivnost' adenilattsiklaznoy signal'noy sistemy rasteniy // Izvestiya IGU. Seriya «Biologiya. Ekologiya». 2014. Т. 7. S. 11–19.

3. Polonskii V.I., Polonskaya D.E. Ftoridnoye zagryazneniye pochvy i fitoremediatsiya // Sel'skokhoz. biologiya. 2013. № 1. S. 3 -14.

4. Pomazkina L.V., Kotova L.G., Lubnina E.V., Zorina S.Yu., Lavrent'eva A.S. Ustoichivost' agroekosistem k zagryazneniyu ftoridami. Irkutsk, 2004. S. 225.

5. Semendyaeva N. V., Marmulev A. N., Dobrotvorskaya N. I. Metody issledovaniya pochv i pochvennogo pokrova. Izd-vo NGAU, 2011. 202 s.
6. Tarchevskii I. A. Metabolizm rastenii pri stresse. Kazan', 2001. 448 s.
7. Usmanov I.Yu., Rakhmankulova Z.F., Kulagin A.Yu. Ekologicheskaya fiziologiya rastenii: ucheb. posobie. M., 2001. 224 s.
8. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. Determination of cAMP in Plant Cells by the Modified Enzyme Immunoassay // Plant Cell Rep. 2011.Vol. 30. P. 125–132. DOI 10.1007/s00299-010-0950-5.
9. Vanderplank J. Host pathogen interaction in plant disease . N.Y., Acad.Press. 1982. 207 p.

УДК 579.64: 631.46

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ – НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ

М.С.Третьякова¹, Л.А. Беловежец², Ю.А. Маркова¹, Е.М. Глушень³,
Н.Г. Клишевич³, Г.И. Новик³, А.В. Сидоронко³

¹Институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, marina-tretjakova@yandex.ru

²Институт Химии им. А.Е. Фаворского СО РАН,
664033, Россия, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1, lyu-sya@yandex.ru

³Институт микробиологии НАН Белоруси,
220141, Республика Беларусь, г. Минск, ул.Купревича, 2, micro-bio@mbio.bas-net.by

Из ризосферы и эндосферы растений Иркутского региона выделены углеводородоокисляющие микроорганизмы для очистки почв от нефтяных загрязнений. Наиболее активные штаммы нефтедеструкторы охарактеризованы на основании физиолого-биохимических и молекулярно-генетических методов. Установле-

но, что 3 штамма являются наиболее перспективными для биоремедиации нефтезагрязненной территории.

Ключевые слова: биоремедиация, углеводородоокисляющие микроорганизмы, нефтедеградующая активность, идентификация.

Нефть и нефтепродукты являются основными загрязнителями окружающей среды в мире. Нефть, попадая в почву в результате добычи, транспортировки и утечке при аварийных ситуациях приводит к негативным экологическим последствиям, оказывая токсическое действие на живые организмы. В настоящее время перспективным подходом для очистки нефтезагрязненной территории является биоремедиация, основанная на применении активных углеводородоокисляющих микроорганизмов [1-2]. Благодаря наличию у таких микроорганизмов соответствующих ферментных систем, они способны разлагать нефть и нефтепродукты до безопасных соединений. Микроорганизмы-деструкторы известны среди представителей родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Microbacterium* и другие, которые способны усваивать широкий спектр углеводородов и представляют интерес как возможная основа препарата для очистки почв от нефтезагрязнений.

Целью настоящей работы явилось изучение и идентификация видов микроорганизмов, выделенных из ризосферы и эндосферы растений и охарактеризованных как потенциальные нефтедеструкторы.

Из эндосферы и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории Иркутского региона выделены углеводородоокисляющие микроорганизмы. Для выявления наиболее активных штаммов нефтедеструкторов микроорганизмы выращивали в жидкой минеральной среде [3], куда в качестве единственного источника углерода и энергии добавляли нефть в количестве 2 % (по массе). Через 2 месяца культивирования определяли убыль нефти путем экстрагирования ее гравиметрическим методом. В результате эксперимента для дальнейшего исследования были отобраны 6 штаммов, убыль нефти при выращивании которых составляла более 40%.

Для идентификации выбранных штаммов бактерий использовали морфологические, биохимические и молекулярно-генетические

методы. Биохимические свойства изучали по определению оксидазы, каталазы, декарбоксилированию аминокислот (аргинина, лизина и орнитина) с помощью наборов для микробиологических исследований (НИЦФ, Санкт-Петербург). Также проводили определение окисления и ферментации глюкозы (ОФ тест), амилолитической и протеолитической активности [4]. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Физиолого-биохимические свойства штаммов деструкторов

№ штамма	КОН	Окси-си-даза	Ката-лаза	Ли-зин	Ар-гинин	Ор-тин	Ами-ло-лити-ческа-я актив-ность	Про-тео-лити-ческа-я актив-ность	ОФ тест	Выде-ление пиг-мента
90	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
102	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+ Жел-то-зеле-ный
108	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
109	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+ Сине-зеле-ный
112	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
114	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-

Идентификацию с использованием молекулярно-генетических методов проводили путем секвенирования фрагментов гена 16S рРНК. Бактерии выращивали на среде МПА при 26⁰С в течение 18 ч. Далее осуществляли выделение ДНК из клеток бактерий согласно рекомендациям набора *Bacteria DNA Preparation Kit DNA purification*

from bacteria (Jena Bioscience, Германия). Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали универсальные праймеры 8f, 1492 r. Секвенирование проводили в Институте Микробиологии НАН Беларуси г. Минск. На основании проведенных исследований было установлено, что 90,102,109 культуры отнесены к штаммам - *Pseudomonas* sp.,112,114- *Acinetobacter* sp, 108- *Rhodococcus* sp.

Для определения потенциала выбранных культур к деструкции нефти и нефтепродуктов использовали минеральную среду с добавлением агара [5]., куда вносили тетрадекан, дизельное топливо, нефть в концентрациях от 1-10 %. Культивирование осуществляли в течение 10 суток. В результате эксперимента, отмечался активный рост всех исследованных штаммов как на тетрадекане, так и на дизельном топливе. Особенно хороший рост показали три штамма 108, 112, 114. Рост штаммов при добавлении в среду нефти оказался различным. При низких концентрациях нефти (1 – 7,5 %) эти же штаммы показали хороший рост, остальные росли слабо. При концентрации 10 % только 112 и 114 штаммы оказались способны к росту.

Деградацию углеводородных субстратов исследуемыми культурами изучали в жидкой среде при добавлении различных концентрациях нефти (5; 10; 15, 20; и 50%). Инокуляцию проводили из расчета 10 мл посевного материала на 100 мл среды. Культивирование проводили в колбах при 26⁰ С. Через 2 мес. культивирования определяли убыль нефти. Было установлено, что культуры 108, 112 и 114 показали максимальную убыль нефти, которая составила около 35 % при добавлении в среду 5 % нефти. При добавлении 10 % убыль нефти составила до 28 %, при 15% около 22 %, при концентрации 20 % исходное содержание нефти снижалось до 18%, при добавлении в среду 50 % нефти убыль нефти составила около 10%.

Косвенными показателями способности бактерий к деградаци углеводородов нефти служат способность к образованию бисурфактантов, гидрофобные свойства поверхности микробных клеток и эмульгирующая активность. Показано, что биосурфактанты образовывали 2 штамма микроорганизмов рода *Acinetobacter*.

Таким образом, в результате проведенных исследований бактерии, выделенные из ризосферы и эндосферы растений, охаракте-

ризовали по физиолого-биохимическим и молекулярно-генетическим методам. Выяснилось, что наиболее активными и перспективными нефтедеструкторами оказались представители рода *Rhodococcus* и *Acinetobacter*.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Вельков В.В. // Биотехнология. 1995. № 3-4. С. 20-27.
2. Коронелли Т.В. // Прикл.биохимия и микробиология.1996. Т. 32. № 6. С. 579-585.
3. Хабибулина Ф.М., Шубаков А.А., Арчегова И.Б., Романов Г.Г.//Биотехнология .2002.№6. С.57-62
4. Практикум по микробиологии. // Под ред. Нетрусова А.И. М.: Издательский центр «Академия», 2005. С. 478.
5. Cooper D., goldenberg B.g. surface active agents from two *Bacillus* species // Appl. environ. Microbiol. N 2. – P. 224-229.

УДК 581.143.6; 582.475.2; 630*23

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

ПИХТЫ СИБИРСКОЙ *ABIES SIBIRICA* LEDEB

А.В. Третьякова^{1,2}, Е.А. Демина³, Н.И. Рекославская^{1,2}, Р.К. Салаяев^{1,2},
А.С. Столбиков^{1,2}

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033 Россия, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
тел. (3952) 42–46–59, факс (3952) 51–07–54, Anastasiya_chepi@mail.ru

²Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1, тел.: (3952) 24–18–55

³Национальный парк "Тункинский",
671010, Бурятия, Тункинский район, с. Кырен, ул. Ленина, 69
тел./факс 8(30147)41–301, piridoksin@mail.ru

В статье приводятся результаты экспериментов по введению в культуру in vitro растений пихты сибирской и получению каллусов.

*В качестве исходного экспланта использовали вегетативные части взрослых растений пихты. Приводятся условия стерилизации растительного материала, состав питательных сред для культивирования *in vitro* различных типов эксплантов. Используя апикальные почки побегов и питательные среды с различным соотношением регуляторов роста удалось оптимизировать условия роста и развития побега, индукции каллусогенеза в весенне-летний период. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших экспериментах, предполагающих получение морфогенных каллусов пихты сибирской для микроклонального размножения «плюсовых» форм хвойных деревьев для лесовосстановления.*

*Ключевые слова: *Abies sibirica* Ledeb., микроклональное размножение хвойных, культура тканей *in vitro*, каллусная культура.*

Микроклональное размножение *in vitro* позволяет получать растения, генетически идентичные исходному экземпляру и с высоким коэффициентом размножения. Это происходит благодаря свойству растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность. Для этого ткани растений культивируют на питательных средах с добавлением регуляторов роста. Используя различные их концентрации и соотношение можно вызвать разные типы морфогенеза каллусных клеток: формирование побегов, их укоренение, или образование соматических эмбриоидов [4].

Особое значение имеет микроклональное размножение хвойных пород деревьев, имеющих важное экологическое, лесохозяйственное значение. В то же время эти объекты являются одними из наиболее сложных для культивирования *in vitro*. Технология микроклонального размножения разработана для более 40 видов хвойных, среди них разные виды сосны, лиственницы, ель и др. [1; 2; 4]. В основном в этих работах в качестве исходных эксплантов использовали мегагаметофиты, зародыши, семядоли, гипокотиль, что связано с высокой способностью этих структур к морфогенезу. Тем не менее, наибольший интерес представляет использование в качестве первичного экспланта вегетативных частей растений, что позволяет полностью воспроизвести генотип исходного растения.

Целью данной работы явилось введение в культуру *in vitro* растений пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) с использованием в качестве первичных эксплантов вегетативных частей растений и изучение влияния условий культивирования и регуляторов роста на рост и каллусогенез изолированных эксплантов.

Материал получали от растений пихты, произрастающих на территории г. Иркутска и в районе пос. Подкаменная (70 км от г. Иркутска).

Для первичной обработки эксплантов использовали дезинфицирующее средство «Domestos», препарат «Эпин» (ННПП «НЭСТ М», Москва). Использовали апикальные почки, хвою, молодые побеги. Асептически обработанные экспланты помещали в поликарбонатные культивационные сосуды «Мажента» на питательную среду Мурасиге и Скуга (MS) с сахарозой, и среду McCown'a для древесных растений. В питательные среды также вносили тиамин 0,5–10 мг/л; пиридоксин 0,5–2 мг/л; никотиновую кислоту 0,5–5 мг/л; глицин 2 мг/л; миоинозит 100 мг/л; аскорбиновую кислоту 1 мг/л; пептон 500 мг/л. В качестве регуляторов роста – индолилмасляную кислоту 0,6–1 мг/л; индолилуксусную кислоту 0,5–1 мг/л; α -нафтилуксусную кислоту 0,1–1 мг/л; кинетин 0,5 мг/л; абсцизовую кислоту 0,1 мг/л; гиббереллин 0,1–1 мг/л; 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту (2,4-Д) 0,5–2 мг/л; 6-бензиламинопурин (БАП) 0,5 – 5 мг/л и культивировали при +26°C, световом периоде 16 ч и освещенности 4–5 тыс. люкс.

Из использованных типов эксплантов наиболее удачным материалом при введении в культуру *in vitro* были апикальные меристемы (почки): в этом случае реже наблюдали микробное заражение питательной среды и более высокую способность к каллусогенезу. Оптимальной для каллусообразования была среда с концентрацией 2,4-Д и БАП по 0,5 мг/л: происходило развитие гетерогенных каллусов, состоящих из рыхлых и плотных массивов клеток, на которых через 3 недели культивирования начинали расти структуры ярко-зеленого цвета, напоминающие верхушки хвоинок. Стеблевая часть побега разрасталась плотной каллусной тканью красноватой окраски вследствие синтеза антоцианов. Такие каллусы иногда удавалось культивировать до нескольких месяцев.

На среде MS, содержащей 2,4-Д 0,5 мг/л, БАП 5 мг/л, чаще наблюдалось активное развитие побега, увеличение хвоинок по

сравнению с образованием каллусной массы. Объекты имели мелкие размеры и очень яркую окраску под влиянием избытка цитокининов. Впоследствии такие экспланты начинали быстро буреть, наблюдался обширный некроз, что приводило к гибели.

На среде MS с содержанием 2,4-Д 5 мг/л и БАП 0,5 мг/л на эксплантах происходило формирование крупного плотного каллуса красно-бурого цвета, который, разрастаясь, приобретал беловато-зеленую окраску и был способен к длительному культивированию в течение 3 и более месяцев.

Таким образом, были определены оптимальные концентрации регуляторов роста для индукции каллусогенеза, развития побегов из первичного экспланта и получены различные типы каллусов. Задачей дальнейших исследований является получение морфогенных каллусов, способных к формированию соматических эмбрионидов пихты сибирской. Это позволит получать вегетативные клоны «плюсовых» деревьев с целью дальнейшего использования в лесовосстановлении и озеленении.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез / И. Н. Третьякова [и др.] // Хвойные бореал. зоны. – 2012. – Т. 30, № 1–2. – С. 180–186.
2. Саляев Р. К. Получение каллусной культуры клеток кедра сибирского / Р. К. Саляев, Н. И. Рекославская // Лесоведение. – 2009. – №5. – С. 57–62.
3. Lelu-Walter M-A. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis / M-A. Lelu-Walter, M. Bernier-Cardou, K. Klimaszewska // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2008. – V. 92. – P.31–45.
4. Malabadi R. B. Genetic transformation of Conifers: Applications in and Impacts on commercial Forestry / R. B. Malabadi, K. Nataraja // Transgenic plant Journal. – 2007. Т. 1 (2). – P. 289–313.

IV. МЕДИЦИНСКАЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 616.98:579.841.95

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФИЛЬТРАЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТА ФИБРИНА ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

М.В. Антонычева, О.А. Волох, К.И. Холматов, Н.Г. Авдеева,
Н.И. Вахрушина, С.В. Астафьева, А.К. Никифоров

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «МИКРОБ», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46, rusrapi@microbe.ru

*Предложена усовершенствованная технология очистки новой жидкой среды на основе гидролизата фибрина для глубинного культивирования туляремийного микроба. Способ очистки среды, заключается в применении каскадной фильтрации с использованием на первой ступени каскада фильтра патронного глубинного с размером пор 0,5 мкм, на второй – патронного мембранного фильтра с двуслойной мембраной и микронным рейтингом соответственно 0,8 и 0,45 мкм. Использование среды нового состава, приготовленной и очищенной по предложенному методу, позволяет накапливать при глубинном реакторном культивировании жизнеспособную биомассу *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с низкой степенью диссоциации.*

Библиогр. 5 назв.

Ключевые слова: живая туляремийная вакцина; питательная среда; глубинное культивирование; фильтрация; очистка питательной среды.

Эффективным методом специфической профилактики туляремии является вакцинация населения, проживающего на неблагополучных (энзоотичных) по туляремии территориях, а также контин-

гента, подвергающегося риску заражения этой инфекцией во время полевых и лесных работ, обработки меха, лабораторной работы с животными и материалом, подозрительным на инфицирование возбудителем туляремии [5].

Живая туляремийная вакцина была создана в 40-50 гг в СССР [3] и до настоящего времени в технологии ее производства используют плотные и полужидкие среды на основе гидролизата рыбы [2]. Для накопления биомассы штамма продуцента при производстве живой туляремийной вакцины нами предложена новая жидкая среда на основе гидролизата белка крови лошади – фибрина, являющегося отходом производства антирабического иммуноглобулина [4]. Для очистки питательной среды ранее использовали фильтрацию через ткань бельтинг (ФС-7), что обуславливало длительность этого процесса и низкое качество среды (по показателю - прозрачность). Основу загрязняющих среду частиц составляют крупные не гидролизованные комплекс-протеиды крови лошади (гемоглобин, глюкопротеиды, липопротеиды, иммуноглобулины и т.д.), имеющие размеры до 0,5 мкм [1]. Внедренный в технологию приготовления новой среды способ очистки заключается в применении каскадной фильтрации с использованием на первой ступени каскада патронного глубинного фильтра ЭПВг.П–050-Д-250 с размером пор 0,5 мкм, на второй – патронного мембранного фильтра ЭПМ.К-080/045-Д-250М с двуслойной мембраной и микронным рейтингом соответственно 0,8 и 0,45 мкм.

При решении технологической задачи по эффективной очистке питательной среды на основе гидролизата фибрина, кроме способности задерживать балластные частицы, учтено влияние фильтрационного материала на среду (рН, экстракция компонентов фильтра) и способность фильтрационных материалов к адсорбции и абсорбции компонентов среды. Учтены экономические показатели эффективности способа фильтрации – потери количества продукта и производительность (по длительности) технологической операции, возможность повторного использования фильтроэлементов. Определено влияние предложенного метода очистки на качество питательной среды по физико-химическим и биологическим показателям. Применение современных фильтрационных материалов (оборудования) позволяет снизить потери среды с 20% до 1% и су-

ущественно сократить время, затрачиваемое на ее приготовление (на этапе фильтрации на 60%).

Использование среды нового состава, приготовленной и очищенной по предложенному методу, позволяет накапливать при глубинном реакторном культивировании в течение (20 ± 2) ч высокую концентрацию $((35 \pm 0,5)$ млрд м.к. в мл среды) жизнеспособной биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ с низкой степенью диссоциации, что позволяет существенно сократить себестоимость питательной среды и соответственно вакцинного препарата. Количество биомассы микроорганизмов свидетельствует о сбалансированном и полноценном составе питательной среды.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биохимия: Учеб. для вузов, под ред. Е.С. Северина., – М.: ГЭОТАР-МЕД., 2003. 779 с.

2. Колядицкая Л. С., Шмурыгина А. А. Усовершенствование препарата сухой живой туляремийной вакцины // ЖМЭИ. -1957, № 10. – С. 84-89.

3. Олсуфьев И.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии – М.: Медицина, 1975. – 190 с.

4. Пат. 2518282 РФ. МПК С12N1/20. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба / Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Никифоров А.К. - Заяв. № 013129148 приоритет от 25.06.2013; опубл. 10.06.14 // Бюлл. 2014. – №16.

5. Профилактика туляремии. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.1.7.2642-10.

УДК 573.6.083.3 + 573.6.086.8

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ IGE-АНТИТЕЛ

А.Ю. Галкин¹, Ю.В. Горшунов², А.Б. Бесараб²

¹Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт», Украина, 03056, г. Киев, проспект Победы, 37, alexft@mail.ru

²Научно-исследовательский и конструкторско-технологический институт городского хозяйства, Украина, 03035, г. Киев, ул. Урицкого, 35, spirt.81@mail.ru

В рамках данной работы были проведены разработка и характеристика иммуноферментного анализа (ИФА) для определения общих IgE-антител с применением тирамин-биотинового реагента (ТБР). Было показано, что использование модификаций ИФА с авидин-биотиновым усилением сигнала (АБУ) и ТБР существенно расширяют возможности применения анализа в дозах IgE человека ниже 50 МЕ/мл. Для целей клинической диагностики наиболее приемлемым оказался ИФА с АБУ, вместе с тем, в случаях, когда возникает потребность в определении сверхмалых концентраций аналита (сотни пикаграмм), единственным возможным вариантом остается ИФА с ТБР. При использованной концентрации реагентов ИФА динамический диапазон для всех модификаций составил три порядка.

Библиогр. 7 назв.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, тирамин-биотиновый реагент, авидин-биотиновое усиление сигнала, IgE человека.

В литературе описан принципиальный подход к аналитопосредованной амплификации сигнала иммуноферментного анализа (ИФА), основанный на использовании вещества тирамин, который проявляет необходимую в данном случае биологической активностью в присутствии фермента пероксидазы хрена и

соответствующего субстрата (перекись водорода) [1]. В системе ИФА пероксидаза хрена может появляться в составе иммунного комплекса только в случае анализа положительного образца. Таким образом, усиление сигнала происходит только для положительных образцов, то есть речь идет о аналит-зависимом механизме амплификации сигнала. Тирамин-содержащий реагент через остатки тирозина (взаимодействие через фенольную гидроксильную группу) присоединяется к разного рода белкам: антигенам и антителам иммунного комплекса, а также нейтральных белков, адсорбированных в лунках планшета. Фактически специфическое введение большого количества биотин-содержащего реагента в состав иммунного комплекса открывает новые возможности для усиления уровня сигнала в ИФА.

Следует отметить, что данная система имеет определенные ограничения в иммуногистохимических исследованиях из-за вероятности неспецифического усиления сигнала из-за эндогенного биотина, который может присутствовать в исследуемом образце. Для преодоления такой проблемы используют не биотинову метку, а флуоресцентную (например, флуоресцеин), а вместо стрептавидин-пероксидазной комплекса используют антитела к флуоресцентной метке [2]. Наши исследования направлены на разработку классического ИФА для тестирования образцов сывороток (плазмы) крови в лунках планшетов, поэтому предполагаемое содержание эндогенного биотина не будет влиять на уровень сигнала анализа, поэтому целесообразно остановиться на разработке ИФА с использованием тирамин-биотинового реагента (ТБР) и стрептавидин-пероксидазной комплекса.

Целью нашей работы была разработка и характеристика ИФА для определения общих IgE-антител с применением тирамин-биотинового реагента.

Синтез пероксидазных конъюгатов осуществляли периодатным методом по P. Tijssen [3], для чего использовали пероксидазу хрена (Sigma, США). Биотинилирование белков проводили по J. Goding [4]. В работе использовали ТБР из набора ELAST ELISA Amplification System (PerkinElmer, Inc., США).

Для сравнительной оценки различных вариантов ИФА для определения общего IgE человека в различных биологических жид-

костях необходимо провести научную разработку соответствующих модификаций анализа. ИФА, основанный на классическом варианте антительного «сэндвича», в полной мере не может быть использован для сравнительной оценки системы амплификации сигнала, поэтому необходимо разработка двух новых вариантов ИФА: во-первых, модификации антительного «сэндвича» с применением авидин-биотиновой системы усиления сигнала (АБУ); во-вторых, модификацию антительного «сэндвича» с использованием аналитопосредованной фермент-активирующей системы амплификации сигнала.

Конструирование ИФА модификации антительный «сэндвич» (с применением АБУ) проводили на базе предыдущих результатов по разработке ИФА для определения общего IgE человека по принципу классического антительного «сэндвича» [5] и разработки непрямого ИФА для выявления специфических IgE-антител (с АБУ) [6]. На твердой фазе сорбировали МАТ к IgE 164H10, направленные к эпитопу E2, а для конъюгации использовали МАТ 165C12 (эпитоп E1.1) и 166B7 (эпитоп E1.3) (совместное использования конъюгатов МАТ) [7]. Влияние неспецифических взаимодействий в данном случае не мог сказаться на уровне сигнала ИФА, поэтому инкубацию биокомпонентов проводили при наиболее приемлемой для лабораторной службы температуры 37 °С в течение 1 ч. Инкубацию биотинилированных реагентов проводили в фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением твин-20 и казеина (50 мг/мл), pH 7,2-7,4. Аналогичный буферный раствор был использован и при инкубации стрептавидин-пероксидазного реагента.

Сравнительную характеристику различных модификаций ИФА проводили анализируя характер стандартных кривых, а также уровень вариабельности определения стандартных концентраций IgE человека в одной постановке и между постановками, то есть прецизионность анализа на разных уровнях. Вариант ИФА с применением ТБР изучали для двух разных разведений конъюгата тирамина с биотином – 1:1000 и 1:2000. Соответствующие данные, приведенные на рис. 1, свидетельствуют о том, что уровень сигнала в ИФА при одних и тех же концентрациях аналита в модификации антительный «сэндвич» с АБУ в диапазоне доз 5÷50 МЕ/мл в 1,33÷1,48 раза превышает сигнал в ИФА, построенный по принципу классиче-

ского антительного «сэндвича». При применении ТБР уровень сигнала возрастает еще больше – для данного диапазона доз наблюдается усиление в $1,90 \div 4,44$ раза. Важно отметить, что с применением ТБР появляется возможность определения аналита в концентрации менее 5 МЕ/мл. Также отметим, что для разных разведений ТБР верхний предел определения сдвигается до значений $50 \div 100$ МЕ/мл.

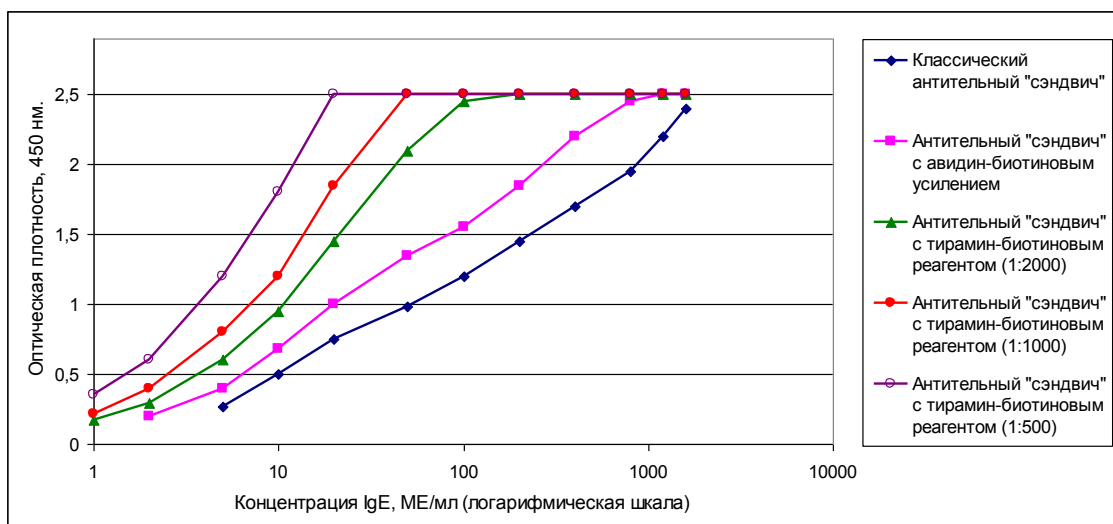


Рис. 1. Сравнительная характеристика стандартных кривых различных модификаций ИФА при определении общего IgE человека

Для полноценной характеристики каждой из разновидностей анализа важен не только динамический диапазон и характер стандартной кривой, но и прецизионность анализа как одна из важных валидационных характеристик любого аналитического метода. Поэтому для каждого из разработанных модификаций ИФА были исследованы уровни вариабельности определения стандартных концентраций IgE человека в одной постановке (Intra-CV) и между постановками (Inter-CV) (рис. 2-3). Оценку вариабельности анализа проводили только для тех точек стандартной кривой, которые не превышают возможность фотометрической детекции сигнала.

Анализируя полученные данные, следует остановиться на следующем. На уровне стандартов IgE человека все исследуемые варианты ИФА демонстрировали допустимые уровни вариабельности исходя из значений коэффициентов вариации (CV) в рамках одной постановки и между различными постановками анализа. Вместе

с тем, диапазон значений концентрации аналита, в котором наблюдалась стабилизация значений CV, был отличный для различных модификаций ИФА. В исследуемом диапазоне значений концентраций аналита наиболее широким стабильным диапазоном (5÷800 МЕ/мл) значений характеризовался ИФА модификации антительный «сэндвич» с АБУ (рис. 2): intra-CV находился в диапазоне от $2,7 \pm 1,3\%$ до $3,0 \pm 1,7\%$), inter-CV – от $2,7 \pm 1,2\%$ до $3,2 \pm 1,5\%$.

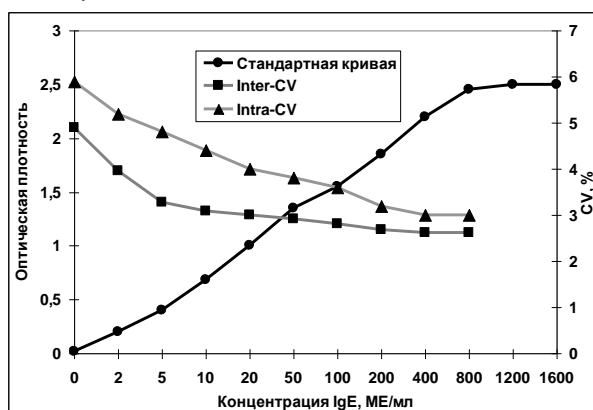


Рис. 2. Стандартная кривая ИФА модификации антительный «сэндвич» с АБУ (—●—), а также уровень вариабельности определения стандартных концентраций IgE в одной постановке (Intra-CV; —■—) и между постановками (Inter-CV; —▲—)

Характер изменения вариабельности анализа от исследуемой концентрации аналита при применении ТБР был совершенно иным. Во-первых, в исследуемом диапазоне значений IgE человека не наблюдалось широкого диапазона доз с явно выраженным стабилизированным уровнем CV – наиболее стабильным диапазоном были концентрации IgE от 1 до 10 МЕ/мл. Во-вторых, для всех вариантов анализа с ТБР наблюдалось заметное снижение уровня вариабельности анализа для образца с концентрацией 0 МЕ/мл, что указывало на большую относительную специфичность данной модификации анализа. Такая ситуация, скорее всего, обусловлена самим принципом усиления сигнала, который носит субстрат зависимый характер. То есть внесение даже избыточного количества ТБР не приводит к росту уровня неспецифического взаимодействия, характерного для классической схемы анализа, когда конъюгат с меткой может в определенной степени взаимодействовать неспецифично, приводя к повышению так называемого фонового сигнала, и, тем самым

уменьшая специфичность анализа и ухудшая его аналитические характеристики.

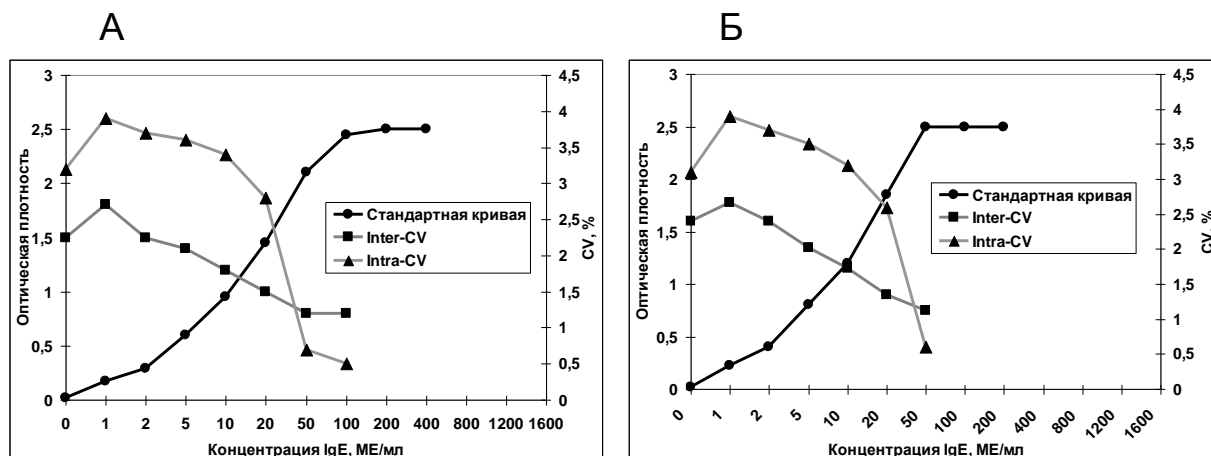


Рис. 3. Стандартная кривая ИФА модификации антительный «сэндвич» с ТБР (А – 1:2000, Б – 1:1000) (—●—), а также уровень вариабельности определения стандартных концентраций IgE в одной постановке (Intra-CV; —■—) и между постановками (Inter-CV; —▲—)

Использование модификаций ИФА с АБУ и ТБР существенно расширяют возможности применения анализа в дозах IgE человека ниже 50 МЕ/мл (в концентрации аналита в диапазоне от 0,48 нг/мл до 120 нг/мл). Для целей клинической диагностики (определение общего IgE человека и специфических IgE к аллергенам различного происхождения) наиболее приемлемым является ИФА с АБУ, вместе с тем, в случаях, когда возникает потребность в определении сверхмалых концентраций аналита (сотни пикаграмм), единственным возможным вариантом остается ИФА с ТБР. Данную модификацию анализа целесообразно применять и в тех случаях, когда особенно важна точность измерения, ведь с использованием ТБР удастся существенно повысить прецизионность анализа. При использованной концентрации биореагентов динамический диапазон всех модификаций ИФА составил три порядка, что является вполне удовлетворительным результатом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. US Patent 5,731,158A. G01N 33/53. Catalyzed reporter deposition / Bobrow M.N., Litt G.J.; E. I. du Pont de Nemours and Company. –

Appl. No. US 08/651,012; Filed: May 20, 1996; Date of Patent: Mar. 24, 1998. – 17 p.

2. Van Gijlswijk R., Zijlmans H., Wiegant J. et al. Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization // J. Histochem. Cytochem. – 1997. – Vol. 45(3). – P. 375.

3. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays // Lab. Techniques in Biochem. and Molecular Biology. – 1985. – 15. – 674 p.

4. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice. – San Diego: Academic press, 1996. – 492 p.

5. Galkin A.Yu., Dugan A.M. Elaboration of immunoenzymatic test-kit for total human IgE assay and investigation of its analytical properties // International Journal of Immunology. – 2013. – Vol. 1, No. 1. – P. 1-6.

6. Галкин А.Ю., Михалчук Н.В., Казмирчук В.Е., Гурженко Ю.Н. Разработка и сравнительная характеристика различных модификаций иммуноферментного анализа для определения специфических IgE-антител // Вестник Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Серия: Биология. – 2014. – №1(66). – С.15-21. (на украинском языке).

7. Галкин А.Ю., Савченко А.А., Никитина Е.И., Дуган А.М. Получение и исследование свойств новых моноклональных антител к IgE человека // Украинский биохимический журнал. – 2013. – Т. 85, № 8. – С. 81-87. (на украинском языке).

УДК 571.27, 577.181.7

**ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ НОВЫХ
ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИМИКРОБНЫХ АГЕНТОВ
НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ**

Д.В. Гришин, Е.Ф. Колесанова, О.Ю. Абакумова, М.В. Покровская,
Н.Н. Соколов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени
В.Н. Ореховича, 119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, 10,
тел.: +7 (499) 246-69-80, факс: +7 (499) 245-08-57, E.mail:
molbiol_ibm@inbox.ru

Излагается разработка подходов для создания антибактериальных средств направленного действия, обладающих способностью селективно ингибировать рост и развитие патогенных микроорганизмов за счёт адресации активного лекарственного начала в микроокружение патогена, т.е. к поверхности грамположительных или грамотрицательных бактерий. Это является актуальной проблемой современной науки, так как находит свое приложение не только при решении фундаментальных научных проблем биологии, но и в прикладных биомедицинских целях, связанных с расширением спектра антибиотических средств направленного действия для лечения и профилактики целого ряда бактериальных инфекций.

Ключевые слова: генетическая и белковая инженерия, антимикробный пептид, твердофазный химический синтез пептидов, дефензин, компоненты клеточной стенки микроорганизмов, амфифильный домен.

Целью нашей работы является проектирование *in silico* и создание гибридных белков, объединяющих в себе свойства дефензинов в качестве основного лекарственного начала и различного рода амфифильных доменов, специфически адресующих дефензины к компонентам клеточной стенки микроорганизмов.

Современное состояние исследований в данной области науки

Дефензины (от англ. *defense* — защита) — катионные пептиды иммунной системы, образующие, наряду с лактоферрицином, кателицидином, гистатином и некоторыми другими иммунными протеинами, целую систему антимикробных пептидов (АМП). Впервые, предположение о наличии в тканях животных и человека естественных антимикробных соединений, которые теперь известны под названием дефензины, было выдвинуто в 1956 году в ставшей уже классической работе Роберта Скарнеса и Денниса Уотсона, которые назвали данные соединения лейкоцинами иммунных клеток [Skarnes R.C. & Watson D.W., 1957]. Позже, в серии работ, Джон Шпицнагель показал, что данные пептиды относятся к одному молекулярному семейству, которое он определил как семейство катионных антимикробных протеинов, и только в 1985 году Майкл Селстед

с соавторами охарактеризовал их и дал современное название — дефензины [Selsted M.E., 2004].

На сегодняшний день дефензины обнаружены практически у всех эукариот начиная от микроскопических водорослей и заканчивая гигантскими млекопитающими, такими как слоны и китообразные. Данные белки играют ключевую роль в обеспечении неспецифической первой линии защиты организмов-представителей различных таксономических групп от разнообразных инфекционных агентов. Они обладают небольшим молекулярным весом 2-6 кДа [Wimley W.C., et. al., 1994]. Основным структурным элементом в молекулах дефензинов – цистеинстабилизированный альфа-бета-мотив (CS $\alpha\beta$), состоящий из трех β -тяжей и одной параллельной им α -спирали, стабилизированных за счет четырех дисульфидных связей [Thomma, B. P., et.al., 2002].

Дефензины представляют эволюционно наиболее консервативную, древнюю и многофункциональную противоифекционную систему, которая эффективно противодействует широкому кругу патогенных бактерий, грибов и даже вирусов у различных многоклеточных организмов. Дефензины рептилий, птиц, животных и человека, по отличиям в структуре, подразделяют на три группы: альфа-дефензины, бета-дефензины и тета-дефензины, при этом, основным местом продукции дефензинов у животных являются поверхность эпителиальных клеток слизистых оболочек, кожных покровов, а также гранулы нейтрофилов и клетки Панета. Экспрессия АМП может быть как конститутивной, так и индуцибельной. Биосинтез дефензинов запускается преимущественно молекулярными структурами, ассоциированными с патогенами инфекционных агентов, а также посредством цитокиновой системы [Grishin D. V. & Sokolov N. N., 2014].

Считается, что антимикробная активность дефензинов связана с их пориновой активностью, основанной на том, что дефензины присоединяются к наружной клеточной мембране микроорганизма и медленно интегрируются в неё, формируя губительные порообразные разрывы в клеточной стенке патогена [Wimley W.C., et. al., 1994]. В некоторых работах развивается идея о том, что дефензины растений и животных могут обладать способностью напрямую взаимодействовать с гликопротеинами вирусов, а также ингибировать

протеазы некоторых вирусов и грибов [Van der Weerden N. L., et. al., 2010; Wilson S.S., et. al., 2013]. Как видно, дефензины эукариот, благодаря своим многочисленным свойствам, представляют собой весьма перспективный объект для фундаментальных и прикладных исследований.

Между тем, основным барьером на пути свободного использования как аутентичных дефензинов, так и их рекомбинантных аналогов в качестве эффективных антибиотических средств является их недостаточная адресность по отношению к бактериальной клетке и весьма низкая амфифильность, препятствующие быстрой адгезии этих молекул на поверхности клеточных стенок бактерий, что, в результате, снижает антимикробный эффект [Selsted M.E., 2004]. Интересно отметить, что науке также известны белки, потенциально способные изменить эту ситуацию к лучшему. Речь касается белков, образующихся в клетках про- и эукариот, принадлежащих к разным таксономическим группам (*Arthropoda*, *Actinopterygii*, *Mammalia*, *Bacillales*). Данные белки обладают способностью специфически связываться с липополисахаридами, липотейхоевыми кислотами, а также с их всевозможными карбогидратными комплексами, в виду чего их можно обобщённо назвать лектиноподобными амфифильными белками. Наибольший интерес представляют отдельные функциональные домены этих белков, непосредственно ответственные за связывание с облигатными компонентами клеточной стенки бактерий муреином, липотейхоевыми кислотами (LTABP - *lipoteichoic acid binding protein*) либо с липополисахаридами (LPSBP - *lipopolysaccharide binding protein*) [Lynch N.J., et.al., 2004; Eckert J.K. et al., 2013].

Полезные свойства данных белков используются нами в рамках принципиально нового и оригинального подхода, не применённого ранее к полипептидам класса дефензинов. Этот подход потенциально способен решить проблему, связанную с низкой селективностью и не высокой амфифильностью антимикробных пептидов и их аналогов. Суть подхода заключается в создании слитных белков, объединяющих две функциональные последовательности: собственно антимикробный пептид и амфифильный домен (LTABD и/или LTABP), потенциально способный избирательно адресовать объединённый с ними антимикробный агент к поверхно-

сти болезнетворных бактерий, за счёт специфического узнавания и аффинного взаимодействия либо с липополисахаридами грамотрицательных бактерий, либо с муреин-липотейхоевым комплексом клеточной стенки грамположительных бактерий. Подобная иммобилизация призвана обеспечить повышение эффективности воздействия дефензинов и их аналогов в микроокружении бактериальной клетки.

В рамках наших исследований разрабатываются гибридные полусинтетические пептиды, составленные из двух элементов: альфа- / тета- дефензина млекопитающих и амфифильного домена белка LTABP или LPSBP.

В ходе выполнения предварительных исследований были получены значимые с биотехнологической и биомедицинской точки зрения результаты:

1) проведены предварительный анализ биоинформационных последовательностей и моделирование необходимых генно-инженерных конструкций с помощью программ для обработки биоинформационных последовательностей: RCSB Protein Data Bank, NCBI Data Bank, DNASIS (Hitachi), RasMol, BLAST, Clone Manager [Grishin D. V. & Sokolov N. N., 2014];

2) созданы и клонированы гибридные генно-инженерные конструкции с разной N/C- пространственной ориентацией генных последовательностей зрелых дефензинов альфа и тета млекопитающих и их белков носителей, призванных улучшить параметры биосинтеза и последующей хроматографической очистки дефензинов;

3) получены первичные штаммы-продуценты *Escherichia coli* гибридных дефензинов. В настоящее время проводится экспериментальная работа по оптимизации экспрессии целевых белковых конструкций;

4) отработаны методы определения цитотоксической активности целого ряда рекомбинантных белков в условиях суспензионной и монослойной культур линий эукариотических клеток [Abakumova O.Yu., et al, 2009];

5) изучена возможность применения анализа ингибирования синтеза ДНК в культурах эукариотических клеток для оценки нали-

чия/отсутствия генотоксической и проапоптической активности лекарственных субстанций [Abakumova O.Yu., et al, 2009];

6) учитывая сложности, возникающие в процессе гетерологической экспрессии некоторых из охарактеризованных пептидов нами разрабатываются также оригинальные методики химического синтеза амфифильных доменов, а также способы их химического лигирования с рекомбинантными дефензинами. Разработаны подходы к синтезу пептидов с так называемыми «трудными» (=склонными к агрегации) последовательностями; в ходе разработки пептидной вакцины против гепатита “С” были предложены уникальные методики синтеза и получены в виде очищенных и охарактеризованных препаратов 14 пептидов длиной от 30 до 40 аминокислотных остатков [Kuz'mina T.I., et al, 2009; Kolesanova E.F., et al, 2013];

7) ведутся работы по синтезу циклических пептидов с помощью метода нативного химического лигирования, получены модифицированные твердофазные носители для синтеза гидразидов пептидов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Abakumova O.Yu., Podobed O.V., Borisova A.A., Sidoruk K.V., Alexandrova S.S., Omelyanuk N.M., Pokrovskaya M.V., Kondakova L.I., and Sokolov N.N. Antitumor activity of L-asparaginase from *Yersinia pseudotuberculosis*. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry (2009), 3(2):198-201.

2. Eckert J.K., Kim Y.J., Kim J.I., Gürtler K., Oh D.Y., Sur S., Lundvall L., Hamann L., van der Ploeg A., Pickkers P., Giamarellos-Bourboulis E., Kubarenko A.V., Weber A.N., Kabesch M., Kumpf O., An H.J., Lee J.O., Schumann R.R. The Crystal Structure of Lipopolysaccharide Binding Protein Reveals the Location of a Frequent Mutation that Impairs Innate Immunity. Immunity (2013), 39(4):647-660.

3. Grishin D. V. & Sokolov N. N. Defensins are natural peptide antibiotics of higher eukaryotes. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry January (2014), 8(1):11-18.

4. Kolesanova E.F., Sanzhakov M.A., Kharybin O.N. Development of the schedule for multiple parallel "difficult" Peptide synthesis on pins. Int J Pept. (2013), 2013:197317.

5. Kuz'mina T.I., Olenina L.V., Sanzhakov M.A., Farafonova T.E., Abramikhina T.V., Dubuisson J., Sobolev B.N., Kolesanova E.F. Antigenicity and B-epitope mapping of hepatitis C virus envelope protein E2. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* (2009), 3(2): 177-182.

6. Lynch N.J., Roscher S., Hartung T., Morath S., Maennel D.N., Kuraya M., Fujita T., Schwaebler W.J. L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. *J. Immunol.* (2004), 172(2):1198–202.

7. Selsted M.E. Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins. *Curr Protein Pept Sci.* (2004), 5(5):365-371.

8. Skarnes R.C., Watson D.W. Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriol Rev.* (1957), 21(4):273–294.

9. Thomma B.P., Cammue B.P., and Thevissen K. Plant defensins. *Planta* (2002), 216: 193–202.

10. Van der Weerden N.L., Hancoc, R.E.W., and Anderson M.A. Permeabilization of Fungal Hyphae by the Plant Defensin NaD1 Occurs through a Cell Wall-dependent Process. *J. Biol. Chem.* (2010), 285:37513–37520.

11. Wilson S.S., Wiens M.E., Smith J.G. Antiviral mechanisms of human defensins. *J Mol Biol.* (2013), 425(24):4965-4980.

12. Wimley W.C., Selsted M.E., White S.H. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* (1994), 3(9), 1362–1373.

УДК 577.114

**FTIR-СПЕКТРОСКОПИЯ: ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД
АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ И СОСТАВА БИОПОЛИМЕРОВ**

И.М.Дейген, Е.В.Кудряшова

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова

119991, Россия, г. Москва, Ленинский горы, 1, i.m.deygen@gmail.com

Разработан высокоэффективный метод анализа структуры биополимеров различной архитектуры на примере ПЭГилированных производных хитозана на базе ИК-спектроскопии (FTIR) и новый подход к определению состава нековалентных комплексов липосом с ПЭГ-хитозаном и гликоль-хитозаном.

Библиогр. 4 назв.

Ключевые слова: ИК-спектроскопия, хитозан, ПЭГилирование, гликоль-хитозан.

На сегодняшний день для биотехнологии и медицины большой интерес представляют собой различные подходы регуляции свойств биополимеров, такие как ПЭГилирование и модификация гликольными группами. Для применения продуктов модификации в биомедицинских целях необходимо располагать информацией о составе структуре конъюгатов. В настоящее время чаще всего применяются методы химического определения степени модификации, например, титрование аминогрупп ТНБС [1], ортофталевым альдегидом [2]. Основными недостатками данных методик являются длительность анализа, высокий вклад побочных реакций, в частности самопроизвольный гидролиз ТНБС, недостаточная доступность аминогрупп полимерах. В данной работе для анализа состава конъюгатов и нековалентных комплексов с ПЭГ- и гликоль-содержащими полимерами предложено использовать метод ИК-спектрокопии Фурье. Данный метод позволяет получать широкий спектр информации об исследуемой системе, отличается методической простотой, хорошей воспроизводимостью, экспрессностью и высокой точностью анализа.

Липиды: кардиолипин (CL) динатриевая соль, дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), раствор в хлороформе: препараты фирмы «Avanti Polar Lipids» (США). *Полимеры.* Хитозан из панцирей крабов (M 15 кДа, 90-120 кДа) со степенью дезацелирования 0.82, препараты фирмы BioChit (Россия); PEG M 5кДа, хитозан-гликоль, монометокси-PEG-*N*-гидроксисукцинимидилсукцинат (mPEG-suc-NHS) (молекулярной массой 5кДа) - все «Sigma-Aldrich» (США). *Прочие соединения:* ледяная уксусная кислота «Lancaster» (США); компоненты буферных растворов фирмы «Реахим» (Россия), диметилсульфоксид (ДМСО), тринитробензолсульфокислота (ТНБС), всё

«Sigma-Aldrich» (США). ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Фурье Tensor 27 «Bruker» (Германия), оснащенного МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, с термостатом фирмы «Huber» (США) по методике [3]. Синтез сополимеров ПЭГ-хитозан проводили по методике [3]. Кратко, раствор хитозана в 0.01М уксусной кислоте обрабатывали 5-20-кратным молярным избытком раствора mPEG-suc-NHS (M 5кДа) в ДМСО. Степень модификации хитозана полиэтиленгликолем определяли по числу свободных аминогрупп в сополимере ПЭГ-хитозан по сравнению с исходным препаратом хитозана [3]. Кратко, в кювету с раствором ТНБС вносили аликвоту сополимера и регистрировали изменение оптического поглощения при 420 нм в течение 60 мин при 22°C.

В представленной работе для определения содержания ПЭГ в ковалентных конъюгатах предложено проводить анализ интенсивности характеристической полосы поглощения С-О-С связи при 1089 см^{-1} в ИК спектре ПЭГ (рисунок 1). Установлено, что интенсивность данной полосы поглощения линейно возрастает с увеличением концентрации ПЭГ в

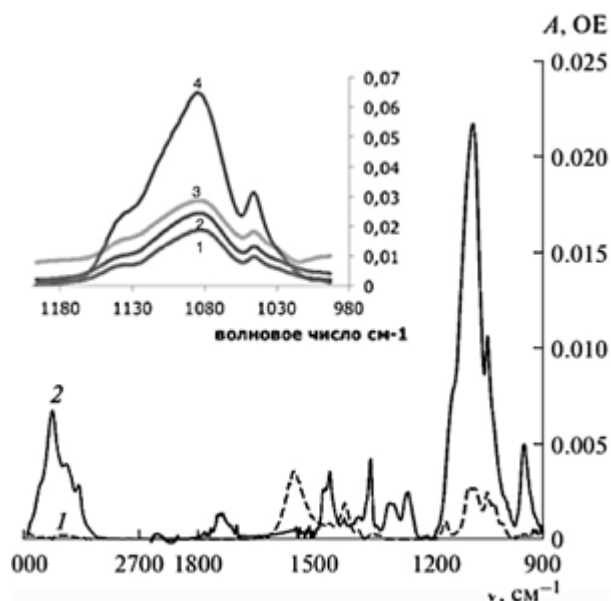


Рис.1. ИК-спектр (1) хитозана ММ 90 кДа (2) ПЭГ-хитозана, степень модификации 25%. На вставке ИК-спектры – ПЭГ-хитозан, степень модификации (1)-(4) от 5% до 25%. Все – в боратном буферном растворе рН 9.2, Т 22С.

системе. Вид калибровочной кривой практически не зависит от рН системы и от молекулярной массы ПЭГ. Разработку метода определения степени ПЭГилирования биополимеров проводили на примере конъюгатов хитозана (ММ 90 и 15 кДа) с ПЭГ (ММ 5кДа). ПЭГ-хитозан – полимер медицинского назначения, перспективный для применения в качестве стабилизирующего компонента для липосомальных лекарственных форм [3], а также медицински значимых ферментов [4]. ПЭГилирование позволяет существенно повысить растворимость хитозана в нейтральных и щелочных средах и получать полимеры с требуемыми свойствами [3-4].–С использованием метода ИК-спектроскопии изучены продукты ПЭГилирования хитозана ММ 15кДа и 90кДа в зависимости от соотношения компонентов (ПЭГ:хитозан) в реакционной смеси. Результаты определения степеней ПЭГилирования хитозана представлены в таблице 1. Для контроля полученных результатов использовали метод титрования свободных аминогрупп хитозана с ТНБС. Степени ПЭГилирования, определенные из анализа интенсивности полосы поглощения С-О-С связи в ИК спектре полимера, находятся в хорошем соответствии с данными химического анализа (таблица 1), что указывает на применимость предлагаемого подхода на основе ИК спектроскопии для анализа состава ПЭГилированных биополимеров. В качестве основных преимуществ разработанного метода следует отметить его экспрессность, неиваизвность и малые объемы пробы, необходимые для анализа в случае применения метода ИК спектроскопии.

Таблица 1. Степени ПЭГилирования хитозана, определенные методом ИК спектроскопии и методом титрования аминогрупп с ТНБС

Хитозан ММ кДа	Основомольный избыток mPEG-suc-NHS	Степень модификации %		Цепей ПЭГ на 1 молекулу хитозана (М/М) (ИК)
		ИК	Титрование ТНБС	
90	2	5±1	4±2	12
90	5	15±1	13±6	36
90	10	25±2	25±4	60
15	3	20±2	19±7	8

Помимо ковалентных конъюгатов, большой интерес представляет возможность определять содержание ПЭГ в нековалентных комплексах. В качестве модельной системы были выбраны комплексы анионных липосом из дипальмитоилфосфатидилхолина, содержащих 20% массовых кардиолипина, с ПЭГ-хитозаном со степенью модификации 25%. Для определения состава образующихся комплексов в зависимости от основомольного избытка полимера (от 1 до 20) в полученных комплексах несвязанный полимер отделяли центрифугированием в условиях осаждения комплекса. Осадок и супернатант исследовали методом ИК спектроскопии. По результатам анализа интенсивности характеристической полосы поглощения ПЭГ при 1089 см^{-1} получена изотерма адсорбции ПЭГ-хитозана на липосомальной мембране. Из анализа изотермы адсорбции в координатах Скетчарда получено значение эффективной константы диссоциации комплекса $K_{\text{dis}} = 5 \cdot 10^{-4}\text{ М}$. состав липосомы - полимер в условиях насыщения был определен как 1:1,2 (осново-моль), что соответствует 4 молекулам полимера на каждую липосому.

Для оптимизации свойств получаемых комплексов важно установить влияние длины цепи заместителя в сополимере с хитозаном на процесс комплексообразования. В качестве полимера с низкомолекулярным заместителем был выбран хитозан-гликоль. В ИК-спектре хитозан-гликоля присутствует две наиболее интенсивные полосы поглощения 1414 см^{-1} и 1551 см^{-1} (рис. 2).

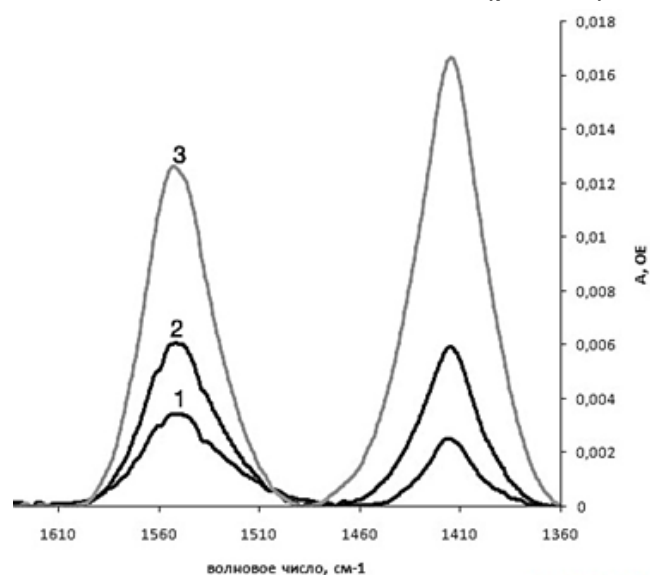


Рис. 2 ИК-спектры раствора хитозан-гликоля (1) 0,16 мг/мл (2) 0,4 мг/мл (3) 0,8 мг/мл в боратном буферном растворе pH 9.2.

Полоса в области 1550 см^{-1} , соответствуют ассиметричным деформационным колебаниям свободных аминогрупп в структуре хитозан-гликоля ($-\text{NH}_3^+$), а полоса поглощения в области 1420 см^{-1} обусловлена деформационными колебаниями $-\text{CH}_2$ и $-\text{OH}$ групп. Интенсивность данных полос в ИК спектре линейно возрастает с увеличением концентрации полимера (рис.2).

Составы комплексов липосом с хитозан-гликолем исследовали методом ИК спектроскопии (табл. 2). Ранее нами было обнаружено [3], что для образования эффективных комплексов производных хитозана с липосомальной мембраной необходим предварительный нагрев липосомальной суспензии до температуры фазового перехода. Для определения оптимальных условий получения комплексов гликоль-сополимеров хитозана с липосомами для каждого из основомольных соотношений липосомы:полимер было получено два вида комплекса: с предварительным нагревом липосомальной мембраной до 38C и без предварительного нагревания. Составы полученных комплексов анализировали по методике, описанной выше, определяя количество хитозан-гликоля по интенсивностям полос поглощения 1551 см^{-1} и 1414 см^{-1} .

Обнаружено, что предварительный нагрев обеспечивает более эффективное связывание полимера с липосомами: при увеличении содержания полимера в исходной системе наблюдается изменение состава комплекса липосомы:полимер от 1:0.35 до 1:1 (основомоль) (табл. 2). В отсутствие нагревания избыток полимера не влияет на эффективность связывания и состав комплекса липосомы:полимер 1:0.35.

Таблица 2. Составы комплексов липосомы:хитозан гликоль (по данным ИК-спектроскопии)

Соотношение липосомы:хитозан-гликоль (основомоль)	Состав комплекса липосомы:хитозан-гликоль Т 25С (основомоль)	Состав комплекса липосомы:хитозан-гликоль с предварительным нагреванием Т 38С (основомоль)
1 : 0,5	1 : 0.35	1 : 0.35
1 : 1	1 : 0.35	1 : 0.5
1 : 2	1 : 0.35	1 : 1

Таким образом, длина заместителя в молекуле хитозана вносит существенный вклад в процесс комплексообразования и влияет на состав комплекса липосом с полимером. Так, комплекс липосом с ПЭГ-хитозаном в насыщении характеризуется большим количеством связанного полимера по сравнению с гликоль-хитозаном, в случае которого часть отрицательных зарядов липосом остается некомпенсирована. Данный эффект может быть важным для регуляции состава и стабильности комплексов за счет варьирования молекулярной архитектуры полимера.

Полученные результаты свидетельствуют о применимости метода ИК-спектроскопии для анализа содержания полимеров в ковалентных конъюгатах и нековалентных комплексах и открывают широкие перспективы разработки новых систем биомедицинского назначения с улучшенными свойствами.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 14-04-00325А, РФФИ 15-13-00063 и программы развития МГУ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Casettari, L. *et al. Prog. Polym. Sci.* 37, 659–685 (2012).
2. Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. & Catignani, G. L. *J. Dairy Sci.* 66, 1219–1227 (1983).
3. Deygen, I. M. & Kudryashova, E. V. *Russ. J. Bioorganic Chem.* 40, 547–557 (2014).
4. Sukhoverkov, K.V. & Kudryashova, E.V. *Biochemistry – Moscow*, 80, 113-119 (2015)

УДК 665.12

ОЦЕНКА ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОНЦЕНТРАТА ПНЖК

С.Д. Жамсаранова, Г.П. Ламажапова, Э.В. Сынгеева

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
670013, Россия, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 42 В, lamazhap@mail.ru

Изучено влияние липосомальной формы полиненасыщенных жирных кислот на дисбаланс прооксидантно-антиоксидантной системы при экспериментальной гиперлипидемии у крыс-самцов линии Вистар. Гиперлипидемию у крыс вызывали с помощью атерогенной диеты. Гиполипидемический эффект сопровождался снижением продуктов перекисного окисления липидов и повышению активности антиоксидантной системы экспериментальных животных.

Библиогр. 11 назв.

Ключевые слова: дислипидемия, окислительный стресс, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, липосомы.

Течение многих патологических процессов и некоторых физиологических состояний сопровождается нарушением окислительно-восстановительного баланса в организме. Для описания дисбаланса в системе «прооксиданты-антиоксиданты» в последние годы стал применяться термин «окислительный стресс», который позволяет описывать состояния, наблюдаемые в клетках, тканях и в организме целом. Проблема изучения клеточно-молекулярных механизмов развития и коррекции окислительного стресса является актуальной, так как затрагивает большое число патологических состояний, в том числе и сопровождающихся нарушениями липидного статуса организма – дислипидемиями (ДЛП). Развитие алиментарной ДЛП характеризуется системными изменениями метаболизма липидов в сыворотке крови, в печени как в органе-мишени и сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [7]. Накопление продуктов ПОЛ приводит к нарушению функций клеточных мембран, преждевременному старению, частым болезням и т.д.

Одной из перспективных форм доставки в клетки биологически активных веществ, являются липосомы, которые с точки зрения биологической совместимости являются идеальными. Они формируются из природных липидов и поэтому нетоксичны, не вызывают нежелательных иммунных реакций и биodeградируемы, то есть разрушаются под действием обычных ферментов, присутствующих в организме [2]. И на сегодняшний день создание транспортных форм

лекарственных препаратов одно из основных направлений повышения их терапевтической эффективности.

Целью настоящего исследования является изучение влияния липосомальной формы концентрата ПНЖК на некоторые показатели окислительного стресса при коррекции экспериментальной дислипидемии у крыс.

Концентрат ПНЖК был получен из жира байкальской нерпы методом комплексообразования с мочевиной [10,11]. Липосомы были получены из фосфолипидов печени байкальской нерпы [2] методом экструзии, в качестве антиоксидантного фактора использовали α -токоферол [3].

Исследования проведены на 40 половозрелых крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 130-150 г, полученных из питомника НИИ Биофизики ФГБОУ ВПО «Ангарская государственная техническая академия». Исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Эвтаназию животных осуществляли путем декапитации под легким эфирным наркозом.

Экспериментальную гиперлипидемию у крыс вызывали согласно МУК 2.3.2.721-98.2.3.2, разработанным Институтом питания РАМН, используя модель атерогенной гиперлипидемии, вызванную введением в обычный рацион: 3-5% холестерина (BioChemica, Arplichem), 0,3% 6-метилтиоурацила, 1% холиевой кислоты и 5% свиного сала – в течение 21 дня.

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы (по 10 особей в группе):

I группа - интактная (животные получали стандартный корм и воду); II группа – контрольная (животные находились на атерогенной диете в течение 21 дня); III группа - опытная 1 (животные после атерогенной диеты, получали в течение 14 дней перорально липосомальную суспензию с жиром байкальской нерпы в дозе 20 мг/кг массы тела); IV группа – опытная 2 (животные после атерогенной диеты, получали в течение 14 дней перорально липосомальную суспензию с концентратом ПНЖК в дозе 20 мг/кг массы тела).

Антиоксидантный потенциал организма оценивали по степени ингибирования образования продуктов перекисного окисления ли-

пидов – МДА в печени и сыворотке крови, по активности глутатионредуктазы (GR), количеству восстановленного глутатиона (GSH) и суммарного содержания антиоксидантов (ССА) в сыворотке крови.

Концентрацию МДА в печени и в сыворотке крови определяли методом, в основе которого лежит свойство МДА реагировать с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). [4].

Определение активности глутатионредуктазы основано на изменении скорости окисления NADPH, которая регистрируется спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм [9].

Определение количества восстановленного глутатиона основано на взаимодействии GSH с ДТНБК (5,5'-дитио-бис-2-нитробензойной кислотой) с образованием окрашенного в желтый цвет аниона 2-нитро-5-тиобензоата. Увеличение концентрации желтого аниона в ходе данной реакции регистрировали спектрофотометрическим методом при длине волны 412 нм [8].

Определение суммарного содержания антиоксидантов проводилось на проточно-инжекторной системе «Цвет Яуза-01-АА» с плунжерным насосом. Подготовка проб проводилась согласно «Методике выполнения измерений суммарного содержания жирорастворимых антиоксидантов в пищевых продуктах амперометрическим методом». В качестве стандарта использовалась галловая кислота.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0.

Алиментарная ДЛП сопровождалась усилением активности процессов ПОЛ в сыворотке крови и печени крыс, о чем свидетельствовало увеличение содержания продуктов окисления липидов. Результаты представлены в таблице 1.

Как следует из таблицы 1 уровень МДА в сыворотке крови контрольной группы животных по сравнению с интактной повысился на 40%, МДА в печени - на 22,8%. При получении лабораторными животными в течение 14 дней перорально липосомальной суспензии с жиром нерпы и липосом с концентратом ПНЖК (введением добавки через зонд) уровень МДА в сыворотке крови животных опытной группы 1 понизился на 12,5%, а в опытной группе 2 - на 15,5% по сравнению с контрольной. Уровень МДА печени крыс в опытной

группе 1 снизился на 11,3%, в опытной группы 2 снизился на 14,3% по сравнению с контролем.

Таблица 1. Показатель уровня малонового диальдегида в сыворотке крови и в печени крыс после введения липосомальной суспензии с жиром байкальской нерпы и липосомальной суспензии с концентратом ПНЖК, полученного из жира нерпы (n=10)

	Показатель	Интактная	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
1	МДА сыворотки крови мкмоль/л	19,9±0,72	32,7±1,27*1	28,6±1,56*2	27,6±1,56*2
2	МДА печени мкмоль/л	12,9±0,14	16,7±0,87*1	14,8±0,94*2	14,3±0,19*2

Примечание: *1 - достоверное отклонение значения по сравнению с интактом ($p \leq 0,05$), *2 - достоверное отклонение значения по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Таблица 2. Активность глутатионредуктазы, содержание восстановленного глутатиона и суммарного содержания антиоксидантов в сыворотке крови крыс после введения липосомальной суспензии с жиром байкальской нерпы и липосомальной суспензии с концентратом ПНЖК, полученного из жира нерпы (n=10)

	Показатель	Интактная	Контрольная	Опытная 1	Опытная 2
1	Глутатионредуктаза нмоль/в мин г Hb	5,7±0,24	2,9±0,11*1	3,2±0,17*2	3,8±0,19*2
2	Восстановленный глутатион нмоль/г Hb	9,7±0,56	5,2±0,37*1	6,8±0,49*2	7,6±0,17*2
3	Суммарное содержание антиоксидантов (мг/л)	6,3±0,32	3,8±0,24*1	4,4±0,28*2	5,2±0,17*2

Примечание: *1 - достоверное отклонение значения по сравнению с интактом ($p \leq 0,05$), *2 - достоверное отклонение значения по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

На основании полученных результатов следует, что при развитии экспериментальной ДЛП у животных развивались окислитель-

ные процессы, о чем свидетельствовали показатели уровня МДА в сыворотке крови и печени. Введение липосомальной формы концентрата ПНЖК животным на фоне ДЛП оказывало ингибирующее влияние на пероксидацию липидов, что характеризовалось уменьшением содержания МДА. Понижение уровня МДА в тканях животных после введения ПНЖК объясняется, по-видимому, активацией антиоксидантной системы организма. Результаты представлены в таблице 2.

Активность защитных механизмов при окислительном стрессе связана как с антиоксидантными ферментами, так и с низкомолекулярными компонентами клеток. Восстановленный глутатион является коферментом ряда ферментов, активность которых основана на изменении редокс-потенциала глутатиона [6]. Глутатион – главный восстановитель структурных компонентов клетки, его концентрация выше, чем большинства органических соединений с АОА. Глутатионредуктаза – фермент, участвующий в регенерации глутатиона.

Как видно из таблицы 2, у животных контрольной группы, находящейся на атерогенной диете, активность глутатионредуктазы снижалась на 49%, чем в интактной группе. Соответственно, на 46% снижалось содержание восстановленного глутатиона в контрольной группе по сравнению с интактной. Суммарное содержание антиоксидантов снизилось на 39,6% в контроле по сравнению с показателем в интактной группе.

При введении липосомальной добавки с жиром байкальской нерпы (опытная группа 1) активность глутатионредуктазы повысилась на 9,4%, а в опытной группе 2 (липосомы с концентратом ПНЖК) активность повысилась на 23,6% по сравнению с контролем. Содержание восстановленного глутатиона в опытной группе 1 повысилось на 23,5%, а в опытной группе 2 - на 31,5% по сравнению с контролем. ССА в опытной группе 1 повысилось на 13,6%, а в опытной группы 2 - на 26,9% по сравнению с таковым в контроле.

При развитии окислительного стресса, вызванного атерогенной диетой, у животных наблюдался редокс-дисбаланс, сопровождающийся высокой интенсивностью процессов ПОЛ и истощением антиоксидантной системы (АОС). Поэтому при выборе средства для восстановления АОС у крыс в условиях окислительного стресса липосомальная суспензия с концентратом ПНЖК может быть реко-

мендована как средство природного происхождения с выраженным антиоксидантным эффектом. Также из полученных результатов следует, что в комплексной терапии заболеваний со свободнорадикальной паталогией могут быть эффективны липосомальные формы лекарственных средств.

Использование биологически активных субстанций из морских гидробионтов, способствовало ингибированию процессов окислительного стресса, которые развивались при экспериментальной ДЛП. Выраженный гиполипидемический эффект сопровождался снижением продуктов ПОЛ, на что указывают данные о содержании МДА в сыворотке крови и печени экспериментальных животных, а также повышении содержания и активности компонентов АОС.

Как указано выше, снижение параметров окислительного стресса при введении липосомальной формы ПНЖК, по-видимому, связано с радикал-перехватывающей активностью ω -3 кислот, ингибированием процессов ПОЛ, восстановлением функциональной целостности мембран, с увеличением содержания восстановленного глутатиона, как основного низкомолекулярного компонента АОС клетки и повышением активности антиоксидантных ферментов [5].

Полученные результаты указывают на перспективность использования антиоксидантных свойств концентрата ПНЖК при разработке биологически активных добавок, лекарственных средств и продуктов функционального питания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Барсуков Л.И. Липосомы // Соросовский образовательный журнал. 1998. - №10. - С.2-8.
2. Патент РФ на изобретение № 2308940. Способ получения липосом, обладающих иммунокорректирующим и гепатопротекторным действием / Ламажапова Г.П., Жамсаранова С.Д., Цыренжапов А.В., Николаев С.М. Оpubл. 16 мая 2006 г.
3. Сорокоумова Г.М. // Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физико-химических свойств липидных дисперсий в воде // Г.М. Сорокоумова, А.А. Селищева, А.П. Каплун М.// МИТХТ, 2000.

4. Стальная И.Д. // Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича – М., 1977. – С. 506-508.

5. Кравченко Л.В, Аксенов И.В., Авреньева Л.И., Бекетова Н.А., Трусов Н.В., Гусева Г.В. Влияние полиненасыщенных жирных кислот ω -3 на некоторые показатели антиоксидантного потенциала крыс // Вопросы питания. – 2013. - № 2.- С.4-9.

6. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона 1. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомедицинская химия. – 2009. – Т.55, Вып.3. – С.255-277.

7. Янькова В.И., Кнышова В.В., Ланкин В.З. Механизмы коррекции окислительного стресса антиоксидантами из морских гидробионтов при алиментарных дислипидемиях// Бюллетень СО РАМН. 2010. – Т.30. - № 1. - С.64-69.

8. Beutler, E. (1975). Reduced glutathione (GSH) In: Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods (Ed. E. Beutler). Grune and Stratton, New York.

9. Glatzle, D., Vuilleumier, J. P., Weber, F., and K. Decker (1974). Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of riboflavin status in humans. *Experientia* 30, 665-667.

10. Hayes, D. G., Bengtsson, J.M. Van Alstine and F.Setterwall, 1998. Urea complication for the rapid, ecologically responsible fractionation off fatty acids from seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75: 1403-1409.

11. Wanasundara, U.N. and F. Shahidi, 1999. Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of blubber oil by urea complication: optimization of reaction conditions. *Food Chemistry*, 65(1): 41-49.

УДК 615.371.012.6.07

РАЗРАБОТКА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ПОЛИОВИРУСНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ СЭБИНА

А.П. Иванов¹, Т.Д. Клеблеева¹, О.Е. Иванова^{1,2}, Л.В. Гмыль¹,
Е.Г. Ипатова¹, Ю.Х. Хапчаев¹, М.Ф. Ворович¹, А.А. Ишмухаметов¹

¹ ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова»

142782, Россия, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, Тел.: +7 (495) 841-90-02; факс: +7(495) 841-93-21; sue_polio@chumakovs.ru

² ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, Россия, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита Тел.: +7 (495) 841-90-07; факс: +7(495) 841-93-30; institute@poliomyelit.ru

Представлены результаты разработки экспериментальных серий инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина (С-ИПВ) с помощью общепринятых современных технологий.

Сравнительный анализ иммуногенности экспериментальной С-ИПВ и коммерческой ИПВ, приготовленной из «диких» штаммов полиовируса (ИМОВАКС ПОЛИО, Санофи Пастер С.А., Франция), на нескольких моделях лабораторных животных показал их идентичность в отношении штаммов Сэбина. Разработан и защищён патентом оригинальный метод количественного определения D-антигена для составления формуляции вакцины, отработаны методы контроля вакцины по всем параметрам согласно требованиям ВОЗ и Европейской Фармакопеи. Таким образом, на экспериментальном уровне показано, что С-ИПВ не уступает по основным характеристикам коммерческой ИПВ.

Библиография: 11 источников.

Ключевые слова: полиовирусные вакцины, С-ИПВ, D-антиген, иммуногенность.

Заключительный этап программы Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) по глобальному искоренению полиомиелита предусматривает изменения в стратегии вакцинации: прекращение иммунизации с помощью оральной полиовирусной вакцины из аттенуированных штаммов Сэбина (ОПВ) и разработку более безопасных процессов изготовления инактивированных полиовирусных вакцин (ИПВ) и приемлемых стратегий их использования [8]. Из-

вестные недостатки ОПВ (в течение многих десятилетий «вакцины выбора» для достижения целей программы ВОЗ) - возникновение случаев вакциноассоциированного полиомиелита и возможность формирования вакцинородственных штаммов с повышенной нейровирулентностью и способностью к трансмиссии, делают неприемлемым её использование для рутинной иммунизации на заключительном этапе выполнения программы. Новый Стратегический план ВОЗ по искоренению полиомиелита предусматривает повсеместное внедрение хотя бы одной дозы ИПВ, в последующем ИПВ будет основным средством профилактики полиомиелита [8].

В России ИПВ не производится, импортируемые ИПВ из диких» штаммов, дороги (безопасное производство вакцины требует соблюдения условий контейнента, что влияет на стоимость конечного продукта). Производство ИПВ на основе штаммов Сэбина безопаснее и значительно дешевле. В данном сообщении приведены результаты первой разработки российской С-ИПВ на современном технологическом уровне. Данный препарат является одной из перспективных вакцин для российского Национального календаря профилактических прививок.

Вирусы: посевные вирусы - аттенуированные штаммы Сэбина вируса полиомиелита типа 1, 2 и 3: тип 1 – LSc 2 ab, тип 2 – P712 Ch 2 ab, тип 3 – Leon 12a₁b, используемые в производстве ОПВ на ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова».

Культура клеток: перевиваемая культура клеток Vero получена из рабочего банка клеток (РБК-Vero) ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова».

Вирусы выращивали посредством роллерного культивирования (адекватный способ для экспериментального уровня) по стандартной методике [7]. Экспериментальные серии С-ИПВ готовили по общепринятой методике, представленной Bakker с соавторами [10], с собственными модификациями. Краткое описание: вирусодержащая культуральная жидкость (каждого из 3-х типов) – осветление центрифугированием при ~ 10 000 g - концентрирование (~ 100-кратное) на концентрате типа VIVAFLOW 200 – гель-фильтрация концентрата (Sephарозе™ 6 Fast Flow) – ионообменная хроматография элюата (DEAE Sepharose Fast Flow) – инактивация формалином (0,025 %) в течение 12 дней при +37° С - добавление ингибитора формалина и

стабилизатора – сведение 3-х типов в определённой формуляции готовой формы вакцины - хранение при +4° С – контроль вакцины.

Содержание D-антигена определяли по собственной методике на основе непрямого варианта иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием специфических антител класса Y (IgY) яичных желтков куриц, иммунизированных «дикими» штаммами полиовируса (тип 1 - Mahoney, тип 2 - MEF-1, тип 3 – Saukett) [1, 2]. Количественное определение D-антигена в экспериментальных сериях С-ИПВ проводили параллельно с международным стандартом D-антигена (IS 12/104), полученным из NIBSC (Великобритания) [5].

Определение иммуногенности (параллельно с коммерческой ИПВ, приготовленной из «диких» штаммов полиовируса, ИМОВАКС ПОЛИО, Санофи Пастер С.А., Франция) проводили на мышах CD-1, морских свинках и зелёных мартышках по общепринятым методикам, принятым для соответствующих моделей животных [3, 4].

Определение вируснейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных животных проводили в реакции нейтрализации (НТ) согласно методике ВОЗ [11]. Параллельно НТ (функциональный тест) определяли специфические антитела в нефункциональных тестах: специально разработанных вариантах ИФА - вариант, «симулирующий» НТ, и вариант для определения вирусспецифических IgG [6].

Остальные основные показатели (общий белок, остаточная клеточная ДНК, бактериальные эндотоксины, реактогенность, остаточный формальдегид и т.д.) определяли согласно рекомендациям ВОЗ [9].

Основные нефункциональные показатели экспериментальных серий С-ИПВ соответствовали требованиям ВОЗ и Европейской Фармакопеи: общий белок (по Лоури) - < 20 мкг/мл; остаточная клеточная ДНК - < 20 нг/мл; остаточный формальдегид - < 200 мкг/мл; бактериальные эндотоксины (ЛАЛ-тест) - < 10 МЕ/мл.

В Таблицах 1 и 2 представлены результаты оценки иммуногенности экспериментальной серии С-ИПВ и коммерческой ИПВ на моделях мышей CD-1 и зелёных мартышек.

Испытание иммуногенности экспериментальных серий С-ИПВ на морских свинках параллельно с коммерческой ИПВ показало сопоставимые индексы иммуногенности по отношению к штаммам Сэбина (> 2).

Таблица 1. Иммуногенность экспериментальной серии С-ИПВ в сравнении с коммерческой ИПВ на модели мышей CD-1: средние титры нейтрализующих антител (НТ) и IgG (ИФА) против штаммов Сэбина

С-ИПВ	Коммерческая ИПВ	
	НТ/ИФА	НТ/ИФА
Тип 1	1:438 / 1:17 920	1:537 / 1:25 600
Тип 2	1:88 / 1:11 520	1:80 / 1:12 800
Тип 3	1:68 / 1:11 520	1:86 / 1:12 800

Таблица 2. Иммуногенность экспериментальной серии С-ИПВ в сравнении с коммерческой ИПВ на модели зелёных мартышек (*S. aethiops*): средние титры нейтрализующих антител (НТ) против штаммов Сэбина

С-ИПВ	Коммерческая ИПВ	
	НТ	НТ
Тип 1	1:686	1:526
Тип 2	1:314	1:712
Тип 3	1:126	1:389

Таким образом, данная технология изготовления С-ИПВ (на экспериментальном уровне) обеспечивает качество вакцины, отвечающие требованиям ВОЗ и Европейской Фармакопеи как по основным физическим, так и по функциональным (иммуногенность) показателям.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Иванов А.П., Козлов В.Г., Иванова О.Е., Киктенко А.В. – Способ количественного определения D-антигена полиовирусов 1-3 типов. Патент на изобретение № 2535058 от 14 декабря 2012 г.

2. Иванов А.П., Козлов В.Г., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е., Киктенко А.В. – Система иммуноферментного анализа на основе специфических антител класса γ (Ig γ) из яичных желтков для количественного определения D-антигена в инактивированных полиовирусных вакцинах. *Вопр. вирусол.*, 2014, том 59, № 6, 39-42.
3. Alexander P. Ivanov, Eugenia M. Dragunsky, Konstantin M. Chumakov. – 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances systemic and mucosal immune responses to inactivated poliovirus vaccine in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 2006, 193, 598-600.
4. B. Simizu, S. Abe, H. Yamamoto et al. – Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains. *Biologicals*, June 2006, vol. 34, issue 2, 151-154.
5. Expert committee on biological standardization, Geneva, 21 to 25 October 2013.
6. Ivanov A.P., Dragunsky E.M., Ivanova O.E. et al. – Poliovirus binding-inhibition ELISA for evaluation of immune response to oral poliovirus vaccine. *Hum. Vaccines*, 2005; 1: 102-105.
7. Jiang Shu de, David Pye and John CV. Cox – Inactivation of poliovirus with β -propiolactone. *Journal of Biological Standardization*, 1986, 14, 103-109.
8. Polio Eradication and Endgame Strategic Plan (2013-2018). Available at: <http://www.polioeradication.org/ResourceLibrary/Strategyandwork.aspx>.
9. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccine (inactivated). Expert committee on biological standardization. Geneva, 13 to 17 October 2014.
10. Wilfried A.M. Bakker, Yvonne E. Thomassen, Aart G. van't Oever et al. – Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine*, 2011, 29, 7188-7196.
11. World Health Organization (WHO). Manual for the virological investigation of polio [WHO/EPI/GEN97.01]. Geneva: WHO; 1997.

УДК 57.085.23, 57.089.67

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИЛАКТИДНЫХ МАТРИЦ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ХРЯЩА

П.В. Копелев¹, С.А. Александрова^{1,2}, П.О. Никонов², Ю.А. Нащекина^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29,
раха94@bk.ru

²ФГБУН Институт цитологии РАН,
194064, Россия, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4 alekssvet2205@gmail.com

В данном исследовании был проведен сравнительный анализ разных вариантов предобработки полилактидных матриц для последующего заселения и культивирования хондроцитов. Наличие жизнеспособных клеток оценивали с помощью прижизненной микроскопии и колориметрическим методом с использованием МТТ. Наиболее оптимальными условиями культивирования хондроцитов кролика на полилактидных матрицах является предобработка их ростовой средой и нанесение клеток в составе коллагенового геля. При этом большинство клеток жизнеспособны и находятся в составе геля, обволакивающего матрицу.

Библиогр. 9 назв.

Ключевые слова: полилактидные матрицы, хондроциты, коллагеновый гель, тканевая инженерия.

Регенерация хряща затруднена из-за низкого содержания клеток и отсутствия кровоснабжения. Клеточные технологии восстановления хряща (трансплантация аутологичного хряща и аутологичных хондробластов), используемые в клинической практике, имеют ряд ограничений, связанных с дополнительной травматизацией пациента и проблемами взаимодействия ткани пациента и трансплантата [2]. В настоящее время активно ведутся доклинические и клинические испытания эквивалентов хрящевой ткани на основе

различных типов клеток и матриц [8]. Было предложено использовать для восстановления суставов не только клетки хряща, но также мононуклеары костного мозга, мезенхимные стромальные клетки костного мозга, синовиальной оболочки, эндотелиальные клетки-предшественники и др. [4, 5]. В качестве матриц апробируются поликапролактон, полигликолевая кислота, альгинат, гиалуроновая кислота, коллаген, хитозан и др. [6].

Одним из перспективных для тканевой инженерии материалов является биodeградируемый полимер на основе молочной кислоты – поли(L,L-лактид) [3]. Его физико-химические свойства позволяют формировать изделия с различной трехмерной структурой и определенными механическими характеристиками. Однако, являясь синтетическим полимером, он обладает низкой биосовместимостью, поэтому требуются модификации для улучшения взаимодействия с ним клеток. Модификаторами могут быть белки внеклеточного матрикса, такие как коллаген I типа и фибрин, а также белки, присутствующие в сыворотке крови [9].

Целью работы являлась разработка условий посева и культивирования хондроцитов кролика на полилактидных матрицах, модифицированных белками внеклеточного матрикса.

Выделение и культивирование хондроцитов кролика. Хондроциты выделяли из фрагментов суставного хряща новорожденного кролика. Ткань промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), измельчали с помощью скальпеля на мелкие фрагменты, инкубировали в смеси трипсина и ЭДТА (Gibco, США), разведенной на ФСБ (1:4) 1 ч при 37°C с покачиванием. Далее избавлялись от дебриса фильтрованием через нейлоновую сетку, клеточную суспензию центрифугировали 5 мин при 300 g, осадок ресуспендировали в ростовой среде α MEM (Sigma, США) с 20% сыворотки эмбрионов коров (СЭК) (HyClone, США) и высевали на чашки Петри. Пересев проводили по достижении клетками субконфлуентного монослоя. Культивировали хондроциты в ростовой среде α MEM с 10% СЭК в инкубаторе с 5 % CO₂ при температуре 37°C. В экспериментах использовали клетки 2-8 пассажа.

Приготовление полилактидных матриц. Матрицы для культивирования клеток изготавливали методом выщелачивания [1]. Во фторопластовую форму помещали 1 г NaCl с диаметром кристаллов

250 мкм. Поли(L,L-лактид) с характеристической вязкостью $\eta=4.0$ дл/г (Sigma, США) растворяли в метилен хлориде («Реактив», РФ). 0.6 мл раствора поли(L,L-лактида) наливали в форму с солью и оставляли сушиться на воздухе в течение 2 сут. После испарения растворителя матрицу выдерживали в дистиллированной воде до полного растворения соли. Приготовленные матрицы стерилизовали в растворе 70%-ного этанола, промывали раствором ФСБ и облучали УФ-светом.

Способы заселения полилактидных матриц клетками. Было протестировано 4 способа нанесения клеток на матрицы: 1) нанесение клеточной суспензии с высокой плотностью (200 тыс. клеток в 200 мкл среды) на сухую матрицу; 2) нанесение клеточной суспензии с высокой плотностью на предварительно замоченную в ростовой среде матрицу; 3) нанесение клеток в составе коллагенового геля (200 тыс. клеток в 200 мкл геля) на сухую матрицу; 4) нанесение клеток в составе коллагенового геля на предварительно замоченную матрицу.

Нанесение клеток на матрицы проводили в 24-луночных планшетах. Для приготовления геля в концентрации 1 г/мл использовали коллаген I типа, (предоставленный Л. В. Кухаревой, Институт цитологии РАН), 0,34N NaOH, 10x среду 199 (Биолот, Россия). Необходимое количество полилактидных матриц замачивали в ростовой среде на 3 сут. На сухую или подготовленную матрицу помещали 0,2 мл среды с необходимым количеством клеток либо с 0,2 мл геля с клетками. Оставляли на 1 ч для адгезии клеток с матрицей, затем в лунки добавляли по 0,5 мл ростовой среды. Культивировали в течение 3 сут в стандартных условиях.

Оценка заселения полилактидных матриц клетками. Количество клеток, прикрепившихся к полилактидной матрице, оценивали с помощью колориметрического метода с использованием МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (Sigma, USA). Этот метод основан на способности митохондриальных ферментов живых клеток восстанавливать желтый МТТ-субстрат до темно-синего формазана [7]. Число жизнеспособных клеток прямо пропорционально количеству восстановленного формазана, которое можно определить спектрофотометрически после растворения в органическом растворителе. Из лунок 24-луночных планшетов, в кото-

рых находились матрицы с клетками, убрали кондиционированную среду. Матрицы и гели далее были перенесены в чистые лунки планшета. Планшет из-под матриц с гелями также окрашивался. В каждую лунку добавляли по 150 мкл среды и раствор МТТ (5 мг/мл) в количестве 10% от общего объема среды и геля в лунке, и оставляли на 3 ч до формирования кристаллов формазана. Затем аккуратно отбирали среду, добавляли по 400 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и оставляли до растворения кристаллов. Далее переносили по 200 мкл полученного раствора в лунки 96-луночного планшета и проводили измерения оптической плотности раствора на иммунохимическом анализаторе Fluorofot "Charity" при длине волны 570 нм (референсная длина 630 нм).

В данном исследовании был проведен сравнительный анализ разных вариантов предобработки полилактидных матриц для последующего заселения их хондроцитами.

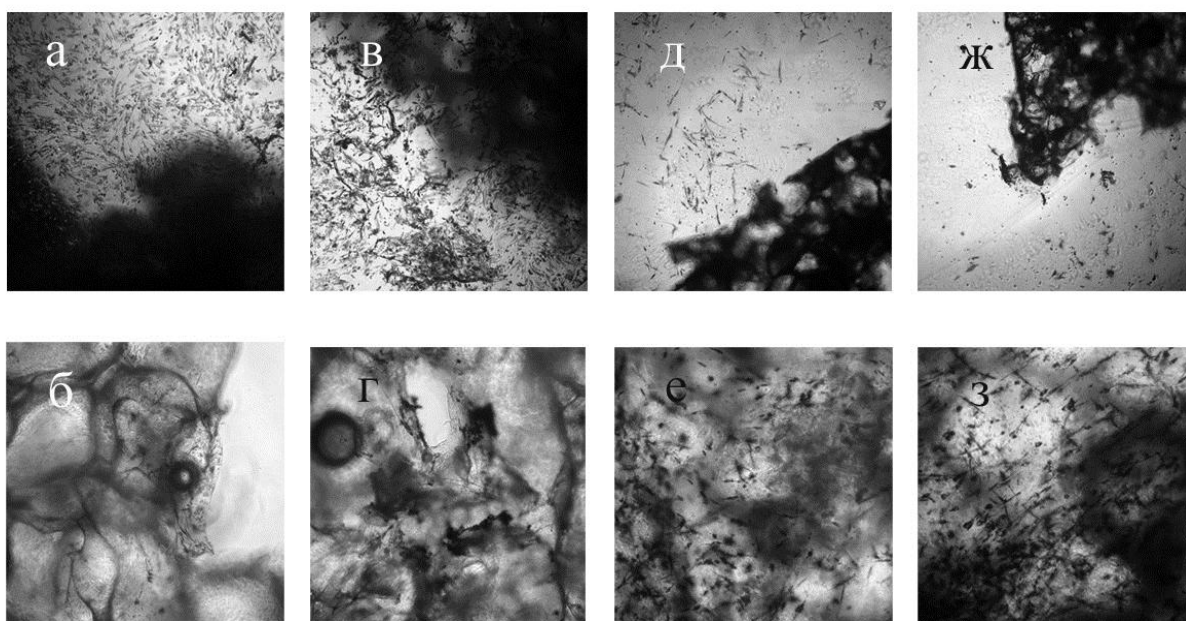


Рис. 1. Хондроциты, нанесенные на полилактидную матрицу разными способами и культивируемые в течение 3 сут (после обработки МТТ).

а, б - клеточная суспензия нанесена непосредственно на сухую матрицу, ув. об. 4х, 20х; в, г - клеточная суспензия нанесена на предварительно замоченную в ростовой среде матрицу, ув. об. 4х, 20х; д, е - нанесение клеток в составе коллагенового геля на сухую матрицу, ув. об. 4х, 10х; ж, з - нанесение клеток в составе коллагенового геля на предварительно замоченную матрицу, ув. об. 4х, 20х

После нанесения клеточной суспензии с высокой плотностью на сухую матрицу на 1 ч и дальнейшей 3-суточной инкубации в полной ростовой среде рядом с матрицей на поверхности лунки можно было наблюдать монослой жизнеспособных клеток (рис. 1а). В случае с использованием подготовленной матрицы картина была похожей (рис. 1в). После нанесения клеток в составе коллагенового геля на сухую матрицу и дальнейшей инкубации в ростовой среде через 3 сут можно было увидеть на дне лунки отдельные распластанные клетки рядом с матрицей, видимо, мигрировавшие из геля (рис. 1д). После нанесения клеток в геле на обработанную матрицу клеток в лунке практически не наблюдалось (рис. 1ж). Более детальный микроскопический анализ позволил выявить наличие отдельных клеток на поверхности полилактидной матрицы в случае нанесения суспензии клеток (рис. 1 б, г) и большого количества клеток

внутри пор матрицы при нанесении клеток в составе геля (рис. 1 е, з). Однако при наблюдениях под микроскопом невозможно было оценить количество клеток, прикрепившихся к матрице, и сравнить между собой различные способы предобработки матриц по количественному критерию. Для определения относительного количества хондроцитов был применен колориметрический анализ с использованием МТТ.

В настоящей работе предварительно было определено, что минимальное количество клеток, выявляемое МТТ-методом, составляло 5 тыс. клеток. Также было определено, что использующийся в качестве растворителя кристаллов формазана ДМСО и наличие неокрашенных клеток в лунке не влияют на значения оптической плотности (ОП). Тестирование полилактидных матриц и коллагенового геля без клеток также не выявило значений ОП, превышающих ОП с минимально определяемым количеством клеток. Однако кристаллы формазана, формирующиеся в клетках, находящихся в коллагеновом геле, очень медленно растворялись в ДМСО, поэтому время растворения пришлось увеличить до 3 сут. Значения оптической плотности подвергали статистической обработке, достоверность различий средних значений оценивали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок.

На рис. 2 представлены значения ОП при нанесении 200 тыс. хондроцитов на матрицы с разными вариантами предобработки. Можно видеть, что ОП раствора значительно отличается при сравнении вариантов нанесения клеток непосредственно на матрицу ($0,23 \pm 0,04$, $n=6$) и в составе коллагенового геля ($0,79 \pm 0,1$, $n=6$) (значения статистически достоверны, $P < 0,01$), но мало отличается при сравнении аналогичных вариантов с и без обработки ростовой средой.

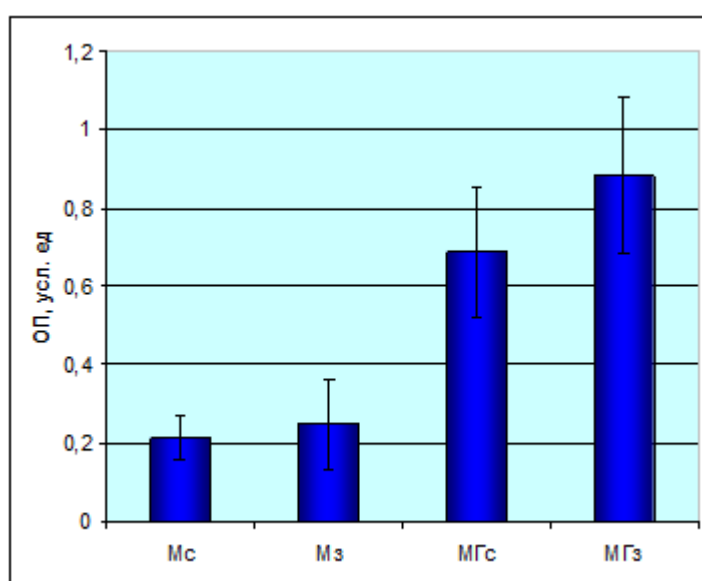


Рис. 2. Относительное количество жизнеспособных хондроцитов, нанесенных на полилактидную матрицу разными способами. Ось Y – средние значения (\pm ошибка среднего) ОП раствора, полученные колориметрическим методом с использованием МТТ.

Ms – значения ОП при нанесении клеток непосредственно на сухую матрицу, Mz - на предварительно замоченную в ростовой среде матрицу, MGs - в составе коллагенового геля на сухую матрицу; MGz - в составе коллагенового геля на предварительно замоченную матрицу.

Если принять ОП в варианте 4 (нанесение клеток в составе коллагенового геля на предварительно замоченную матрицу) за максимальное значение, т.к. все помещенные на матрицу клетки оставались в геле и сохраняли жизнеспособность, то можно оценить относительное количество клеток при других вариантах нанесения их на полилактидные матрицы. Нанесение хондроцитов в виде сус-

пензии с высокой плотностью клеток непосредственно на полилактидную матрицу с выдерживанием в течение 1 ч для прикрепления клеток к поверхности матрицы не является эффективным способом – только порядка 20 % клеток оставалось на матрице. Нанесение хондроцитов в составе коллагенового геля на матрицу оказалось довольно эффективным как в случае использования сухой матрицы, так и в случае предварительно замоченной в ростовой среде матрицы. При этом большинство клеток оставалось жизнеспособным и находилось в составе геля.

Можно сделать заключение о том, что наиболее оптимальными условиями культивирования хондроцитов кролика на полилактидных матрицах является предобработка матриц ростовой средой и нанесение клеток в составе коллагенового геля.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00068) и при финансовой поддержке ФАНО России.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Нащекина Ю.А., Никонов П.О., Михайлов В.М., Пинаев Г. П. Зависимость заполнения стромальными клетками костного мозга трёхмерной матрицы от способа посева клеток и типа модификации поверхности матрицы. Цитология. 2014. 56 (4): 283–290.
2. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A. et al. Treatment of deep cartilage defect in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N. Engl. J. Med. 1994. 331:889–895.
3. Capes J.S., Ando H.Y., Cameron R.E. Fabrication of polymeric scaffolds with a controlled distribution of pores. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2005. 16(12): 1069-75.
4. Chang N.J., Lam C.F., Lin C.C. et al. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells in porous PLGA scaffolds create a microenvironment for the regeneration of hyaline cartilage in rabbits. Osteoarthritis Cartilage. 2013. pii: S1063-4584(13)00902-3.
5. Galle J., Bader A., Hepp P. et al. Mesenchymal stem cells in cartilage repair: state of the art and methods to monitor cell growth, differentiation and cartilage regeneration. Curr. Med. Chem. 2010. 17(21): 2274-2291.

6. Lu L., Zhu X., Valenzuela R.G. et al. Bio-degradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. Clin. Orthop. Relat. Res. 2001. 391:S251–S270.

7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983. 16;65(1-2): 55-63.

8. Pörtner R, Meenen N.M. Technological aspects of regenerative medicine and tissue engineering of articular cartilage. Handchir Mikrochir Plast Chir. 2010. 42 (6): 329-36.

9. Zhu H., Ji J., Tan Q. et al. Surface engineering of poly(DL-lactide) via electrostatic self-assembly of extracellular matrix-like molecules. Biomacromolecules. 2003. 4(2):378-86.

УДК 612.35

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА ПЕЧЕНИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПАТОЛОГИИ У РЫБ

Г.И. Пронина¹, А.О. Ревякин¹, Н.Ю. Корягина², О.И. Степанова¹,
Ж.О. Курищенко¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий» Федеральное медико-биологическое агенство (ФГБУН НЦБМТ)

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ирригационного рыбоводства (ФГБНУ ВНИИР)

142460 Московская область, Ногинский р-он, пос. Воровского, ул. Сергеева, 24. ВНИИР, gidrobiont4@yandex.ru

Эксперимент показал, что введение молоди карпа парацетамола per os в дозе 15 г/кг вызывает патологию печени. У опытных рыб нарушается морфологическая структура печени.

Ключевые слова: карп (Ciprinus carpio L.), печень, парацетамол, гистология паренхиматозных органов.

Модельные эксперименты в медицине применяются для изучения действия препаратов на животных и последующей экстрапо-

ляции результатов на человека [1, 2, 3]. В последнее время в качестве альтернативных биомоделей начато использование рыб, так как они являются более доступными объектами исследования; у них легче вызвать патологию, так как данные организмы являются пойкилотермными гидробионтами. А также по этическим соображениям, так как рыбы находятся на более низкой ступени эволюционного древа, чем млекопитающие [7, 8, 10, 11]. Относительно восприятия болевых импульсов у рыб ведутся дебаты, однако большинство авторов склонны считать, что у рыб понижен болевой порог чувствительности [5, 9, 12].

В данной работе проведено моделирование патологии печени у рыб с помощью парацетамола. Препарат выбран из-за его доступности, относительно низкой стоимости и быстрого токсического эффекта, усиливающегося при добавлении спирта.

Парацетамол (международное название: paracetamol; ацетаминофен; пара-ацетаминофенол; N-(4-гидроксифенил)-ацетамид; 4-гидроксиацета-ниlid) применяется как жаропонижающее и анальгезирующее средство. Однако препарат обладает гепатотоксическим и нефротоксическим действием. Он блокирует обе формы фермента циклооксигеназы, ингибируя синтез простагландинов [4, 6].

Целью настоящей работы являлось моделирование патологии печени рыб.

Объектами эксперимента являлись сеголетки карпа (*Cyprinus carpio* L.) чешуйчатой и зеркальной групп. Патология печени рыб была смоделирована парацетамолом. Препарат вводился per os в дозе 15 г/кг с 1 мл дистиллированной воды 7-кратно в течение 14 дней по схеме (табл. 1). В качестве контроля были взяты рыбы, которым препарат не вводился. Количество рыб в эксперименте – 39 особей.

Таблица 1. Схема введения препаратов молодежи карпа

Группа 1	Группа 2	Группа 3
	per os × через день 7 раз	
Контроль без введения препаратов	Парацетамол 15 г/кг + 1 мл дистиллированной воды	Парацетамол 15 г/кг + 1 мл 50% спирта

Вскрытие опытных объектов производилось на 7, 14 и 21 день после курса введения парацетамола. Внутренние органы фиксировались в 10% растворе формалина. Затем после обезвоживания и заливки в парафин готовились гистологические срезы при помощи микротомы с последующим окрашиванием гематоксилин-эозином. Гистологические исследования проводились с помощью цифровой микроскопии.

Результаты исследования показали, что гибели рыб контрольной группы не отмечалось. Во второй группе (парацетамол+вода) на 9 сутки от начала эксперимента погибла одна рыба. В группе №3 (парацетамол+спирт) наблюдалась смерть 6 рыб на 5,9, 21 сутки от начала эксперимента. Одна рыба была забита на 32 сутки.

У рыб контрольной группы патологических изменений структуры печени и гепатоцитов не обнаружено (рис. 1).

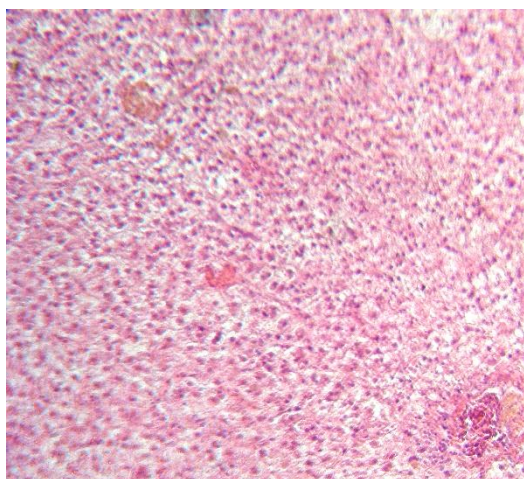


Рис. 1. Нормальная картина печени

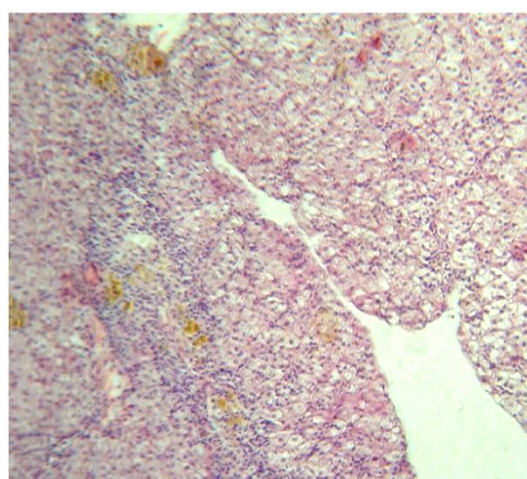


Рис. 2. Очаги жировой дистрофии гепатоцитов. Инфильтрация портального тракта клетками белой крови с переходом на паренхиму

Окраска гематоксилин-эозином. Ув.х200

При микроскопическом исследовании погибшей рыбы второй группы (парацетамол+вода) отмечаются очаги жировой дистрофии гепатоцитов, некоторые клетки безъядерные. Умеренно выраженное серозное воспаление в стенке прилежащего крупного желчного протока с вакуольной дистрофией его эпителиальной выстилки. У

остальных рыб (забитых на 18 и 32 сутки от начала эксперимента): очаги зернистой белковой дистрофии гепатоцитов с неравномерным окрашиванием их цитоплазмы (что может свидетельствовать о снижении содержания гликогена), единичные жировые вакуоли в печеночных клетках, незначительная или умеренная круглоклеточная инфильтрация портальных трактов. На 37 сутки обнаруживается жировая дистрофия (от очаговой до субтотальной) печеночных клеток (рис. 2).

В печени рыб 3-й группы имеются лейкостазы в просвете некоторых сосудов, цитоплазма гепатоцитов неравномерно окрашена, выраженные дистрофические изменения клеток вплоть до некроза, местами небольшое количество клеток белой крови в синусоидах, гиперплазия прилежащей лимфоидной ткани, неравномерно выраженный склероз портальных трактов с круглоклеточной инфильтрацией и примесью единичных макрофагов.

Таким образом, показано, что при введении парацетамола *per os* в дозе 15 г/кг семикратно в течение 14 дней у молоди карпа отмечались нарушения на органном и клеточном уровнях. Действие препарата усиливается смешиванием с 50% спиртом. Степень выраженности патологических процессов зависит от длительности введения парацетамола и спирта. Подтверждением этого явились результаты гистологических исследований.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Адо А.Д. (Ред.) Патологическая физиология. – М.: Триада-Х, 2000. – 574с.
2. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2005. – 608с.
3. Крыжановский Г.Н. Современная патофизиология как экспериментальная, фундаментальная и интегративная медико-биологическая наука // Вест. Рос. АМН. – 1997. – №5. – С. 60-62.
4. Brodie В.В, Axelrod J. The fate of acetophenetidin (phenacetin) in man and methods for the estimation of acetophenetidin and its metabolites in biological material // J Pharmacol Exp Ther, 1949. – 94 (1). – P. 58-67.
5. Cameron, A.A., Plenderleith, M.R. & Snow, P.J. (1990). Organization of the spinal cord in four species of elasmobranch fish: Cytoarchi-

texture and distribution of serotonin and selected neuropeptides. *Journal of Comparative Neurology* 297. – P. 210-218.

6. Chandrasekharan N.V., Dai Hu, Roos K.L.T., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., Simmons D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression // *Proc Natl Acad Sci. – USA*, 2002. – Т. 99. – № 21. – P.13926-13931.

7. Evans, D.H. & Claiborne, J.B.. *The Physiology of Fishes*, 3th edn, 2005. – 616.

8. Johansen, R., Needham, J.R., Colquhoun. D.J., Poppe, T.T. & Smith, A.J.. Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals*, 2006. –40, 323-340.

9. Leonard, R.B.. Primary afferent receptive field properties and neurotransmitter candidates in a vertebrate lacking unmyelinated fibres. *Progress in Clinical Biological Resources*, 1985. – 176. 135-145.

10. Posner, L.P.. Pain and distress in fish: A review of the evidence. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 2009. – 50, 327-328.

11. Powers, D.A.. Fish as model systems. *Science*, New York, 1989. – 246, 352-358.

12. Snow, P.J., Plenderplaith, M.B. & Wright. L.L.. Quantitative study of primary sensory neurone populations of three species of elasmobranch fish. *Journal of Comparative Neurology*, 1993 – 334.

УДК 611-013:616

**ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ
КАК НОВАЯ ПАРАДИГМА ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ
(АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР)**

В.В. Разумов, О.И. Бондарев

Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей МЗ России

654005, Россия, г. Новокузнецк, пр. Строителей 5,
razumov2@rambler.ru

Фактология, эмпиризм и ассоциативное мышление клинической медицины обусловлены отрывом изучения сущности патологии от общебиологических закономерностей онтогенетического развития, что видно на примере противоречий о природе склерозирующих лёгочных процессах, оставшихся неразрешёнными на протяжении всей истории медицины. Гистогенетические закономерности морфогенеза, изучаемые биологией развития, могут быть методологической платформой гнозиса, позволяющие трактовать нозологии как клинические эквиваленты морфогенетических закономерностей развития.

Библиогр. 21 назв.

Ключевые слова: пневмосклероз; эпителиально-мезенхимальная трансформация

20 век оставил в пульмонологии нерешенными проблемы патогенеза многих бронхо-лёгочных заболеваний. В пылевой патологии органов дыхания сохранилось более чем вековой продолжительности непонимание природы пневмокониозов, а потому и противоречащие представления об их сущности, и несовершенство их классификаций, и неопределенность в оценке взаимоотношения с хроническим пылевым бронхитом [4, 10]. Так называемые "инородные тела в лёгких" – кальцификация и оссификации лёгких – продолжают описываться на манер первой половины 20 века как однородная группа заболеваний [12, 13], поскольку сохранились представления о принадлежности их к группе известковой дистрофий [1], использующее для оценки сущности явлений просто лежащий на поверхности факт избыточного отложения кальция в лёгочной ткани; убеждения в процессе обызвествления как способствующего метапластическому образованию костной ткани [1] и в оссификации как естественного продолжением кальцификации [8, 13]. Несмотря на достигнутые в последние годы определенные успехи в изучении интерстициальных заболеваний лёгких, вопросы этиологии, патогенеза и классификации многих из них остаются дискуссионными, достаточно сослаться на идиопатический фиброз лёгкого – активно прогрессирующее заболевание неизвестной этиологии [7].

О кризисной ситуации в пульмонологии свидетельствуют и нозологические пертурбации, преследовавшие её в XX в. и претендовавшие на выражение сущности бронхолёгочной патологии: "пневмосклероз" (1932-1964); "хроническая неспецифическая лёгочная чахотка" (1939); "хронические неспецифические заболевания лёгких (ХНЗЛ; 1947)"; "хроническая пневмония" и "хроническим бронхит" вкуче (1964, 1972); первоначально "хронические обструктивные болезни лёгких (ХОБЛ; 1999)", а с 2004 года - "хроническая обструктивная болезнь лёгких".

По нашему убеждению, корнем противоречий в пульмонологии являлось реально осязаемая неоднозначность лёгочных патологических процессов, хотя и заканчивающихся пневмосклерозами (ПС; resp. - развитие соединительной ткани), но несущих на себе печать разнородности этиологии и патогенеза. Формирование в пульмонологии полярных центроидов о сущности ПС: одного – как банального, инфекционно-воспалительного, постпневмонического, этиологически уже обезличенного и патогенетически отзвучавшего процесса, и второго – не постпневмонической, не инфекционно-бактериальной природы, несущего на себе печать этиологического фактора, началась ещё в XIX в. с нозологического обособления среди ПС кониотического (пылевого) ПС ("антракоз", 1837; "пневмокониоз", 1867; "силикоз", 1870) и в последующем поддерживаемого (обособления) большинством морфологов и пульмологов.

С того же времени другим признанием разнородности лёгочных патологических процессов были попытки классифицировать их по тканевому критерию "интерстициальность/паренхиматозность" (К. Рокитанский). Первоначальная попытка не удалась по причине методической невозможности того времени определиться со степенью участия каждой из тканей в воспалительной реакции. Однако идея сохранилась и после работ Л. Хаммена и А. Рича, впервые описавших в 1935 году быстро прогрессирующий интерстициальный лёгочный фиброз, интерстициальные заболевания лёгких приобрели нозологическую самостоятельность. Культ ПС как сущности бронхолёгочной патологии, продержавшийся в пульмонологии более 30 лет, также был связан не с банально-утрированным аморфным представлением о склерозе как, вместе с кальцинозом, эпита-

фией живому, а с ощущением многоликости ПС, его динамичности, возможности обратного развития.

ПС как явление гистологическое в своём развитии подчиняется закономерностям цито- гисто- и органогенезов, оперирующих понятиями детерминация, дифференцировка, клеточные линии (диффероны), рекапитуляция, трансдифференцировка, метаплазия и др., охватывающих не только, и даже не столько область медицины и патологии, сколько сферу онтогенеза и биологии. Использование же этих закономерностей для понимания неоднородности механизмов развития ПС и его сущности до последних десятилетий XX в. было невозможным из-за отсутствия знаний биохимических и молекулярных механизмов морфогенезов.

Достижения молекулярной биологии, иммуногистохимии, иммуноферментологии, разработка экспериментальных моделей изучения межклеточных взаимодействий в клеточных культурах, успехи трансплантологии и лечения стволовыми клетками вскрыли интимные механизмы морфогенезов, выявили возможность перепрограммирования развития специализированных клеток обратно к менее дифференцированному уровню своих предшественников, вплоть до мульти- или плюрипотентных образований, напоминающих эмбриональные стволовые клетки. Частным случаем такой дедифференцировки клеток является эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ).

Концепции ЭМТ зародилась и сформировалась в эмбриологии как объяснение механизмом цито- гисто- и органогенезов в ходе эмбриогенеза почти всех многоклеточных животных. В процессе эмбриогенеза эпителиальные ткани, имеющие специфические характеристики (компактность расположения; плотные клеточные контакты; клеточная полярность; отсутствие внеклеточного матрикса, секреторной способности и подвижности; наличие специфических иммуногистохимических маркёры: цитокератины и Е-кадгерина), должны менять свой фенотип и превращаться в веретенообразно-отростчатые мезенхимальные клетки, лишённые полярности; рыхло располагающиеся скоплениями или поодиночке; обладающие миграционной способностью, а также способностью к секреции коллагена и других компонентов внеклеточного матрикса; имеющие свои иммуногистохимические метки (виментин, немышеч-

ный актин, α -гладкомышечный актин, N-кадгерины). В ходе эмбриогенеза большинство тканей и органов проходит многократную смену процессов ЭМ и мезенхимально-эпителиальной трансформации (МЭТ) [3, 18, 20, 21], обеспечивающихся попеременным включение одних и выключение других генетических программ развития.

Каскады биохимических и молекулярных механизмов регуляции, определяющие вектор клеточной дифференцировки и состоящие из про- и противовоспалительных, ростовых факторов, факторов миграции, рецепторов к ним, молекул адгезии и сигнальной трансдукции (SRC, RAS, SMAD и др.), активирующих и ингибирующих регуляторов трансляции (TWIST, ZEB1, ZEB2, LEF-1 и др.), оказались путями, по которым поступающие с клеточной поверхности сигналы получают доступ к геному, репрессирова одни и экспрессируя другие его участки, тем самым приводя не только к гистогенетически детерминированному развитию клеток, но и к изменению их гистогенетических фенотипов.

Таким образом, эпителиальные и мезенхимальные клетки имеют единые гистогенетические корни. Мезенхимальные клетки являются гистогенетическими предшественниками дифферонов фибро- хондро- остео- миогенной и адипоцитарной направленности маркёры. Развитие же эпителиальных тканей лишь в постнатальном онтогенезе завершается дифференцировкой клеток в высоко специализированные эпителии.

С позиций феномена ЭМТ закономерности развития фиброза при заболеваниях оказались тождественными закономерностям гистогенетических превращений, наблюдаемым в период эмбриогенеза, в котором дедифференцировка клеток является способом изменения гистогенетических фенотипов: эпителиальные клетки при участии того же каскада механизмов регуляции фенотипа клетки реверсируют в фенотип клеток своих гистогенетических предшественников [14, 15, 17, 19].

Изучение интерстициальных заболеваний легких в аспекте ЭМТ показало, что в развитии ПС участвуют не только клетки воспалительного инфильтрата, но местно образовавшиеся из эпителия миофибробласты апоптозно-резистентного фенотипа, считающиеся центральными клетками прогрессирования фиброза, причастными к продукции коллагена и дисрегуляторным влияниям на все клетки

лёгочного ацинуса [9]. Оказалось, что многообразие форм идиопатической интерстициальной пневмонии по темпам прогрессии заболевания, выраженности фиброза, резистентности к терапии и склонности к развитию рака зависит от глубины ЭМТ, которая определяется, скорее всего, диапазоном репрессирующих и дерепрессирующих воздействий на генетический аппарат клетки. Таким образом, убеждения прошлых лет в возможности невоспалительной природы ПС и нозологической самостоятельности интерстициальных заболеваний лёгких получили, наконец-то, в свете представлений об ЭМТ убедительные доказательства.

Собственным исследованием лёгочной ткани у шахтёров на предмет трактовки пневмокониоза (пылевого ПС) как формы ЭМТ светомикроскопически обнаружено появление среди бронхиального эпителия веретенообразных фибробластоподобных клеток, пенетрирующих базальную мембрану, а иммуногистохимически – наличие в этих клетках виментина – белка промежуточных филаментов, свойственного мезенхимальным клеткам [2]. Таким образом, нозологическая самостоятельность пневмокониозов, третируемая более чем вековыми сомнениями, тоже начинает переходить из области предположений в область доказательной медицины.

Плюригистологические потенции мезенхимальных клеток, до которых реверсируют эпителиальные клетки, допускают развитие не только ПС при фибропластической ориентации развития первых, но также костной, хрящевой или мышечной тканей [16]. Это позволяет окончательно разделить кальцификацию лёгочной ткани как проявления нарушения кальций-фосфорного обмена на уровне клеток или целого организма от лёгочной оссификации как явления гистологического с гетеротопическим образованием костной ткани. В собственном исследовании случая остеопластической пульмопатии (дендриформной лёгочной оссификации) также на предмет ЭМТ нами в недифференцированных клетках соединительной ткани зон лёгочного фиброза и периоссальных клетках бронхиального эпителия была выявлена экспрессия виментина [11].

Таким образом, нозологии могут быть клиническими эквивалентами морфогенетических закономерностей онтогенетического развития. Однако отечественных клинических публикаций по ЭМТ практически нет. Взгляд на ЭМТ как на парадигму патологии разде-

ляется далеко не всеми [7] по причине не только материальной недооснащенности медицины, но и сохраняющейся инерции мышления, о чём в свое время писал И.В. Давыдовский [6], и о чём красноречиво свидетельствуют некоторые публикации настоящего: "Эпителиально-мезенхимальная трансформация как биомаркер почечного фиброза: готовы ли мы применить теоретические знания на практике?" [5].

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абрикосов А.И., Струков А.И. Патологическая анатомия. Часть I. Общепатологические процессы. М.: Медгиз, 1953:141-144.
2. Бондарев О.И., Разумов В.В. К проблеме трактовки сущности пневмокониоза и возможных путях её решения. Мед. труда и пром. экол. 2014;(10):43-48.
3. Васильев Ю.М. Перестройки молекулярной морфологии эпителиальных и соединительнотканых клеток в нормальных морфогенезах и при канцерогенезе. Биохимия. 2008;73(5):656-660.
4. Величковский Б.Т. Патогенетическая классификация профессиональных заболеваний органов дыхания, вызванных воздействием фиброгенной пыли. Пульмонология. 2008;(4): 93-101.
5. Галишон П. Гертиг А. Эпителиально-мезенхимальная трансформация как биомаркер почечного фиброза: готовы ли мы применить теоретические знания на практике? Нефрология. 2013;(4):9-16.
6. Давыдовский И.В. Проблема причинности в медицине (этиология). М.: Медицина. 1962, 176 с.
7. Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Першина О.В. и др. Стволовые и прогениторные клетки в патогенезе пневмофиброза. Патогенез. 2013;11(1):36-51.
8. Илькович И.И. Остеопластическая пневмопатия. Интерстициальные заболевания лёгких. Руководства для врачей. СПб.: Нормиздат, 2005: 465-469.
9. Коган Е.А., Тьонг Ф.В., Демура С.А. Молекулярные основы формирования вариантов идиопатического фиброзирующего альвеолита. Арх. пат. 2009;71(1):12-18.

10. Лоцилов Ю.А. Современные методы клинической морфологии в профессиональной пульмонологии. Мед. труда и пром. экол. 2008;(9):1-5.

11. Разумов В.В., Бондарев О.И. Дендриформная лёгочная оссификация как форма пневмокониоза на фоне эпителиально-мезенхимальной трансформации (аналитический обзор и собственное наблюдение). Фунд. исслед. 2014;(10,Ч.8):1640-1646.

12. Самсонова М.В., Черняев А.Л., Бубнова Н.И. Кальцификация и оссификация лёгких. Арх. пат. 2011;(5):16-18.

13. Chan E.D., Morales D.V., Welsh C.H. et al. Calcium deposition with or without bone formation in the lung. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 2002;165:1654-1669.

14. Kalluri R., Neilson E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J. Clin. Invest. 2003;(112):1776-1784.

15. Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J. et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006;103(35):13180-13185.

16. Medici D, Olsen BR. The role of endothelial-mesenchymal transition in heterotopic ossification. J Bone Miner Res. 2012;27(8):1619-1622.

17. Medici D., Kalluri R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. Semin. Cancer Biol. 2012;22(5-6):379-384.

18. Nieto M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. Int. J. Dev Biol. 2009;53:1541-1547.

19. Piera-Velazquez S., Li Z., Jimenez S.A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. Am. J. Pathol. 2011;179(3):1074-1080.

20. Radisky D.C. Epithelial-mesenchymal transition. J. Cell Science. 2005;118:4325-4326.

21. Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell. 2009;139:871-890.

УДК 577.152.3

**ПРОТЕИНАЗЫ И ИНГИБИТОР КАМЧАТСКОГО КРАБА
«PARALITHODES CAMTCHATICUS» КАК
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА**

Г.Н.Руденская, С.А.Голышев, Н.Н.Костин, В.А.Исаев

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, химический факультет, кафедра Химии природных соединений, НПП ТРИНИТА.

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы д.1, строение 3
Факс 8-495-9393181, E-mail: laboratoriahps@hotmail.com

В ходе выполнения проектов, поддержанных грантами РФФИ были получены биотехнологически значимые результаты: 1). Разработан препарат коллагеназ Морикраза, на основе которого создана мазь Морикрол для лечения ожогов, гнойно-трофических язв, пролежней, послеоперационных рубцов 2). Выделены и охарактеризованы протеиназы, входящие в состав Морикразы, способные активировать плазминоген и гидролизовать фибриноген 3). Разработан способ выделения эндогенного ингибитора коллагеназ камчатского краба, относящегося к семейству серпинов с антикоагуляционным и противоопухолевым действием.

*Ключевые слова: гепатопанкреас краба *Paralithodes camtchaticus*, ранозаживляющий препарат, ингибитор коллагеназ, антикоагуляционное, противоопухолевое действие*

Современная жизнь осложнена войнами, техногенными и природными катастрофами, в результате которых люди получают различные травмы. Шрамы от ран, ожогов часто вызывают комплекс неполноценности, ухудшают качество жизни. Поэтому разработка новых отечественных лекарственных средств для лечения ожогов, гнойных ран, послеоперационных рубцов является важной задачей. На химическом факультете, совместно фирмой ТРИНИТА на основе коллагенолитических ферментов из гепатопанкреаса камчатского краба созданы ранозаживляющие препараты Морикраза и мазь Морикрол.

Камчатский краб *Paralithodes camtchaticus* - наиболее крупный из четырех промысловых видов северо-западной части Тихого океана. После переселения камчатского краба в Баренцево море, численность краба там возросла настолько, что он стал объектом активного промысла. Пищеварительные ферменты крабов приспособлены к деградации коллагена – белка, необычайно устойчивого к действию классических протеиназ. У ракообразных гепатопанкреас является органом, совмещающим функции печени и поджелудочной железы и является доступным, дешевым и нетоксичным сырьем для получения ранозаживляющих ферментных препаратов. Нами показано, что Морикраза содержит эндопротеиназы и экзопептидазы эффективно гидролизующие различные белки и пептиды, а также обладает заметной фибринолитической, тромболитической и коллагеназной активностью [1].

Способ применения коллагенолитического препарата в виде раствора не может быть предложен для клинических испытаний, так как при нанесении ферментного раствора у пациентов возникает сильная боль и жжение. Поэтому Морикраза использовалась нами в составе мази «Морикрол» [2]. В качестве мазевой основы использовали препарат "Эйконол", выделенный из тушек морских холодноводных рыб и представляющий собой комплекс полиненасыщенных жирных кислот, семейства Омега-3, (эйкозапентаеновую, докозогексаеновую) и витамины Е, F и D. Эти биологически-активные компоненты оказывают значительное воздействие на обмен веществ, особенно на липидный обмен, гемокоагуляцию, на структуру и функцию биологических мембран. содержащий комплекс полиненасыщенных жирных кислот, которые могут встраиваться в клеточную стенку вместо арахидоновой кислоты, а также способны нейтрализовать токсичные радикалы, образующиеся при ожоговой болезни. В ряде экспериментов «Морикрол», кроме ранозаживляющего оказывал также бактерицидное действие.

Клинические испытания «Морикрола» проводились в области челюстно-лицевой хирургии. Также хороший эффект был отмечен при использовании Морикрола для приживления трансплантатов у детей. Было проведено консервативное лечение пациентов, имеющих посттравматические и постоперационные рубцы. За 6 месяцев применения Морикрола побочные эффекты обнаружены не были.

Происходило уменьшение покраснения и зуда рубцовой ткани, наблюдалось её уплощение и умягчение.

Таблица 1. Результаты клинических испытаний мази Морикрол в госпитале Св. Владимира (Москва)

Патология	Возраст	Количество пациентов	Положительный эффект	Нет эффекта
Заячья губа волчья пасть	3-12мес	20	20	
Посттравматические и послеоперационные рубцы	6-12 мес	20	20	
Рваные раны после укуса животными	1мес-16 лет	20	20	
Стрептостафилозаражение мягких ткней	6-12 мес	10	10	
Трансплантация кожи	4-16 лет	20	19	1
Урологические заболевания	5-15 лет	10	10	

Изучение тромболитических свойств гомогенных эндопептидаз, входящих в состав Морикразы показало, что трипсин, коллагенолитическая сериновая протеиназа и металлопротеиназа камчатского краба в разной степени способны дозозависимо лизировать фибрин, превращать плазминоген в плазмин, растворять сгустки плазмы.

Исследования показали, что металлопротеиназа РС в меньшей степени подвергается действию ингибиторов плазмы крови и наиболее эффективна при расщеплении сгустков плазмы крови человека. Поэтому интересно было изучить процесс проникновения коллагеназы краба в кровоток через грануляции асептической и гнойной ран у крыс и распределение этого ферментного препарата по органам. Было показано, что после нанесения на раны у крыс коллагеназы краба с концентрацией 3 мг/мл по 250 мкл, ферментный препарат попадает в кровоток и достигает максимального значения через 6 час после введения. В дальнейшем содержание фермента постепенно снижается и через сутки в крови находится около 10% от его максимальной активности. Через 10 мин после введения ферменты краба обнаруживаются в крови, печени и почках. Однако через сутки в печени и почках остаются

лишь следы указанных протеиназ. Таким образом, после проникновения в кровотоки сериновые протеиназы краба быстро инактивируются ингибиторами сыворотки крови и выводятся из организма. При применении коллагеназы в виде мазей с более низкой концентрацией ферментов, например Морикрола, содержащего от 0,25-2% белка, влияние на показатели крови еще меньше. Было показано, что при смазывании гнойных ран вдвое увеличивается время рекальцификации, γ к - показатели на тромбозэластограмме и время лизиса сгустков эуглобулинов. Эти данные свидетельствуют о некотором гипокоагуляционном эффекте, что в случае ожогов является благоприятным фактором, способствующим активации плазмينا (в этом эксперименте активность плазмина увеличилась почти в 2 раза), вызывающего гидролиз фибрина, образовавшегося в капиллярах на поверхности раны.

Новый эндогенный ингибитор РС выделен из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camchaticus*. Ингибитор подавляет активность трипсина, химотрипсина, субтилизина, тромбина, сериновой коллагенолитической протеиназы камчатского краба и папаина, но не действует на плазмин и глутамилэндопептидазу.

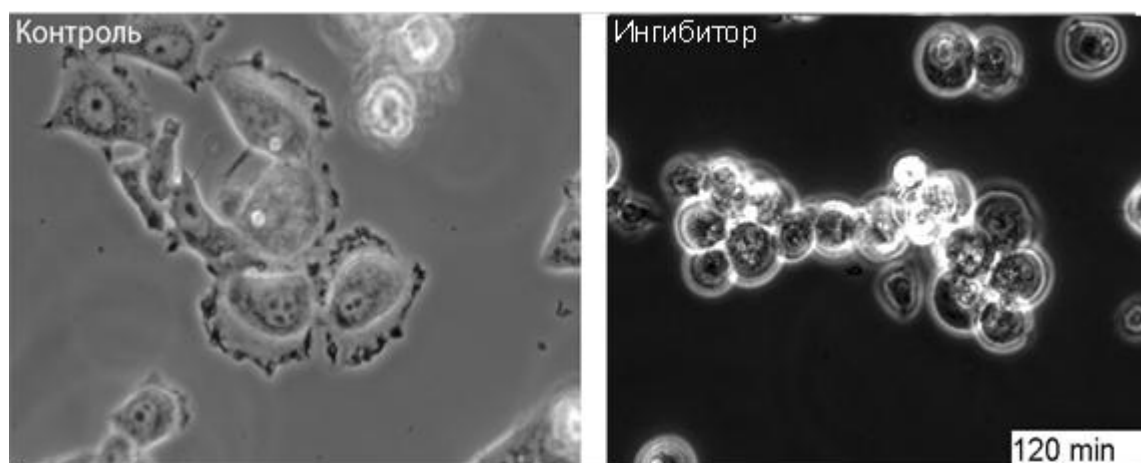


Рис. 1. Действие ингибитора РС на прикрепление клеток культуры HeLa к субстрату. Слева («контроль») клетки, не обработанные препаратом ингибитора коллагеназы, прикрепляются к подложке и принимают характерную форму. Справа («ингибитор») клетки, высаженные в присутствии ингибитора, имеют не характерную для них сферическую форму. Время – 120 минут после посева

Ингибитор имеет оптимум активности 15-20 °С, стабилен от 4-40 °С, для проявления ингибиторного действия нуждается в 0,5-2М NaCl. Первичная структура ингибитора краба в определенной степени гомологична серпинам членистоногих. Методом тромбозластографии установлено, что при инкубации с ингибитором плазмы крови наблюдается выраженная гипокоагуляция, удлиняется время тромбопластино-и тромбинообразования, уменьшается индекс коагуляции и плотность сгустка. Помимо замедления начала свертывания, значительно растягивается во времени процесс формирования фибриновых нитей, что доказывает выраженное торможение гемокоагуляции в присутствии ингибитора и зависимость этого процесса от времени взаимодействия компонентов плазмы с ингибитором. Увеличение времени инкубации до 60 минут и добавление гепарина полностью блокирует процесс тромбообразования. Активирующая ингибитор роль гепарина подтверждена и в эксперименте с использованием тромбина и хромогенного субстрата Gly-Arg-pNA. Методом иммуноферментного анализа было показано, что ингибитор краба способен взаимодействовать с ключевым белком системы комплемента C1s аналогично серпину C1 плазмы крови человека [3].

Рост онкологических заболеваний является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Возрастающая социальная значимость данной группы лекарственных средств определяет необходимость расширения отечественного рынка противоопухолевых препаратов. Серпин РС краба тормозит рост культур клеток рабдосаркомы, HeLa, мышинных иммортализованных фибробластов NIH 3T3 в системе *in vitro*. Оказалось, что ингибитор препятствует прикреплению опухолевых клеток к субстрату в системе *in vitro* (рис. 1). При поддержании постоянной эффективной концентрации ингибитора клетки не способны принять характерную для них и необходимую для нормальной жизнедеятельности форму. [4]. Длительное пребывание в таком состоянии должно приводить к гибели клеток.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Руденская Г.Н.// «Брахиурины – сериновые протеолитические ферменты крабов» Биоорг.химия» - 2003- Т.29- № 2 -С 117-128.

2. A.M. Shmoilov, G.N. Rudenskaya, V.A. Isaev, A.V. Baydakov, R.D. Zhantiev, O.S. Korsunovskaya, L.V. Ageeva, N.V. Starikova // « A comparative study of collagenase complex and new homogeneous collagenase preparations for scar treatment»- 2006- J. DRUG DEL. SCI. TECH.-V 16-№4-С. 285-292

3. Балашова М.В., Лютова Л.В., Руденская Ю.А., Исаев В.А., Андина С.С., Козлов Л.В., Руденская Г.Н.//»Антикоагулянтное и антикомплиментарное действие препарата эндогенного ингибитора из гепатопанкреаса камчатского краба на кровь человека» -2012- Биомедицинская химия,- Т. 58- № 2- С. 176-188

4. Кузнецов С.А., Голышев С.А., Руденская Ю.А., Исаев В.А., Куранова , Руденская Г.Н., //» Новый эндогенный ингибитор из гепатопанкреаса камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*.»-2012. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, V.38 - № 3,- С. 333-341

УДК 547.9:577.15

**НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ L-АСПАРАГИНАЗЫ
НА ОСНОВЕ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ¹**

К.В. Суховерков, Е.В. Кудряшова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет, 119991 Москва; Ленинские горы д. 1 стр.
helena_koudriachova@hotmail.com

Настоящее исследование посвящено разработке нового метода определения каталитической активности L-аспарагиназы на основе ИК-спектроскопии. Применимость данного метода была продемонстрирована при определении активности и стабильности как нативного, так и ряда модифицированных форм фермен-

¹ Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-04-00325Аб гранта Правительства РФ № 11G34.31.0004 и программы развития МГУ

та. Разработанный подход перспективен для определения активности многих других ферментов, особенно эффективен при работе с мутными средами и многокомпонентными гетерогенными системами.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, ИК-спектроскопия, ПЭГ-хитозаны, конъюгаты.

*Принятые сокращения: EwA – L-аспарагиназа *Erwinia carotovora*, Библиография: 11 названий.*

Фермент L-аспарагиназа, катализирующий реакцию гидролиза L-аспарагина до аспарагиновой кислоты, активно применяется в терапии различных видов миелом и острых лимфобластных лейкозов. Медицинское применение фермента ограничено его неустойчивостью в кровотоке и повышенной иммуногенностью [1–3]. Поэтому актуальна задача разработки новых L-аспарагиназных препаратов с улучшенными биофармацевтическими свойствами.

В качестве одного из подходов к решению данной задачи нами предложена модификация фермента хитозаном и его производными: ПЭГ-хитозаном и гликоль-хитозаном [4–7]. Физико-химические и, соответственно, биофармакологические свойства конъюгатов фермента с хитозаном можно целенаправленно варьировать в широком диапазоне в зависимости от степени полимеризации, плотности заряда на полиэлектролите и наличия заместителей (например молекул ПЭГ) в цепи хитозана, что позволяет регулировать каталитические свойства фермента [4–6]. Поэтому возникает задача поиска оптимального, с точки зрения активности получаемого конъюгата, способа модификации. Это обуславливает необходимость определения активности большого массива модифицированных препаратов L-аспарагиназы различающихся по структуре и составу.

Классический метод определения активности L-аспарагиназы – метод «прямой несслеризации», в основе которого лежит регистрация количества выделяющегося в ходе реакции аммиака, путём взаимодействия последнего с реактивом Несслера, не позволяет определять активность фермента, модифицированного производными хитозана, ввиду высокого содержания в них аминогрупп [8,9]. Кроме того метод многостадийен, что отрицательно сказывается на его точности и воспроизводимости.

В данной работе предложен новый высокоэффективный «безреагентный» метод, позволяющий проводить определение активности L-аспарагиназы и ее модифицированных форм требуемого состава на основе метода ИК спектроскопии.

Гидролиз аспарагина происходит по следующей схеме:

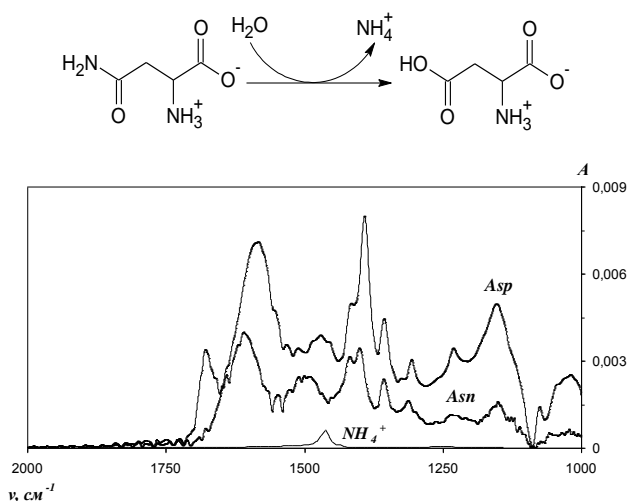


Рис. 1. ИК-спектры L-аспарагиновой кислоты, аспарагина и иона аммония. Экспериментальные условия: $C(\text{Asn})$, $C(\text{Asp})$ и $C(\text{NH}_4^+)$ 20 мМ, 15 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7,5, 37°C

Для выбора аналитически значимых частот были изучены ИК-спектры аспарагина и аспарагиновой кислоты (рис. 1).

В таблице 1 представлено отнесение всех основных характеристических полос поглощения субстрата и продуктов реакции ферментативного расщепления аспарагина.

Таблица 1. Основные полосы поглощения в спектрах аспарагина и аспарагиновой кислоты [10,11]

Вещество	Положение пика, см^{-1}	Отнесение
Аспарагиновая кислота и аспарагин	1580	$\nu_s \text{CO}_2\text{H}$
	1420	$\nu_{\text{as}} \text{CO}_2\text{H}$
	1390	$\nu_{\text{as}} \text{CO}_2^-$
	1150	$\nu \text{C-NH}_3^+$
Аспарагин	1680	$\nu \text{C=O}$ в $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$
Аммиак	1450	δNH_4^+

Аналитически значимыми частотами поглощения в ИК-спектрах являются полоса амид I (1680 см^{-1}) в спектре L-

аспарагина и полоса при 1590 см^{-1} , соответствующая поглощению карбоксильных групп L-аспарагиновой кислоты. Кроме указанных полос в ИК спектрах Asn и Asp присутствует ряд полос низкой интенсивности, относящихся к колебаниям углеродного скелета аминокислот и -СН связей в $-\text{CH}_2$ группах, которые не являются аналитически значимыми. Полоса поглощения иона аммония, который выделяется при гидролизе аспарагина, находится в районе $1400 - 1450\text{ см}^{-1}$. Коэффициент поглощения иона аммония на порядок ниже коэффициентов поглощения Asn и Asp, поэтому его поглощение не влияет на анализ спектров аспарагина и аспарагиновой кислоты.

Чтобы связать изменение интенсивности аналитических пиков с количеством превращаемого субстрата в независимом эксперименте получали калибровочную зависимость оптической плотности (A) от содержания Asn и Asp в интервале концентраций, который соответствует интервалу концентраций продукта и субстрата в ходе реакции (рис. 2).

Калибровочные зависимости линейны в интервале концентраций $0 - 20\text{ мМ}$; величины коэффициента поглощения составляют $1,68 \cdot 10^{-4}\text{ мМ}^{-1}$ и $2,22 \cdot 10^{-4}\text{ мМ}^{-1}$ для субстрата и продукта реакции.

При гидролизе L-аспарагина в режиме субстратного насыщения наблюдается уменьшение интенсивности полосы амид I, что соответствует убыванию субстрата. Интенсивности полос при 1580 и 1390 см^{-1} , отвечающих колебаниям карбоксильных групп, увеличиваются, что вызвано накоплением продукта (рис. 3).

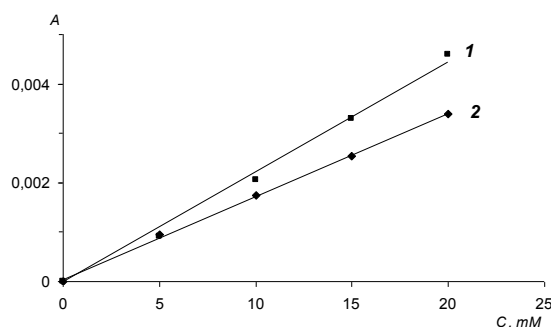


Рис. 2. Калибровочные зависимости $A(1680\text{ см}^{-1})$ от концентрации аспарагина (1) и $A(1580\text{ см}^{-1})$ от концентрации аспарагиновой кислоты. Экспериментальные условия: $C(\text{Asn}), C(\text{Asp}) = 20 - 5\text{ мМ}$, 15 мМ натрий-фосфатный буфер, $\text{pH } 7,5$, 37°C

Показано, что интенсивность аналитических пиков линейно зависит от времени. По тангенсу угла наклона кинетической кривой определяли скорость гидролиза L-аспарагина. Поскольку реакция проходит в режиме субстратного насыщения фермента, определяемая скорость гидролиза аспарагина соответствует V_{max} .

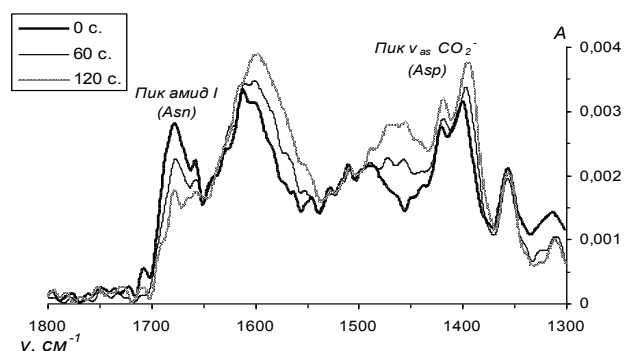


Рис. 3. Изменение ИК-спектра аспарагина во время его гидролиза. Экспериментальные условия: $C(\text{Asn}) = 20 \text{ мМ}$, $C(\text{enz}) = 0.0057 \text{ мг/мл}$, 15 мМ натрий-фосфатный буфер, $\text{pH } 7,5$, 37°C

В таблице 2 приведены результаты определения удельной активности для нативной EwA и её конъюгата с ПЭГ-хитозаном (ММ 3 кДа):

Таблица 2. Значения удельной активности L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* и её конъюгата EwA- PEG-chit, определенные методом ИК-спектроскопии

Метод определения активности	A, ME/мг	
	EwA	EwA-PEG-chit* (3 kDa)
ИК (по субстрату)	520 (± 30)	1040 (± 30)
ИК (по продукту)	450 (± 30)	980 (± 30)
КД [5]	490 (± 20)	1180 (± 20)

Экспериментальные условия: $C(\text{enz}) = 0.0057 \text{ мг/мл}$, 15 мМ натрий-фосфатный буфер, $\text{pH } 7,5$, 37°C

* степень модификации ПЭГ-хитозана: $n(\text{PEG})/n(\text{chit}) = 2.1$

Как следует из данных приведенных в таблице 2, значения удельной активности препаратов, рассчитанные по убыванию полос поглощения продукта и субстрата в ИК-спектре хорошо совпадают и между собой и с контрольными значениями активностей, определенными методом КД в нашей предыдущей работе [5].

Приведенные данные свидетельствуют, что хитопэгилирование увеличивает активность фермента в 2 – 2,5 раза. Это означает, что при одной и той же дозе фермента, т.е. при той же дозе (в МЕ) в препарате конъюгата с ПЭГ-хитозаном содержится в 2 – 2,5 раза меньше белка, чем в случае нативного фермента, что позволит значительно снизить иммуногенность препарата.

Таким образом, в настоящей работе предложен точный, высокопроизводительный метод определения каталитической активности L-аспарагиназы. Уникальной характеристикой данного метода является отсутствие необходимости в дополнительных реагентах для проведения анализа, что позволяет непрерывно наблюдать за ходом реакции, а также проводить определение активности в широком диапазоне pH, ионной силы и температуры. Метод позволяет анализировать не только нативный фермент, но и его модифицированные формы, анализ которых невозможен методом «прямой несселеризации». Использование для анализа нескольких пиков, исключает артефакты при определении активности. Средняя ошибка определения активности составляет 5 – 10 %, а предел обнаружения метода (по скорости) – 2 – 3 МЕ/мл. Метод прост в экспериментальном плане и поэтому позволяет производить скрининг активности большого массива образцов с высокой точностью, что значительно облегчает задачу оптимизации свойств модифицированных форм фермента при разработке новых препаратов пролонгированного действия. Основные принципы разработанного метода могут быть использованы для определения активности ферментов в гетерогенных средах – в эмульсиях и суспензиях. Предложенный метод может быть применен для анализа многих других ферментов с их природными субстратами (не содержащих хромофоры), даже если между физико-химическими свойствами субстрата и продукта существует лишь небольшая разница.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. A.L. Billett, A. Carls, R.D. Gelber, S.E. Sallan, Allergic reactions to *Erwinia* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to *Escherichia coli* asparaginase, *Cancer*, 70 (1992) 201–206.
2. C.H. Pui, W.E. Evans, Treatment of acute lymphoblastic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, 354 (2006) 166–178.
3. J. Kurtzberg, Asparaginase, in: D. Kufe, R. Pollock, R. Weichselbaum, R. Bast, T. Gansler, J. Holland, E. Frei (Eds.), *Holland-Frei Cancer Med.*, 6th editio, BC Decker Inc., Hamilton, 2003: pp. 1 – 29.
4. E. V Kudryashova, K. V Sukhoverkov, N.N. Sokolov, Application of PEG-chitosan copolymers for regulation of catalytic properties of enzymes for medical application using recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase as an example, *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 8 (2014) 252–259.
5. K. V Sukhoverkov, E. V Kudryashova, PEG Chitosan and Glycol Chitosan for Improvement of Biopharmaceutical Properties of Recombinant L Asparaginase from *Erwinia carotovora*, *Biochem.*, 80 (2015) 113–119.
6. И.М. Дейген, Е.В. Кудряшова, Структура и стабильность анионных липосом в комплексе с сополимером ПЭГ-хитозан, *Биоорганическая Химия*, 40 (2014) 595 – 607.
7. Е.В. Кудряшова, К.В. Суховерков, Н.Н. Соколов, Применение со-полимеров пэг-хитозана для регуляции каталитических свойств рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, *Биомедицинская Химия*, 60 (2014) 16–27.
8. J.C. Wriston, T.O. Yelln, L-asparaginase: a review, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 39 (1973) 185–248.
9. H.E. Wade, B.P. Phillips, Automated Determination of Bacterial Asparaginase and Glutaminase, *Anal. Biochem.*, 44 (1971) 189–199.
10. А.В. Васильев, Е.В. Гриненко, А.О. Щукин, Т.Г. Федупина, Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений, СПбГЛТА, Санкт-Петербург, 2007.
11. Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт, Аминокислоты, пептиды белки, Мир, Москва, 1985.

УДК 546.22:661.719.2.547.32
ИОНООБМЕННЫЕ МЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ
МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА

Л.М. Станевич¹, В.И. Бахтаирова¹, В.В. Баяндин², Н.С. Шаглаева²

¹Иркутский государственный медицинский университет,
664003, Россия, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1
stanevichlm1954@yandex.ru, bvi.38@mail.ru

²Иркутский национальный исследовательский технический университет
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
bayandinvv@yandex.ru, ShaglaevaNS@yandex.ru

Реакцией нуклеофильного замещения атомов хлора в поливинилхлориде проведена их замена на бензимидазольные группы. Показано что процесс взаимодействия полимера с натриевой солью 2-меркаптобензимидазола сопровождается дегидрохлорированием. На основе полученных соединений изготовлены мембраны, обладающие протонной проводимостью от $1.0 \cdot 10^{-2}$ См/см до $3.8 \cdot 10^{-2}$ См/см в интервале температур от 45° С до 195° С.

Библиогр. 2 назв.

Ключевые слова: ионообменная мембрана, поливинилхлорид, замещение, дегидрохлорирование.

Возникновение и быстрое развитие исследований по созданию, изучению и применению ионообменных материалов неразрывно связано с их использованием в различных областях жизнедеятельности человека [1]. Ионообменные материалы применяют в качестве сепараторов, избирательно пропускающих ионы, для опреснения соленых и очистки промышленных (сточных) вод, для удаления коллоидных растворов суспензий, в сенсорных устройствах [2]. Ионообменные материалы находят применение в качестве катализаторов в химической промышленности, в пищевой промышленности для очистки электролизом соков, сывороток, молока, сиропа, направленного изменения содержания минеральных веществ, и кислотности вин.

Они находят применение в медицине – в аппаратах типа «искусственная почка».

Взаимодействием поливинилхлорида (ПВХ) с Na-солью 2-меркаптобензимидазола (МБИ) в растворе циклогексанона получены полимерные электролиты разного состава.

Установлено, что реакция ПВХ с Na-солью МБИ сопровождается дегидрохлорированием: содержание в сополимере звеньев винилхлорида, рассчитанное по результатам определения массовой доли хлора, отличается от содержания этих звеньев, найденного по массовой доле азота и серы. Содержание поливиниленовых звеньев (ПВ) в модифицированном ПВХ рассчитано по формуле:

$$ПВ = 100 - (ВХ + МБИ)$$

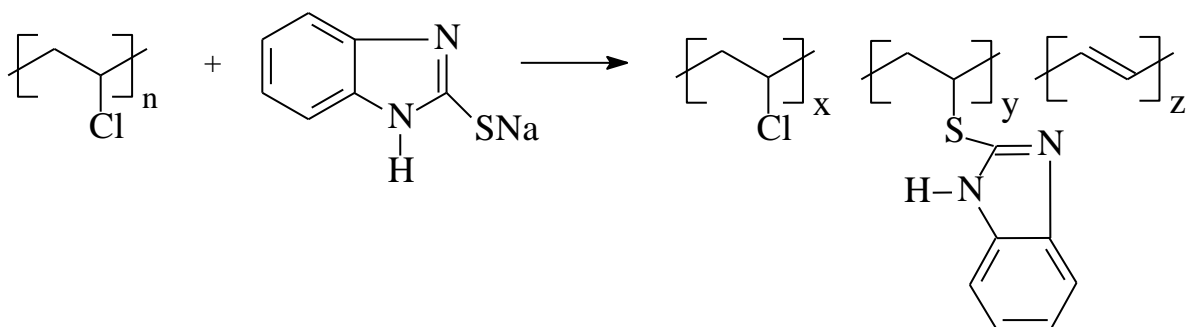
где ВХ – количество звеньев винилхлорида; МБИ – количество 2-меркаптобензимидазольных фрагментов.

С повышением температуры реакции ПВХ с Na-солью МБИ наблюдается увеличение количества поливиниленовых фрагментов в сополимере (эксперименты 1, 2 и 6, табл.). Максимальное содержание $\sim\text{CH}=\text{CH}\sim$ фрагментов составляет 16.20 мол. %, но при этом сополимеры не теряют растворимости (эксперимент 6, табл.).

Таблица. Состав сополимеров, полученных реакцией поливинилхлорида с Na-солью 2-меркаптобензимидазола

№ эксперимента	Т, °С	Время, ч	Состав сополимера, мол. %		
			ВХ	МБИ	$\sim\text{HC}=\text{CH}\sim$
1	80	8	68.93	27.22	3.85
2	100	2	62.19	28.75	9.06
3	100	4	55.85	29.74	14.41
4	100	6	50.53	35.29	14.18
5	100	8	47.06	41.03	11.91
6	120	8	47.68	36.12	16.20

На основании данных ИК- и ЯМР (^1H и ^{13}C) спектроскопии установлен маршрут реакции:



Из растворов продуктов реакции ПВХ с Na-солью МБИ с последующим испарением растворителя получены эластичные и прочные пленки. Протонная проводимость мембран определена с привлечением импедансной спектроскопии двухзондовым методом в интервале частот $10 - 3 \cdot 10^6$ Гц, после допирования в течение 24 часов концентрированной фосфорной кислотой (рис.)

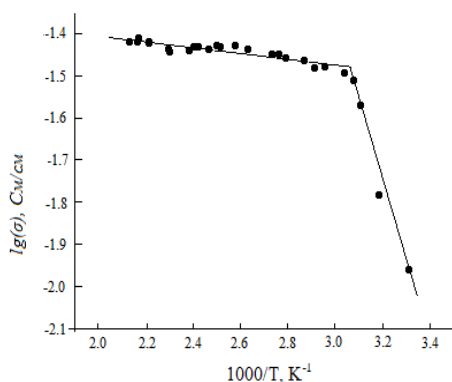


Рис. Зависимость протонной проводимости мембраны на основе модифицированного поливинилхлорида от температуры в координатах уравнения Аррениуса

При температуре 45°C значение протонной проводимости мембраны на основе сополимера винилхлорида и 2-меркаптобензимидазола (эксперимент 5, табл.) составляет $1.0 \cdot 10^{-2}$ См/см. С повышением температуры протонная проводимость мембраны увеличивается до $3.8 \cdot 10^{-2}$ См/см с энергией активации 26 ± 1 Кдж/моль. В условиях эксперимента механические свойства мембраны хорошо сохраняются.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ярославцев А.Б., Добровольский Ю.А., Шаглаева Н.С., Фролова Л.А., Герасимова Е.В., Сангинов Е.А. Наноструктурированные материалы для низкотемпературных топливных элементов // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 3. С. 191-220.

2. Ярославцев А.Б., Никоненко В.В. Ионообменные мембранные материалы: свойства, модификация и практическое применение // Российские нанотехнологии. 2009. Т. 4. № 3. С. 33-53.

УДК 544.77.051.64+544.77.022.533

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРО- И НАНОЭМУЛЬСИОННЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Е.Г. Шубенкова

Омский государственный технический университет,
644050, Россия, г. Омск, проспект Мира, 11,
Факс: (3812) 65-26-98, shubenkova-e@mail.ru

Получены фосфолипидные наночастицы в виде микро- и наноэмульсионных систем типа вода в масле, которые представляют собой натуральные композиции на основе масляных и водных экстрактов сырья растительного происхождения, стойких при хранении, биологически совместимых, хорошо переносимых. Разработанные наноэмульсионные системы могут использоваться в качестве носителей активных веществ в фармацевтических композициях, а также при производстве пищевых, косметических и ветеринарных продуктов на натуральной основе.

Библиогр. 11 назв.

Ключевые слова: микро- и наноэмульсии; липосомы; биологически активные вещества; экстракты; двухфазная экстракция.

Микро - и нанокапсулирование биологически активных веществ (БАВ) - одно из наиболее интенсивно развивающихся направлений в технологии лекарственных и косметических средств. Доставка терапевтических препаратов при помощи наносистем различного типа – перспективное направление в современной фармакологии и лечебной косметологии, позволяющее получать препараты, имеющие заметные преимущества перед традиционными [1,2].

В качестве транспортных систем применяют наночастицы разной природы [3,4]: полимерные, на основе природных материалов, металлов, фосфолипидные наночастицы [5] и т.д.. В последнее время значительно возрос интерес к наноэмульсиям, так как такие дисперсные системы перспективны для использования в качестве средства доставки лекарственных и биологически активных соединений, улучшают фармакокинетику и фармакодинамику ассоциированных с ними лекарственных веществ, биodeградируемы, не вызывают аллергических реакций, способны защитить инкапсулированные лекарства от преждевременной деградации, увеличить время циркуляции и обеспечить прохождение естественных барьеров (мембраны клеток, гематоэнцефалический и др. барьеры) [6,7].

Целью данных исследований является разработка натуральных композиций на основе масляных и водных экстрактов сырья растительного происхождения, стойких при хранении, биологически совместимых, хорошо переносимых наноэмульсий типа «вода в масле». Наноэмульсия типа «вода в масле» для трансдермального применения содержит гидрофильную фазу, гидрофобную фазу и поверхностно-активное вещество. В качестве гидрофобной фазы используют масляные экстракты растительного сырья на основе оливкового, миндального, персикового и др. натуральных масел, а поверхностно-активное вещество выбирают из группы фосфолипидов природного происхождения [8].

Частицы данной эмульсии представляют собой полую сферу, образованную двухслойной липидной оболочкой, содержащей внешний и внутренний гидрофильные слои, между которыми расположена гидрофобная область двухслойной липидной оболочки, полярно заряженные молекулы которой располагаются на поверхностях внешнего и внутреннего гидрофильных слоев, причём двухслойная липидная оболочка содержит в качестве внешнего и внутреннего гидрофильных слоёв водный экстракт растительного сырья, а гидрофобной областью служит масляный экстракт растительного сырья.

Растительные экстракты перспективны в качестве компонентов натуральных препаратов по многим причинам, так как содержат максимально полную сумму биологически активных веществ лекарствен-

ных растений, способных оказывать на организм комплексное воздействие, проявлять широкий спектр фармакологической активности, а также характеризуются низкой токсичностью. Кроме того подбором растительного сырья для экстракции можно варьировать состав экстрактов, тем самым усиливать и варьировать терапевтический эффект липосомальных композиций.

Извлечение комплекса биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья проводили методами многократной двухфазной экстракции на лабораторном экстракторе и ультразвуковой экстракции. Согласно проведенным теоретическим и экспериментальным исследованиям по подбору оптимальных условий двухфазной экстракции [9], экстракцию проводили при комнатной температуре, концентрации этилового спирта – 40%, соотношении спирт:растительное масло – 1:2 и интенсивности перемешивания – 3000 об/мин.

При проведении ультразвукового извлечения БАВ учитывали, что с одной стороны ультразвук может изменить активность извлекаемых БАВ, с другой – может способствовать разрушению компонентов, поэтому извлечение проводили при ультразвуковой обработке (с частотами $2 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^8$ с⁻¹) мощностью 80 Вт.

Таблица 1. Биохимическая активность исходных экстрагентов и экстрактов на их основе

Экстрагент	Содержание суммы биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами, мкг/мл	
	В экстрагенте	В экстракте на его основе
Водо-спиртовая смесь	0,02	0,27
Растительное масло	0,06	0,11
Абрикосовое масло	0,05	0,10
Персиковое масло	0,06	0,11

Эквивалентной оценкой биохимической активности экстрактов является определение их общей антиокислительной активности (АОА) (Таблица 1). Показателем относительной АОА служит объем экстракта в миллилитрах, израсходованный на титрование 1 мл 0,05 Н раствора перманганата калия [10]. Чем меньше объем препарата, израсходованный на титрование, тем выше антиокислительная активность препарата.

Таким образом, результаты, приведенные в таблице 1 показывают, что экстракты растительного сырья на основе натуральных масел обладают большей биологической активностью, чем натуральные растительные масла и создание на их основе натуральных эмульсионных композиций более предпочтительно и будет усиливать терапевтический эффект.

Стабильность наноэмульсий изучали в условиях ускоренного хранения при температуре 40°C [8]. Методы ускоренного хранения (ускоренного старения) позволяют за 15-115 дней при 40-70°C установить сроки хранения, которые, как правило, совпадают с результатами, полученными при хранении при комнатной температуре в течение 3-5 лет. Оценку стабильности в данном методе осуществляют, исследуя физические и химические изменения наноэмульсий (качество наноэмульсий). В данных экспериментах по исследованию стабильности наноэмульсий качество препарата в процессе хранения оценивали по изменению светопоглощения [11]. *Определение* светопоглощения проводили на спектрофотометре ПЭ-5300В (Россия) при длине волны 660 нм (рис. 1).

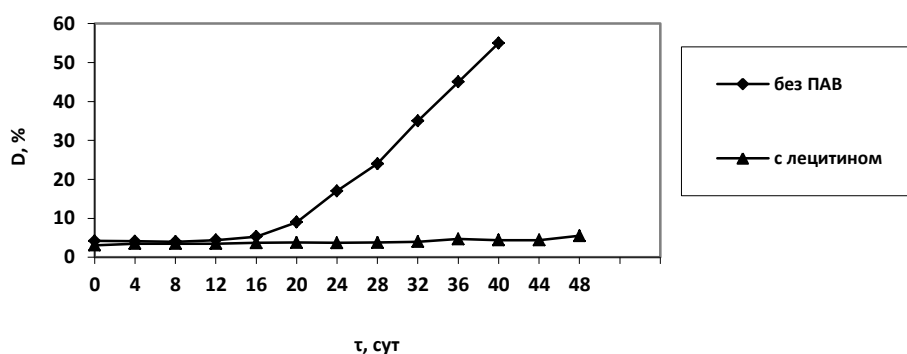


Рис. 1. Светопоглощение образцов наноэмульсии при 40°C

Согласно проведенным исследованиям, стабильность эмульсий с применением лецитина в качестве поверхностно-активного вещества достигает 60 суток в условиях ускоренного хранения. Расчеты показали, что стабильность наноэмульсии с содержанием лецитина при температуре хранения 24⁰С соответствует 6,5 месяцам, а при температуре хранения 4⁰С – соответствует 14,5 месяцам [8].

Получены фосфолипидные наночастицы в виде наноэмульсионных систем типа вода в масле, которые представляют собой натуральные композиции на основе масляных и водных экстрактов сырья растительного происхождения. Наноэмульсия является биологически совместимой и хорошо переносимой, а также обеспечивает равномерное пролонгированное высвобождение действующего вещества и обладает достаточной стабильностью.

Разработанные наноэмульсионные системы могут использоваться в качестве носителей активных веществ в фармацевтических композициях, а также при производстве пищевых, косметических и ветеринарных продуктов на натуральной основе.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. S. Singh, Nanomedicine-nanoscale drugs and delivery systems, J. Nanosci. Nanotechnol, 2010, 10(12), 7906-7918.
2. М.А. Пальцев, Нанотехнологии в клинической медицине и фармации, Терапевт, 2009, №4, С. 20-26.
3. R.A. Petros, J.M. DeSimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, Nat. Rev. Drug Discov, 2010, 9(8), 615-627.
4. J.B. Hall, M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, S.E. McNeil, Characterization of nanoparticles for therapeutics, Nanomedicine (Lond), 2007, 2(6), 789-803.
5. D.B. Fenske, P.R. Cullis, Liposomal nanomedicines, Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(1), 25-44.
6. A. Estella-Hermoso de Mendoza, M.A. Campanero, F. Molinedo, M.J. Blanco-Prieto, Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy, J. Biomed. Nanotechnol, 2009, 5(4), 323-343.
7. R.M. Schiffelers, G. Storm, Liposomal nanomedicines as anti-cancer therapeutics: beyond targeting tumor cells, Int. J. Pharm, 2008, 364(2), 258-264.

А.с. 2535022 РФ; *Бюл. изобрет.*, 2014, 34.

8. E.G. Shubenkova, O.P. Chzhu, Proc. of the 2nd Int. Academic Conf. «Applied and Fundamental Studies» (St. Louis, USA March 8-10, 2013), St. Louis, USA, 2013.

А.с. 2170930 РФ; *Бюл. изобрет.*, 2000, 13.

9. О.С. Стрекалова, Дисс. канд. биол. наук, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, Москва, 2010, 117 с.

УДК: 57.085

БИОБАЛЛИСТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАЛУСОВ РАСТЕНИЙ ТОМАТА

А.С. Столбиков^{1,2}, Р.К. Саляев^{1,2}, Н.И. Рекославская^{1,2}, А.В. Третьякова^{1,2}

¹ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений» Сибирского отделения РАН, 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, cell@sifibr.irk.ru

²ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1, rector@isu.ru

Биобаллистическая трансформация растений является одним из перспективных методов увеличения выхода целевого белка при генетической трансформации растений. Однако в большинстве случаев речь идет о транзientной трансформации, которая затрагивает только часть растительного организма и не передается последующим поколениям. В настоящей работе сделана попытка биобаллистической трансформации каллусов растений томата. Ожидается, что это даст возможность увеличить выход антигенов и осуществить наследование генетической трансформации в поколениях. В качестве объекта исследования в работе использованы каллусы растений томата, а в качестве

целевой генетической последовательности маркерный ген GUS, кодирующий синтез β -глюкуронидазы.

Ключевые слова: Биобаллистика, каллусы, генетическая трансформация.

В последние 15 лет в мире активно ведется разработка новых типов вакцин на основе растений. Фундаментальной основой для этого является перенос в растения генно-инженерными методами генов патогенных организмов и вирусов, кодирующих синтез антигенных белков. Взаимодействуя с иммуногенными структурами в кишечнике (Пейеровы бляшки), эти белки способны формировать как мукозальный, так и системный иммунный ответ, предохраняющий организм от опасных инфекций. Одной из важных задач при создании мукозальных вакцин является повышение выхода антигенных белков на единицу ОРБ (общего растворимого белка). Выход белка зависит как от успешной инсерции гена и активной его экспрессии, так и от сохранения и накопления антигенных белков в клетках растений. Последнее зависит от адресования белков в определенные структуры клетки (например, эндоплазматический ретикулум, апопласт, пластоглобулы), а также от их сохранения в гликозилированном виде.

В нашей лаборатории в течение 15 лет ведется разработка кандидатных мукозальных вакцин на основе трансгенных растений. Одной из основных задач этих работ является увеличение содержания в опытных растениях целевого антигенного белка. Известно, что для практического применения растительной вакцины необходимо, чтобы выход целевого белка в трансгенных растениях составлял не менее 1% от ОРБ [1]. Согласно литературным данным биобаллистическая трансформация растений позволяет получить достаточно высокий уровень целевых белков, который зачастую превышает показатели, наблюдаемые при использовании альтернативных методов генетической модификации растительных объектов [2-6]. Однако, несмотря на высокий уровень синтеза целевого белка при биобаллистической трансформации в большинстве исследований имеет место транзистный перенос генов, в результате чего способность синтезировать гетерологичные белки не наследуется в поколениях. Для получения растений, которые синтезируют и накап-

ливают гетерологичные белки не только в листьях, но и в плодах, и при этом обладают возможностью передавать эту способность следующим поколениям необходимо проводить биобаллистическую трансформацию каллусов. Исходя из этого, была осуществлена попытка биобаллистической трансформации каллусов растений томата репортерным геном GUS. Целью данной работы было изучить особенности генетической трансформации каллусов растений томата биобаллистическим методом и оценить эффективность получаемого результата.

В качестве объекта было выбрано растение томата (*Lycopersicon esculentum*) сорта *вентура* поскольку томат достаточно успешно развивается в культуре *in vitro* способен к каллусообразованию и возникновению морфогенных структур. В качестве целевого гена для трансформации был использован репортерный ген GUS, кодирующий синтез β -глюкуронидазы хорошо себя зарекомендовавший во многих исследованиях. Носителем данного гена был выбран вектор pBI 121 клонируемый в *E. coli XL1-Blue* [7]. Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса с очисткой полиэтиленгликолем [8].

Была проведена работа по подбору питательной среды для культивирования каллусов, полученных из незрелых зародышей и тканей растений томата. В итоге была выбрана среда MS с добавлением 1 мг/л кинетина и 1 мг/л ИУК.

Каллусы помещались на P Agar (rare+agar), представляющий собой круг фильтровальной бумаги на дне стерильной чашки Петри, залитый тонким слоем (10 мл) агаризованной среды следующего состава: 1/2 MS, 3% сахарозы, 0,125 М маннитола, 0,125 М сорбитола. Контрольные образцы помещались в те же условия, что и опытные.

Биобаллистическая трансформация проводилась в стерильных условиях ламинарного бокса с помощью пневматической генной пушки конструкции Саляева [9]. В качестве микропуль использовался вольфрамовый порошок M17 со средним диаметром 1,1-1,2 мкм. Вольфрамовые частицы M17 (6 мг) стерилизовались, а затем трижды промывались стерильной бидистиллированной водой и ресуспендировались в 50 мкл 25% стерильного глицерола. Плазмидную ДНК, выделенную из клеток *E. coli* pBI 121, осаждали на микроча-

стицы путем смешивания 25 мкл суспензии частиц (3 мг), 5 мкл плазмидной ДНК (5 мкг), 25 мкл 2,5 М стерильного CaCl_2 и 10 мкл 0,1 М стерильного спермидина. Вся процедура проводилась при встряхивании суспензии после добавления каждого компонента. После отстаивания супернатант осторожно убирался микропипеткой, а осадок микрочастиц ресуспендировался в 50 мкл 100% этанола. Суспензия (2 мкл) наносилась в углубление на фронтальной поверхности тефлоновых макропуль (15-20 макропуль для каждого эксперимента). За один эксперимент (в течение 1 ч) производилось 15-20 “выстрелов”, в ходе которых обстреливалось 150-200 каллусов. После трансформации контрольные и опытные образцы оставались на P_{AGAR} на 1-2 ч, затем P_{AGAR} с каллусами переносился на среду без сорбита и маннита. После 2-3 сут. инкубации в темноте контрольные и трансформированные каллусы помещали на среду MS, содержащую растительные гормоны и 3% сахарозу.

Для определения результатов биобаллистики применялся гистохимический метод с использованием субстрата X-Gluc (5-бромо-4-хлоро-3-индолил- β -D-глюкуронид). После реакции с X-Gluc в области локализации фермента образуется окраска голубого цвета. X-Gluc готовили в фосфатном буфере (50 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ ЭДТА, 0,1% Тритон X-100, 0,1% SDS, 10 мМ меркаптоэтанол, pH 7.0) в концентрации 0,5 мг/мл. Каллусы помещали в раствор X-Gluc таким образом, чтобы он полностью покрывал ткани и инкубировали 24-48 часов.

Было получено до 1500 каллусов и проведено 6 серий экспериментов. Гистохимическим методом с использованием субстрата X-Gluc удалось получить достаточно четкую картину локализации трансформированных тканей с выявлением областей, в которых произошла генетическая модификация клеток каллусов. При оценке эффективности биобаллистической трансформации использовали каллусы с разным временем инкубации, в том числе те, у которых в зонах дифференциации образовались зачатки стеблей и корней. В итоге были получены множественные подтверждения успешности трансформации. Зоны голубого окрашивания встречались у 80 процентов каллусов, в том числе в зачатках листьев и корешков, образовавшихся из каллусов. Голубая окраска присутствовала в виде локальных зон или же распространялась на всю поверхность каллу-

сов. Зачатки листьев были полностью окрашены. В корешках, образовавшихся из трансформированных каллусов, наблюдались множественные зоны голубого окрашивания, в том числе и в области апекса. Контрольные каллусы после инкубации в X-Gluc не изменяли свой цвет.

Приведенный материал указывает на положительную GUS-реакцию во многих каллусах, включая морфогенные (меристематические) зоны и зачатки стеблей, листьев и корешков. Из этого следует, что использованные подходы и методы окажутся полезными для получения регенерантов растений с высоким процентом трансформации, в том числе и плодов с семенами. В итоге появится потенциальная возможность передавать чужеродный ген последующим поколениям.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Expression of HIV-I antigens in plants as potential subunit vaccines / A. Meyers [et al.] // BMC Biotechnology. – 2008. – V. 8:53. – Режим доступа (doi): <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/8/53>.

2. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression / T. Ruhlman [et al.] // Plant Physiology. – 2010. – V. 152. – P. 2088-2104.

3. Dresen I. Heat-stable oral-based vaccine protects mice from Staphylococcus aureus infection / I. Dresen, G. Hamri, M. Fussenegger // Journal of Biotechnology. – 2010. – V. 145, № 3. – P. 273- 280.

4. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic / M. Oey [et al.] // The Plant Journal. – 2009. – V. 57, № 3. – P. 436-445.

5. Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic / A. Fernandes-San Millan [et al.] // Plant Biotechnology Journal. – 2008. – V. 6, № 5. – P. 427-441.

6. Lossl A. Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes / A. Lossl, M. Waheed // Plant Biotechnology Journal. – 2011. – V. 9, № 5. – P. 527-539.

7. Complete sequence of binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants / P. Chen [et al.] // Molecular Breeding. – 2003. – V. 11, № 4. – P. 287-293.

8. Рекославская Н.И. Основы лабораторной работы с нуклеиновыми кислотами: учебное пособие / Н.И. Рекославская, Р.К. Салаяев. – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2012. – 186 с.

9. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: учебное пособие. – 2-е издание / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2003. – 479 с.

УДК 615.371/.372:663.15:66.081.63
НОВАЯ ФОРМА ВЫПУСКА ХОЛЕРНОЙ
ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ – ТАБЛЕТКИ 100 МГ

А.В. Комиссаров¹, О.А. Волох¹, А.Ю. Ульянов¹, О.А. Лобовикова¹,
И.В. Шульгина¹, А.К. Никифоров¹

¹ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”,
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д.46,
rusrapi@microbe.ru

Экспериментально обоснована возможность повышения эффективности производства за счет уменьшения массы таблетки вакцины холерной бивалентной химической таблетированной с 300 мг до 100 мг. Выявлено, что целесообразно изготавливать таблетки диаметром 6 мм. Обосновано количественное содержание вспомогательных веществ (лактозы моногидрата, микрокристаллической целлюлозы и поливинилпироллидона).

Библиогр. 2 назв.

Ключевые слова: вакцина холерная, масса таблетки, технология.

Нашими предыдущими исследованиями была показана возможность получения холерной химической вакцины в форме таблеток, массой 300 мг, содержащей лиофилизированные холерогенанатоксин и О-антигены, полученные из инактивированных формалином бульонных культур холерных вибрионов О1 серогруппы – *Vibrio cholerae* 569В классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* М-41 классического биовара серовара Огава (6-19 мас.%), и в

качестве вспомогательных веществ следующие компоненты при их соотношении, мас. %: лактозы монгидрат – 44,3-36,3; целлюлоза микрокристаллическая – 44,3-36,3; поливинилпироллидон – 0,4-0,8; кишечнорастворимое покрытие Acryl-eze – 5-8. Предложенная композиция, в совокупности с экспериментально обоснованными технологическими решениями гранулирования, прессования и нанесения покрытия на таблетку, позволяют сократить потери препарата при таблетировании с 30% до 1%, улучшить ее внешний вид и условия работы производственного персонала [1,2].

Следующим шагом исследований в данном направлении являлось повышение эффективности производства за счет уменьшения количества технологических циклов гранулирования таблеточной смеси и нанесения покрытия на таблетку. Достичь данного эффекта представлялось возможным за счет уменьшения массы таблеток вакцины, при сохранении в ней того количества холерогена-анатоксина и О-антигенов, которое определено фармакопейной статьей предприятия на препарат.

Нами предложена следующая композиция холерной химической вакцины в форме таблеток, массой 100 мг, содержащей лиофилизаты холероген-анатоксина, О-антигены Инаба и Огава (18-57 мас. %), и в качестве вспомогательных веществ следующие компоненты при их соотношении, мас. %: лактозы монгидрат – 21,1-40,8; целлюлоза микрокристаллическая – 21,1-40,8; поливинилпироллидон – 0,4-0,8. Для получения таблетки обоснованы технологические режимы процессов гранулирования и прессования компонентов холерной химической вакцины, а также нанесения покрытия на таблетки-ядра. По проверенным показателям вакцина соответствовала требованиям фармакопейной статьи на препарат.

БИБЛОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Экспериментальное обоснование внедрения пленочного покрытия на водной основе для готовой лекарственной формы холерной химической вакцины // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6 (Электронный журнал). Режим доступа: <http://www.science-education.ru/113-11114>.

2. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Гранулирование компонентов холерной химической вакцины // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3 (Электронный журнал). Режим доступа: <http://www.science-education.ru/117-13326>.

УДК 576.53

**ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ
МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
ИЗ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ПЛАЦЕНТЫ, ЭНДОМЕТРИЯ И
ЖИРОВОЙ ТКАНИ**

И.А. Федорова, Н.В. Милованова, М.Н. Гордеева, Ю.В. Рылова,
А.М. Савилова

ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, [iri-
na.genet@gmail.com](mailto:irina.genet@gmail.com)

В одинаковых экспериментальных условиях проведено комплексное исследование пролиферативного потенциала мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) из разных источников: стромы ворсин хориона, Вартонова студня, амниотической оболочки, эндометрия и жировой ткани. ММСК из разных источников демонстрируют различный уровень пролиферации in vitro. Наиболее высокие показатели пролиферации установлены для ММСК из эндометрия, что свидетельствует о перспективе их применения в регенеративной медицине.

Библиогр. 5 назв.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), пролиферация, апоптоз.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) - популяция мультипотентных прогениторных клеток, присутствующих во многих тканях организма человека, обнаруживаемых в основном в периваскулярной нише (2). Регенеративная медицина использует ММСК и их мультипотентные свойства для регенерации тканей. ММСК способны мигрировать в поврежденные ткани, дифференцируясь в определенные клеточные типы и выделяя биологически активные вещества, что способствует морфологическому и функциональному восстановлению (3). Клинические испытания чаще сфокусированы на оценке безопасности и эффективности использования аутологичных ММСК (4), в то время как сравнительный анализ аллогенных ММСК – производных различных тканей в *in vitro* и доклинических исследованиях ограничен. В данной работе охарактеризованы пять различных типов клеток: ММСК из ворсин хориона, Вартонова студня, амниона, эндометрия и жировой ткани с целью выбора варианта ММСК для регенеративной терапевтической стратегии.

Профили экспрессии мРНК генов *cdk11B*, *ccnB1*, *ki-67* и *bcl2* исследованы в лизированных образцах на трех пассажах ММСК из терминальной плаценты, эндометрия и жировой ткани. Тотальная РНК выделена из образцов с использованием набора «Проба-НК» (НПФ ДНК-Технология, РФ). Концентрация РНК измерена с помощью спектрофотометра DeNovixDS-11+ (DeNovix, USA). ПЦР с детекцией в реальном времени для каждого гена-мишени проведена на образцах кДНК с помощью наборов (Евроген, РФ) на амплификаторе ДТ-96 (НПФ ДНК-Технология, РФ).

Для количественного анализа экспрессии генов использовали метод ΔC_p . Величина ΔC_p рассчитана по формуле: $\Delta C_p = C_p \text{ sample} - C_p \text{ reference}$, где C_p – значение порогового цикла, автоматически определяемое прибором; $C_p \text{ sample}$ – значение C_p исследуемого гена-мишени; $C_p \text{ reference}$ - значение C_p гена «домашнего хозяйства». Нормировка C_p генов-мишеней проведена по C_p референсного гена *hprt1*.

Анализ стадии клеточного цикла проведен методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, USA) с использованием пропиридиум йодида, связывающегося с ДНК. С помощью данного метода также выявлена доля поврежденных клеток, находящихся на позд-

ней стадии апоптоза. Достоверность различий оценена по критерию Манна-Уитни при $p < 0,05$.

Исследования *in vitro* свидетельствуют, что ММСК из разных источников существенно различаются по степени пролиферации (1, 5). Для оценки пролиферативного потенциала использована мРНК генов *cdk11B*, *ccnB1*, *ki-67* и *bcl2*, т.к. продукты этих генов непосредственно задействованы в регуляции прогрессии клеточного цикла и апоптоза.

Наиболее высокие показатели пролиферации в целом продемонстрированы ММСК из эндометрия. При сравнительной попарной оценке экспрессии генов-маркеров на каждом пассаже для клеток из исследуемых нами источников установлены достоверные различия.

Экспрессия мРНК генов-маркеров *cdk11B* и *bcl2* от первого (7 сут.) к третьему пассажу (21 сут.) в клетках эндометрия повышена, в то время как в ММСК из ворсин хориона, амниона и жировой ткани обнаружено незначительное снижение экспрессии по всем исследуемым генам. Для ММСК из Вартонова студня достоверных различий в динамике не выявлено.

По данным проточной цитометрии для характеристики пролиферативной активности клеток из различных источников оценено суммарное количество клеток в G_0/G_1 фазах и $S/G_2/M$ фазах клеточного цикла на каждом из трех пассажей. Культуры клеток, выделенных из эндометрия, характеризуются стабильным соотношением пролиферирующих и не пролиферирующих клеток от пассажа к пассажи. В то время как во всех культурах ММСК из терминальной плаценты (ворсин хориона, Вартонова студня, амниона) в процессе культивирования установлено постепенное снижение доли клеток в $S/G_2/M$ и увеличение доли в G_0/G_1 фазе цикла.

По результатам нашего исследования выявлен различный уровень пролиферации *in vitro* для ММСК из разных источников, что свидетельствует о необходимости избирательного подхода к использованию клеточных технологий при терапевтическом применении.

Работа выполнена в рамках реализации проекта РФФ № 14-25-00179 «Исследование иммунологических свойств стволовых и прогениторных клеток из различных тканей, с целью создания новых

подходов к терапии патологических состояний методами регенеративной медицины»

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Amable P.R., Teixeira M., Carias R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly // Stem Cell Research&Therapy 2014, V.5. P. 53.

2. Crisan M., Yap S., Chen C.W. et.al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs // Cell Stem Cell. 2008. V. 13. P. 301-313.

3. Kholodenko I.V., Konieva A.A., Kholodenko R.V., Yarygin K.N. Molecular mechanisms of migration and homing of intravenously transplanted mesenchymal stem cells // J Regen Med Tissue Eng. 2013. V.2. P. 4-11.

4. Lee J.S., Hong J.M., Moon G.J. et.al. STARTING collaborators: A long term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke // Stem Cells. 2012. V.28. P. 1099-1106.

5. Wang L., Tran I., Seshareddy K., et al. A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering // Tissue Eng Part. 2009. V.15. P. 2259–2266.

УДК 57.084.1, 577.29, 577.2.08, 615.22

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ И ПОЛУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ЛИНИЙ ВОЛЬФИИ БЕСКОРНЕВОЙ (*WOLFFIA ARRHIZA*) СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ БЕЛКОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

П.А. Хватков¹, А.Н. Шведова¹, М.А. Чернобровкина¹, А.С. Пушин^{1,2},
А.П. Фирсов^{1,2}, Л.А. Шалойко², С.В. Долгов^{1,2}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ВНИИСБ),
127550, Москва, Тимирязевская ул., 42, khvatkov1987@gmail.com

²Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ФИБХ),
142290, Московская обл., г. Пущино, Проспект Науки, 6,
dolgov@bibch.ru

*В ходе выполнения Государственного контракта Министерства образования и науки № 14.В25.31.0027 получены биотехнологически значимые результаты, важнейшие из которых: 1) впервые разработан протокол стабильной трансформации и получены трансгенные растения *Wolffia arrhiza*; 2) получены трансгенные линии *Wolffia arrhiza* - продуценты дисульфатогирудин-1 и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека.*

Ключевые слова: агробактериальная трансформация, ГКСФ, дисульфатогирудин-1, ряска.

В течение последних 30 лет было разработано много технологий для наработки рекомбинантных белков. Их получают из клеток бактерий, дрожжей, млекопитающих и насекомых. Однако такие системы имеют ряд существенных недостатков. В клетках прокариот не происходят посттрансляционная модификация и правильная укладка полипептидных цепей многих эукариотических белков. Клетки животных лишены подобных недостатков, но их использование в качестве биопродуцентов ограничено высокой себестоимостью получаемых рекомбинантных белков. В клетках высших растений происходят гликозилирование и фолдинг белков, сходные с таковыми у млекопитающих. В отличие от животных, растительные клетки не содержат в своём составе патогенных для человека вирусов и микроорганизмов и могут служить безопасным источником рекомбинантных белков медицинского назначения [2]. При выборе растения-продуцента чужеродных белков важно учитывать исходное содержание белка в растении. Растения семейства Рясковые удваивают биомассу популяции за 1-6 суток, подобно водорослям и грибам, а содержание белка достигает 45% от сухой массы [4].

До 2001г. работы по биотехнологии ряски проводились преимущественно с видом *Lemna gibba*. С начала 21 века были получены первые трансгенные растения рода *Lemna*, а с конца первого десятилетия 21 века и первые трансгенные растения рода *Spirodela*,

экспрессирующие рекомбинантные белки фармацевтического и ветеринарного назначения. Однако, несмотря на возросший интерес к растениям семейства *Lemnaceae* и активные исследования в этом направлении, в настоящий момент нет ни одного сообщения о стабильной трансформации растений рода *Wolffia*. *Wolffia arrhiza* – наиболее эволюционно продвинутое вторично примитивно организованное растение из семейства *Lemnaceae*. *W. arrhiza* отличается от других рясок отсутствием корневой системы, что позволяет культивировать ее в биореакторах глубинным способом, что в свою очередь способно существенно увеличить рентабельность производства рекомбинантных белков [1].

Таким образом, целью наших исследований стала разработка протокола стабильной генетической трансформации растений *Wolffia arrhiza* для последующего использования в качестве экспрессионной платформы для наработки рекомбинантных терапевтических белков.

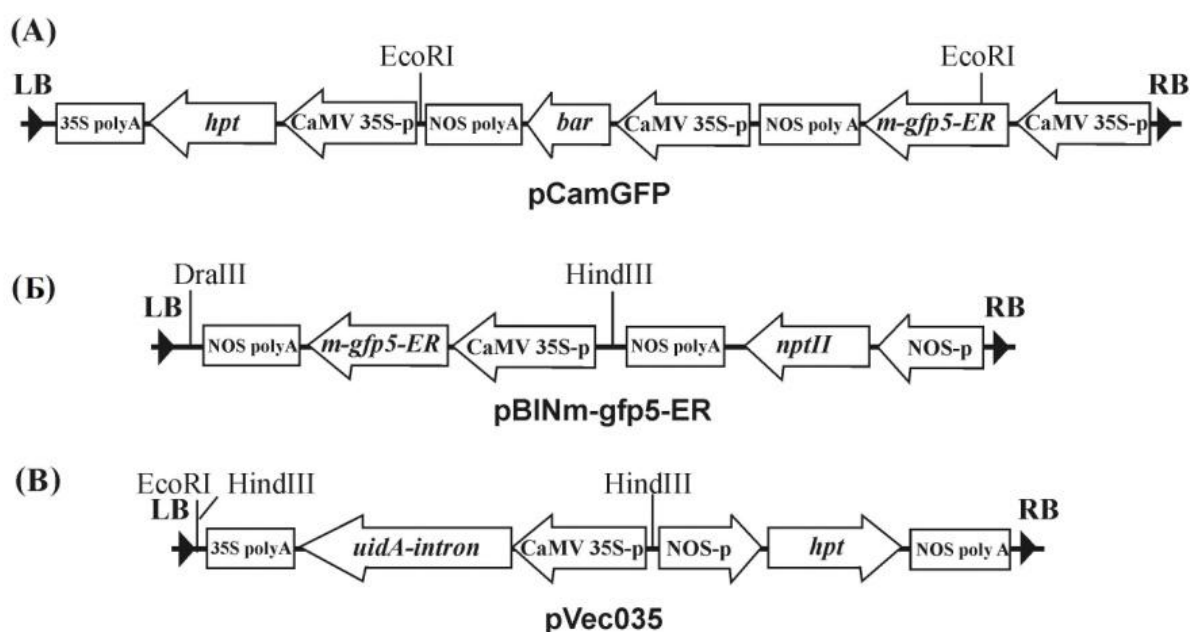


Рис. 1. Структура T-ДНК конструкций, где: А - pCamGFP, Б - pBINmGFP5ER и В - pVec035

В ходе исследований использовали асептическую популяцию целых растений вольфии. В качестве эксплантов для трансформа-

ции мы использовали кластерные структуры вольфии прошедшие 4-х месячную прекультивацию на среде Шенка-Хильдебрандта (SH), содержащей 1% маннитола, 1% сорбитола, 2% глюкозы в качестве источников углерода и дополненной 5,0 мг/л 2,4-D совместно с 0,5 мг/л ВА [3]. В экспериментах по агробактериальной трансформации мы использовали 3 бактериальных штамма: AGL0 содержащий конструкцию pCamGFP (Рис. 1А), AGL0 содержащий конструкцию pVec035 (1В), CBE21 содержащий конструкцию pBINmGFP5ER (Рис. 1Б) и ЕНА105 содержащий конструкцию pVec035.

Трансформацию проводили методом кокультивации эксплантов с суспензией агробактерии ($OD_{600} = 0,4-0,6$). Для инокуляции 200 г растительного материала помещали в колбу с 500 мл инокулюма и выдерживали ее в течение 30 мин на орбитальном шейкере (100 об/мин). Подсушенные в потоке воздуха ламинар-бокса экспланты переносили на бумажные фильтры, помещённые на поверхность среды SH в чашках Петри, и кокультивировали на свету в течение 72 ч. Далее экспланты отмывали жидкой безорганической средой SH с добавлением 300 мг/л тиментина (Тм) и переносили на среды для культивирования эксплантов и элиминации агробактерии (Тм 100 мг/л). Длительность каждого пассажа составляла 2 недели.

В ходе проведения 34 экспериментов по агробактериальной трансформации было установлено, что добавление в среду канамицина способно вызывать витрификацию трансгенной ткани, что в свою очередь приводит к потере пролиферативной активности и снижению эффективности трансформации вольфии. Результативная селекция трансгенных линий происходила в присутствии в среде гигромицина (Нуг) в концентрации 5 мг/л.

В результате проведенных исследований мы пришли к выводу, что для успешной трансформации необходимо на протяжении первых 2 недель культивирования протрансформированных эксплантов присутствие в среде 2,4-D совместно с ВА. При более продолжительной культивации эксплантов на средах с добавлением 2,4-D совместно с ВА стабильной трансформации вольфии не наблюдалось. В предыдущих исследованиях нами отмечалось, что возможно осуществить преимущественную пролиферацию каллусных клеток путем добавления в среду для культивирования пиклорама (PCL) [3]. Однако, даже после 2-х недельного культивирования на средах с

добавлением 2,4-D совместно с ВА перенос протрансформированных эксплантов на среды содержащие PCL позволило получить трансгенные растения с эффективностью лишь 0.4%. Основываясь на данных результативных экспериментов, можно отметить, что стабильная трансформация вольфии с эффективностью от 2,6% до 5,1 % происходила при использовании на первом пассаже схожих по своему составу сред: 1 – SH среда + 2,4–D 2,5 мг/л + ВА 1,0 мг/л + Нуг 5,0 мг/л + Тм 100,0 мг/л и 2 – SH среда + 2,4–D 1,5 мг/л + ВА 1,5 мг/л + Нуг 5,0 мг/л + Тм 100,0 мг/л. В результате были получены 4 трансгенные популяции вольфии, которым были присвоены следующие наименования: Sb5/2, Nb5/2, Nb7/2 и Co1/3. Согласно Саузерн-блот анализу все полученные линии (Sb5/2, Nb5/2, Nb7/2 и Co1/3) содержали геномную вставку гетерологичной ДНК: линия Sb 5/2 содержала ген *hpt* (интеграция гена *gfp* отсутствовала), линии Nb5/2, Nb7/2 и Co1/3 содержали гены *uidA* и *hpt* (Рис. 2). Все полученные линии были проанализированы на наличие экспрессии репортерных белков. Экспрессии GFP у линии Sb5/2 отмечено не

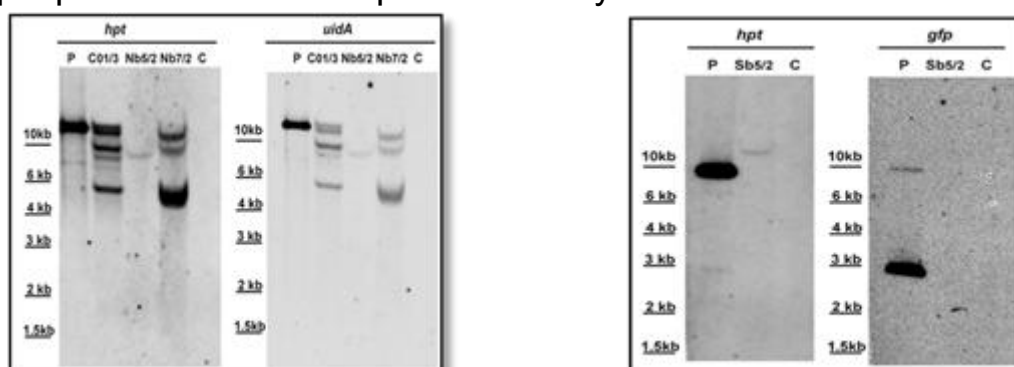


Рис. 2. Саузерн-блот анализ трансгенных растений *W. arrhiza*, содержащих T-ДНК конструкций *pVec035* и *pCamGFP*

было. По результатам GUS окрашивания, в котором линия Sb5/2 выступала в качестве контроля, установлено, что все линии с интеграцией T-ДНК конструкции *pVec035* экспрессируют фермент β-глюкуронидазу (Рис. 3А-В). Контаминации окрашивания в эксперименте обнаружено не было (Рис. 3Г и 3Д). Исходя из полученных данных, было произведено более детальное изучения влияния регуляторов роста на эффективность трансформации вольфии. В данном эксперименте было задействовано 25 вариантов комбинаций регуляторов

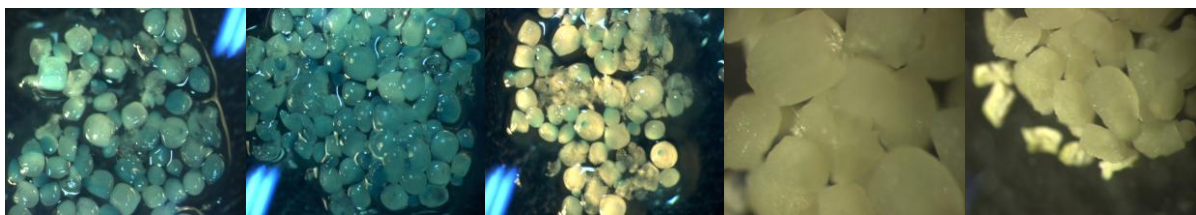


Рис. 3. Результат гистохимического GUS окрашивания, где А – линия Co1/3, Б – линия Nb5/2, В – линия Nb7/2, Г – линия Sb5/2 и Д – не трансгенный контроль

роста 2,4 – D и ВА (2,4 – D в концентрациях 0,5 – 2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л совместно с ВА в концентрациях 0,5 – 2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л) в трехкратной повторности по 65 чашек Петри (≈ 3250 эксплантов) каждый. Трансформацию проводили с использованием штамма ЕНА105 с интродукцией векторных конструкций рSamHIR и рSamGCSF, содержащих в себе целевые гены, кодирующие дисульфатогирудин-1 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ) и селективный ген *hpt*. Гирудин является высоко специфическим прямым ингибитором тромбина, обнаруженным в слюнных железах медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*). ГКСФ является гормоном, стимулирующим формирование колоний белых кровяных

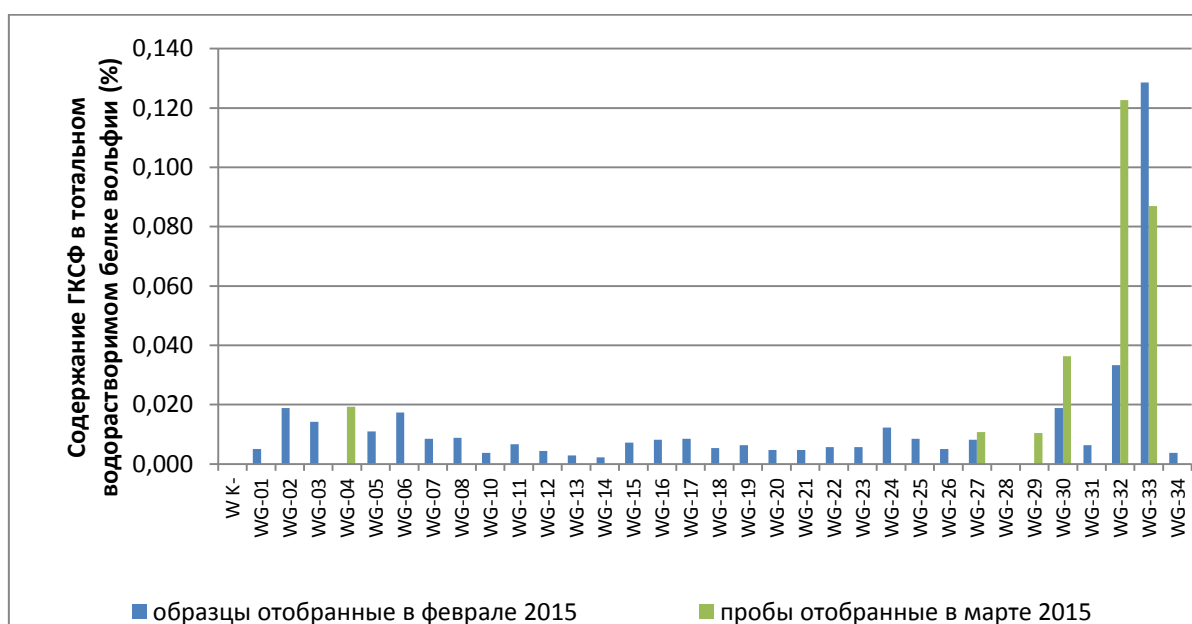


Рис. 4. Результат ИФА 34 линий вошьфии содержащих ген ГКСФ человека

телец в костном мозге. В результате было установлено, что наиболее высокая эффективность трансформации наблюдалась при культивировании эксплантов в течение первых двух недель на среде с добавлением 2,4-D 2,0 – 2,5 мг/л совместно с ВА 2,0 мг/л. В этих вариантах эффективность трансформации составляла 12,5 и 13,3 % соответственно. В ходе исследований получена 81 линия *W. arrhiza*, из них 34 линии с интеграцией гена ГКСФ человека (Рис. 4) и 47 линий с интеграцией гена дисульфатогирудина-1. В результате проведенного вестерн блоттинга и ИФА 34-х линий вольфии содержащих в геноме последовательность гена ГКСФ человека были установлены 2 трансгенные линии (WG-32 и WG-33) экспрессирующие рекомбинантный белок ГКСФ на уровне 0,1% от тотального водорастворимого белка вольфии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Хватков П.А., Чернобровкина М.А., Синёв В.В., Долгов С.В. Изучение условий глубинного культивирования вольфии бескорневой (*Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm) в модифицированном биореакторе // Биотехнология. – 2013. - №6. – С. 51–56.
2. Dahleen L.S., Bregitzer P. An improved media system for regeneration rates barley immature embryo-derived callus cultures of commercial cultivars // Crop Science. – 2002. – V.42. – P. 934–938.
3. Khvatkov P., Chernobrovkina M., Okuneva A., Shvedova A., Chaban I., Dolgov S. Callus induction and regeneration in *Wolffia arrhiza* (L.) Horkel ex Wimm // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2015. – V.120(1). – P. 263–273.
4. Li J., Jain M., Vunsh R., Vishnevetsky J., Hanania U., Flaishman M., Perl A., Edelman M. Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna* // Plant Cell Rep. – 2004. – V. 22. – P. 457–464.

УДК 616.932:579.61

ОСОБЕННОСТИ ФИЛЬТРАЦИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

К.И. Холматов, М.В. Антонычева, А.Д. Белоусов, Н.И. Вахрушина,
С.В. Астафьева.

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «МИКРОБ»,
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
rusrapi@microbe.ru

Усовершенствована технология осветления и фильтрации питательной среды на основе панкреатического гидролизата казеина, используемой для реакторного культивирования холерного вибриона. Технология основана на последовательно выполняемых операциях по предварительной и финишной очистке питательной среды. На предварительном этапе предложено использовать картон фильтровальный КТФ-1П. На этапе финишной очистки - элемент патронного типа марки ЭПВа.П-050-Д-250. Внедрение метода глубинной фильтрации питательной среды позволяет сократить время процесса, обеспечивает высокую степень очистки питательной среды, существенно уменьшает потери жидкой среды при ее приготовлении.

Библиогр. 5 назв.

Ключевые слова: питательная среда; осветление; фильтрация; панкреатический гидролизат казеина; активированный уголь; пептон.

В последнее десятилетие в мире продолжает оставаться неблагоприятной эпидемическая ситуация заболеваемости холерой. Существующая стратегия ВОЗ, предполагает использование холерной вакцины по эпидемическим показаниям [5].

В производстве холерной вакцины для глубинного культивирования штаммов-продуцентов используют жидкую питательную среду из гидролизата казеина с добавлением пептона до 1% [2]. Исполь-

зубый способ двукратной фильтрации среды через ткань бельтинг (ФС-7), имеющей рамеры пор от 1 до 40 мкм [4], не гарантирует удержание балластных частиц основы среды, образующихся при длительном хранении. Из-за невозможности сборки герметичного фильтрационного пакета происходят значительные потери среды.

При решении задач по фильтрации необходимо учитывать влияние материала фильтра на питательную среду, и устойчивость фильтра к составу среды [1]. Для фильтрации питательной среды необходимо было выбрать материал и способ фильтрации с учетом «грязеемкости», провести экспериментальную оценку характеристики фильтра, принимая во внимание свойства среды, температурные условия, и процесс фильтрации. Так же необходимо было учесть потери продукта, и производительность фильтра.

Таким образом, выбор фильтрующего материала и способа фильтрации, а также оценка их влияния на качество продукта является актуальной научно-практической задачей.

В процессе фильтрации питательной среды необходимо выполнить механическое удаление взвешенных частиц и провести осветление, удалив растворенный меланин-подобный темный пигмент. Также требуется удалить нерастворимые частицы пептона сухого ферментативного, содержание которых составляет до 5 %. В процессе фильтрации не должны снизиться биологические и физико-химические показатели качества среды, а так же потери продукта на этапе фильтрации должны быть минимальны.

Осветление основного раствора гидролизата казеина проводят с использованием активированного угля. Неправильной формы частицы активированного угля могут иметь размеры 1-100 мкм [3]. На этапе осветления вместо бельтинга применен картон фильтровальный КТФ-1П из целлюлозы, диатомита, перлита и композиционных смол, сочетающий характеристики поверхностной и глубинной фильтрации с адсорбцией, со средним размером пор 0,45 мкм. Применение картона для фильтрации основы среды при температуре (80 ± 5) °С, позволило существенно снизить потери до 1,5 % от объема питательной среды и сократить время этого этапа фильтрации на 25 %, с сохранением питательных веществ в среде.

На следующем этапе приготовления среды, после добавления пептона сухого ферментативного, для удаления его нерастворимых

частиц использован тупиковый способ фильтрации через фильтр патронного типа «ЭПВг. П–050-Д-250» (ДС-1М) с диаметром пор 0,5 мкм. Его применение позволило снизить потери среды на этом этапе до 0,5% и сократить время фильтрации на 50%, сохранив свойства среды и обеспечив ее качество.

Двухэтапная фильтрация, предварительная (КТФ-1П) и финишная (ЭПВг.П–050-Д-250), оказывает минимальное влияние на питательные компоненты среды и обеспечивает ее качество. Применение современных фильтрационных материалов позволило сократить общие потери среды на 29 %, а также продолжительность процедуры на 40 мин (при общем объеме среды 400-500 л).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Агатицкий В.Г. Об эффективности фильтрования. Часть I // Информационный бюллетень // Ликёроводочное производство и виноделие , № 1.- 2003.- С. 52-54.

2. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. Москва, 2012.- 415 с.

3. <http://www.nazdor.ru/topics/improvement/preparations/current/463183/> от 25.04.2014

4. <http://promtkan.com.ua/philtrodiagonal-i-philtrosvanboj.html> от 17.10.2014

5. http://www.who.int/entity/immunization/pp_cholera_ru.pdf

УДК 57.043:611-018.8.085.2

ГИПОТЕРМИЧЕСКОЕ ХРАНЕНИЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В СОСТАВЕ АГРЕГАТОВ

Шевченко М.В., Сукач А.Н.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
61015, Украина, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, тел: 38-057-7720-135, факс: 38-057-7720-084, mariia_shevchenko1981@ukr.net

Гипотермическое хранение нервных клеток в составе агрегатов увеличивает время их эффективного хранения, по сравнению с суспензией единичных клеток, в 2 раза до 4-х суток. В культуре наблюдается формирование монослоя, образование β -тубулин III положительных клеток и колоний недифференцированных нестин/виментин положительных клеток.

Библиогр. 7 назв.

Ключевые слова: нервные клетки, многоклеточные агрегаты, гипотермическое хранение.

Изолированные нервные клетки новорожденных крыс (НК) могут быть использованы в качестве модели для биологических, медицинских и фармакологических исследований, что требует разработки эффективных способов их хранения. Чаще всего изолированные клетки хранят при отрицательных температурах, однако хранение в гипотермических условиях может дополнять или быть альтернативой замораживанию. Эффективное гипотермическое хранение (ГХ) требует создания условий, при которых НК будут подвергаться минимальным повреждениям. Известно, что для нормального функционирования клеток очень важным является их микроокружение, включающее в себя как различные клетки, так и факторы роста, молекулы адгезии и внеклеточного матрикса [1, 2]. В процессе выделения происходит потеря микроокружения НК, что может приводить к их повреждению и гибели, особенно в процессе последующего хранения.

Целью настоящего исследования было изучение влияния клеточного микроокружения на устойчивость гетерогенной суспензии НК новорожденных крыс к условиям гипотермического хранения при +4 °С.

НК выделяли из тканей головного мозга новорожденных крыс ферментативно-механическим методом [6].

Агрегаты получали в процессе краткосрочного культивирования НК в 24-луночных пластиковых планшетах («Corning», США) в DMEM/F-12, обогащенной 10% сыворотки крови взрослых крыс (СКВК) [4]. Концентрация клеток составляла 4 млн/мл. Все сформированные в одной лунке агрегаты пересеивали для последующего культивирования, либо подвергали ГХ при температуре +4 °С. Хра-

нение осуществляли в солевой среде DMEM/F-12 и в сахарозо-содержащем растворе (ССР) [5] в присутствии и отсутствии 10% СКВК на протяжении 8-ми суток. Агрегаты хранили в криобирках («Nunc», США) (200 мкл суспензии агрегатов + 1,8 мл среды ГХ). После каждых 24-х часов хранения проводили оценку жизнеспособности клеток агрегатов с помощью МТТ-теста [3] и культивирования. Агрегаты культивировали в обогащенной среде DMEM/F-12 в присутствии 10% СКВК в CO₂ инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Половину среды культивирования меняли каждые 3–4 суток. В процессе культивирования отмечали начало формирования агрегатов, динамику их прикрепления к поверхности лунки, скорость формирования клетками агрегатов монослоя, время появления нейробластов и колоний недифференцированных клеток. Также проводили оценку количества распластанных клеток путем подсчета клеточных ядер после окрашивали культуры красителем Hoechst 33342 («Sigma», США).

Оценку результатов МТТ-теста проводили путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных пробах и рассчитывали коэффициент жизнеспособности клеток (КЖ) по формуле $KЖ = O - K$, где O – оптическая плотность в опыте, K – оптическая плотность в контроле.

Микрофотосъемку культур проводили на микроскопе МТ3000 («AmScore», США).

Результаты статистически обрабатывали по методу Стьюдента с использованием программы Excel («MS», США).

Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Как было показано ранее [6], свежеизолированные клетки мозга новорожденных крыс являются гетерогенной суспензией, в состав которой, помимо дифференцированных, входят стволовые и прогениторные клетки, способные пролиферировать и дифференцироваться в условиях культуры *in vitro*. В процессе культивирования НК новорожденных крыс формируют агрегаты, в которых в определен-

ной мере воссоздается утраченное в процессе выделения клеточное микроокружение, что способствует восстановлению микроповреждений клеток [6]. После прикрепления к подложке клетки агрегатов начинают мигрировать и расплываться. Мигрирующие клетки характеризуются как глиальной, так и нейрональной морфологией. Клетки с нейрональной морфологией являются β -тубулин III положительными. После образования глиальными клетками монослоя на нем появляются нейробласты и колонии нестин/виментин положительных стволовых/прогениторных клеток (рис. 1) [6].

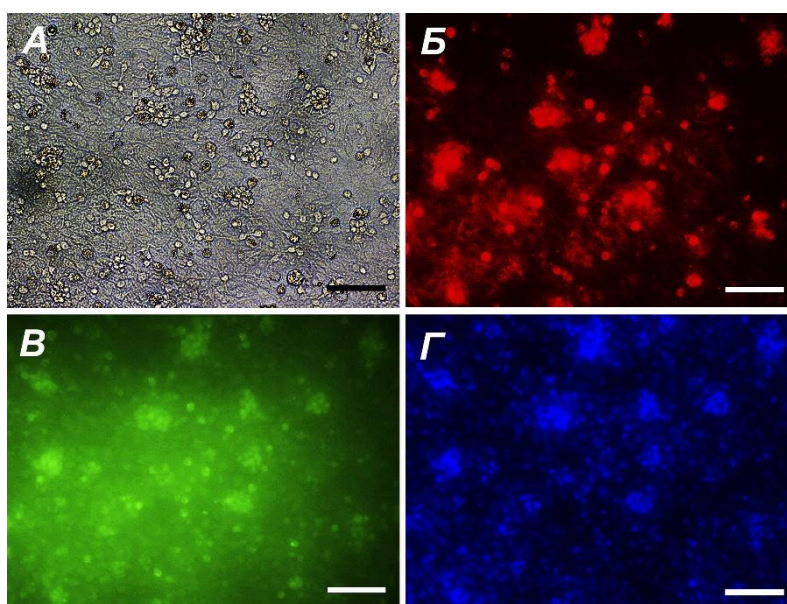
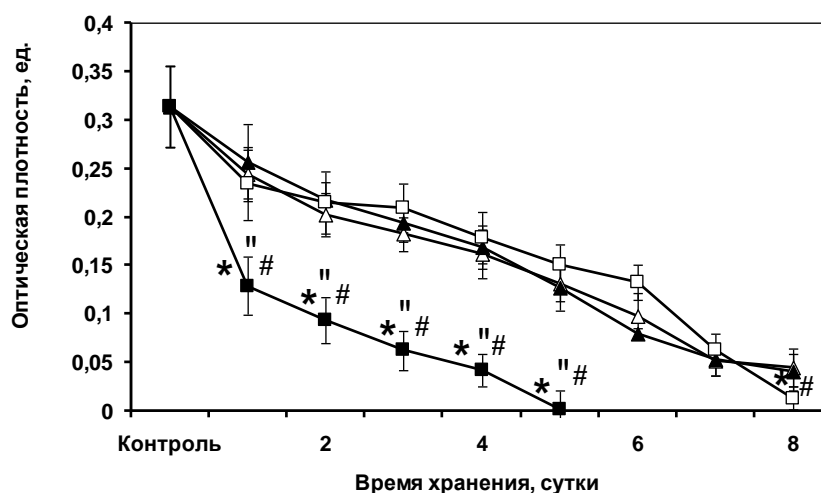


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание свежевыделенных НК новорожденных крыс, культивированных на протяжении 15-ти суток в присутствии СКБК (А) на присутствие нестина (Б) и виментина (В). Ядра клеток окрашены красителем Hoechst (Г). Масштаб, 100 мкм

Проведенные ранее исследования [7] показали, что максимальным временем ГХ НК в виде суспензии, в течение которого клетки сохраняют свои свойства на уровне свежевыделенных, является 2-е суток. Такие клетки способны формировать агрегаты, прикрепляться, мигрировать, пролиферировать и дифференцироваться. При этом было показано, что оптимальной средой хранения НК является DMEM/F-12 при обязательном присутствии сыворотки.

ГХ НК в составе агрегатов сопровождалось постепенным снижением интенсивности преобразования клетками МТТ в формазан, независимо от используемой среды и присутствия в ней СКВК (рис. 2). ГХ НК в ССР с СКВК приводило к резкому падению интенсивности формирования формазана уже после 1-х суток хранения. При этом ГХ на протяжении 5-ти суток приводило к полной утрате способности НК превращать МТТ в формазан.



*Рис. 2. Изменение интенсивности формирования формазана клетками агрегатов в процессе ГХ в DMEM/F-12 (Δ), DMEM/F-12 с СКВК (▲), ССР (□) и ССР с СКВК (■). * – отличия статистически достоверны по сравнению с средой DMEM/F-12; # – отличия статистически достоверны по сравнению с средой DMEM/F-12 с СКВК; " – отличия статистически достоверны по сравнению с ССР, $p < 0,05$*

Культивирование показало, что агрегаты НК после ГХ в DMEM/F-12, независимо от присутствия СКВК, и в ССР без СКВК, были способны прикрепляться к поверхности лунок и формировать конфлюэнтный монослой, если срок хранения не превышал 5-ти суток. При этом плотность монослоя, который формировался НК агрегатов, которые хранили 4 суток в DMEM/F-12 в присутствии и в отсутствии СКВК, и в ССР без СКВК, сохранялась на уровне свежевыделенных клеток, составляя $1314,0 \pm 159,0$, $1269,0 \pm 174,0$ и $1151,0 \pm 192,0$ на мм^2 соответственно (рис. 3, 4). В процессе дальнейшего культивирования в таких культурах на монослое появлялись β -тубулин III положительные клетки и колонии нестин/виментин положительных клеток.

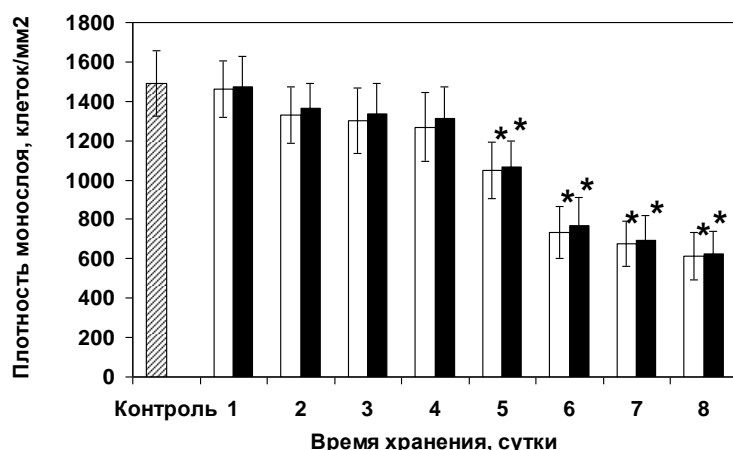


Рис. 3. Влияние времени ГХ агрегатов НК в DMEM/F-12 без СКВК (□) и в присутствии СКВК (■) на плотность монослоя, формируемого клетками после 10-ти суток культивирования. * – отличия статистически достоверны по сравнению с агрегатами свежесыведенных клеток, $p < 0,05$

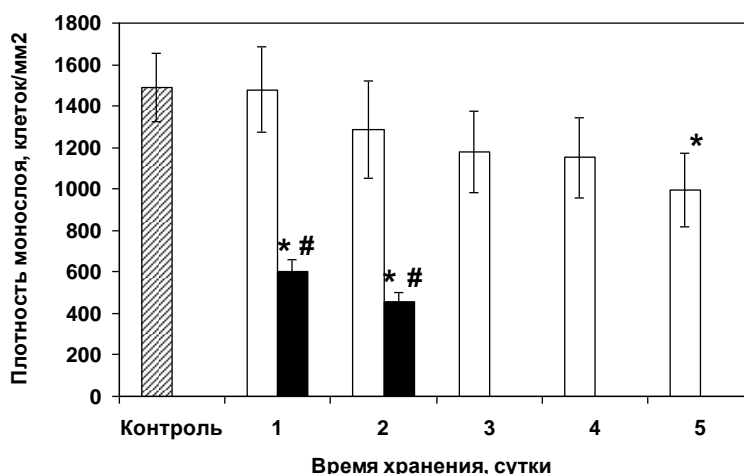


Рис. 4. Влияние времени ГХ агрегатов НК в SSP без СКВК (□) и в присутствии СКВК (■) на плотность монослоя, формируемого клетками после 10-ти суток культивирования. * – отличия статистически достоверны по сравнению с агрегатами свежесыведенных клеток, $p < 0,05$; # – отличия статистически достоверны по сравнению с агрегатами клеток после ГХ в SSP без СКВК, $p < 0,05$

ГХ агрегатов в SSP с СКВК (рис. 4) на протяжении 1-х суток приводило к резкому снижению способности клеток формировать монослой. Плотность монослоя, сформированного такими клетками после 10-ти суток культивирования составляла $610,0 \pm 58,0$ клеток на мм^2 , что в 2,5 раза меньше по сравнению с контролем. В процессе дальнейшего культивирования на монослое появлялись единич-

ные нейробластоподобные клетки, количество которых не увеличивалась.

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали важную роль клеточного микроокружения для выживания как дифференцированных, так и стволовых/прогениторных НК, подвергнутых действию условий ГХ.

Результаты исследований показали, что ГХ в составе агрегатов увеличивает время эффективного хранения НК при использовании в качестве сред хранения как DMEM/F-12, так и ССР. Использование в качестве среды хранения DMEM/F-12 (независимо от присутствия в среде сыворотки), а также ССР без сыворотки увеличивает время эффективного хранения НК до 4-х суток, в отличие от суспензии НК, максимальный срок ГХ которой не превышает 2-х суток при обязательном присутствии в среде сыворотки. При этом, как показало культивирование, выживают как дифференцированные, так и стволовые/прогениторные нейрональные клетки, на что указывает образование в процессе их культивирования нейронов, клеток глии, нейробластов и колоний стволовых/прогениторных клеток.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Alvarez-Buylla A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain / A. Alvarez-Buylla, D.A. Lim // *Neuron*. – 2004. – Vol. 41, N5. – P. 683–686.
2. De Arcangelis A. Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development / A. De Arcangelis, E. Georges-Labouesse // *Trends Genet*. – 2000. – Vol. 16, N9. – P. 389–395.
3. Niks M. Towards an optimized MTT assay / M. Niks, M. Otto // *J. Immunol. Meth*. – 1990. – Vol. 130, N1. – P. 149–151.
4. Sukach A.N., Shevchenko M.V., Liashenko T.D. Comparative study on influence of fetal bovine serum and serum of adult rat on cultivation of newborn rat neural cells. – *Biopolymers and Cell*. – 2014. – Vol. 30, N5. – P. 394–399.
5. Пат. № 16946, Україна, МПК 5С12N5/00. Розчин для гіпотермічного зберігання ізольованих гепатоцитів / Кравченко Л.П., Андрієнко А.М., Семенченко О.А. та ін. – № 4684421/SU; заявл. 20.02.1989; опубл. 29.08.1997, Бюл. №4.

6. Сукач А.Н. Свойства изолированных клеток нервной ткани новорожденных крыс в культуре / А.Н. Сукач, Т.Д. Ляшенко, М.В. Шевченко // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Т. 6, № 3. – С. 63–68.

7. Шевченко М.В. Влияние гипотермического хранения изолированных нервных клеток новорожденных крыс в средах различного состава на их поведение в культуре / М.В. Шевченко, А.Н. Сукач // *Проблемы криобиологии*. – 2012. – Т. 22, №4. – С. 423–432.

УДК 579.222

**КАРДИОТОКСИНЫ КОБР:
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ**

М.А. Шулепко, Е.Н. Люкманова, Р.В. Черткова, П.В. Дубовский, Д.А. Долгих

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ekaterinalyukmanova@yandex.ru

Кардиотоксины (цитотоксины, ЦТ) - поликатионные бета-структурные токсины яда кобр, принадлежащие семейству трехпетельных белков. ЦТ представляют собой огромный интерес благодаря высокой цитотоксической активности в отношении раковых клеток млекопитающих. Это в свою очередь объясняет высокую актуальность их структурно-функциональных исследований с целью описания механизмов, лежащих в основе их противораковой активности. Однако, для проведения подобных исследований и для рационального дизайна цитотоксической активности ЦТ необходимо наличие высокоэффективной рекомбинантной системы продукции.

Библиогр. 8 назв.

*Ключевые слова: трехпетельные белки, кардиотоксин (цитотоксин); *Naja oxiانا*; цитотоксин 1.*

ЦТ наряду с другими трехпетельными токсинами содержатся в высокой концентрации в яде кобр. Эти белки состоят из 59-61 аминокислотного остатка и содержат четыре консервативных дисульфидных связи [1]. Благодаря их поликатионным свойствам и мембранной активности, ЦТ взаимодействуют с липидными мембранами, в состав которых входят анионные липиды [2]. Поэтому неудивительно, что ЦТ проявляют антибактериальную активность, дестабилизируя плазматические мембраны бактерий, т.к. последние содержат значительный процент анионных фосфолипидов [3]. Практический интерес с точки зрения биомедицинских приложений представляет их цитотоксическая активность в отношении раковых клеток млекопитающих. Основным её механизмом является взаимодействие ЦТ с эндосомами раковых клеток. При превышении некоторого критического порога концентрации ЦТ на мембране эндосом, мембранная целостность последних нарушается, инициируя таким образом процессы апоптоза/некроза опухоли [4].

В литературе описано получение ряда рекомбинантных ЦТ [5-8]. Во всех случаях использовали бактериальную систему рекомбинантной продукции в клетках *E. coli*. ЦТ получали либо в результате прямой экспрессии [6], либо в виде гибрида с белком-партнером [5]. При этом, несмотря на заявленные высокие выходы целевого ЦТ АЗ из яда *N. atra* в результате прямой экспрессии [8], за почти 20-летний период продолжения работы не последовало.

В данной работе была разработана уникальная высокоэффективная рекомбинантная система продукции ЦТ1 из *N. Oxiana* (планируется защита патентом Российской Федерации). Особо следует отметить, что, благодаря высокому содержанию дисульфидных связей, эта задача является нетривиальной и трудоемкой. Белок получали в виде цитоплазматических телец включения. Для формирования корректной пространственной структуры ЦТ1 были подобраны условия, которые позволили поднять уровень ренатурации рекомбинантного токсина до 15%. Конечный выход ренатурированного токсина составил ~ 5 мг с 1 литра бактериальной культуры. Были подобраны условия получения изотопно $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -меченого варианта токсина. ЯМР-спектры ($^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -HSQC, $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC) высокого разрешения, подтвердили совпадение химических сдвигов природного и нативного токсинов, а, следовательно, наличие пространственной

структуры рекомбинантного токсина, близкой к структуре природного ЦТ1.

Разработанная система рекомбинантной продукции не имеет мировых аналогов и открывает новые горизонты для структурно-функциональных исследований не только ЦТ1, но и других малоизученных цитотоксинов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Konshina AG, Dubovskii PV, Efremov RG (2012) Structure and Dynamics of Cardiotoxins. *Curr Protein Pept Sci* 13 (6):570-584
2. Dubovskii PV, Konshina AG, Efremov RG (2014) Cobra cardiotoxins: membrane interactions and pharmacological potential. *Curr Med Chem* 21 (3):270-287
3. Dubovskii PV, Utkin YN (2014) Cobra cytotoxins: structural organization and antibacterial activity. *Acta Naturae* 6 (3):11-18
4. Dubovskii PV, Utkin YN (2015) Antiproliferative activity of cobra venom cytotoxins. *Curr Top Med Chem* 15 (7):638-648
5. Chi LM, Vyas AA, Rule GS, Wu WG (1994) Expression of glutathione S-transferase-cardiotoxin fusion protein in *Escherichia coli*. *Toxicol: Official Journal of the International Society on Toxinology* 32 (12):1679-1683
6. Chang LS, Wu PF, Lin J (1996) cDNA sequence analysis and expression of cardiotoxins from Taiwan Cobra. *Biochem Biophys Res Commun* 219 (1):116-121
7. Chang LS, Lin J, Wu PF (1996) cDNA sequence analysis and expression of cardiotoxin V and a new cardiotoxin VII from *Naja naja atra* (Taiwan cobra). *Biochimica Et Biophysica Acta* 1295 (1):1-4
8. Kumar TK, Yang PW, Lin SH, Wu CY, Lei B, Lo SJ, Tu SC, Yu C (1996) Cloning, direct expression, and purification of a snake venom cardiotoxin in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 219 (2):450-456

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-02128).

V. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ И ВЕТЕРИНАРНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 58.07.071:632.122:631.811.2

БИОГЕОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ «ПОЧВА – РАСТЕНИЕ» ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕНЕЗА

Г. А. Белоголова¹, М. Г. Соколова², О. Н. Гордеева¹, М. В. Пастухов¹

¹Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН,
66403, Россия, г. Иркутск, ул. Фаворского, 1а, gabel@igc.irk.ru

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
664033, Россия, Иркутск, ул. Лермонтова, 132,
SokolovaMG@sifibr.irk.ru

*Рассмотрены результаты модельного эксперимента по изучению влияния живых ризосферных бактерий *Azotobacter* и *Bacillus*, входящих в состав биопрепарата, на миграцию Pb, Cd, As и P в системе «почва-растение» с различной степенью техногенной нагрузки. В состав биопрепарата входили азотобактерин, фосфобактерин и кремнебактерин. В работе показано, что в условиях загрязненных почв ризосферные бактерии способны переводить тяжелые металлы и мышьяк в трудно доступные формы, что снижает их аккумуляцию в растениях. Проведенные исследования позволили установить основные факторы, влияющие на миграцию химических элементов.*

Ил. 2., Библиогр. 6 назв.

Ключевые слова: биотехнология, тяжелые металлы, мышьяк, фосфор, ризосферные бактерии, почва, растения, миграция.

BIOGEOCHEMICAL CHANGES IN «SOIL-PLANT» SYSTEM UNDER THE EFFECT OF RIZOSPHERE BACTERIA IN THE TECHNOGENOUS ENVIRONMENT

G. A. Belogolova¹, M. G. Sokolova², O. N. Gordeeva¹, M. V. Pastukhov¹

¹Institute of Geochemistry SB RAS, Irkutsk 66403, Russia, gabel@igc.irk.ru

²Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants SB RAS, Irkutsk 664033, Russia SokolovaMG@sifibr.irk.ru

The research is dedicated to modeling the influence of live rhizosphere bacteria Azotobacter and Bacillus, involved in the biological preparation composition, on migration of Pb, Cd, As and P in the «soil-plant» system with varying technogenous loads. The composition of biopreparation includes azotobacterin, phosphobacterin and silicabacterin. In our paper we showed that in the contaminated soils the rhizosphere bacteria are capable to convert heavy metals and arsenic into hardly accessible forms, thus reducing their accumulation in plants. This research revealed the main factors influencing migration of chemical elements.

Keywords: biotechnology, heavy metals, arsenic, phosphorus, rhizosphere bacteria, soil, plants, migration.

В последнее десятилетие значительно возрос интерес к изучению ризосферных бактерий как стимуляторов роста и регуляции поступления химических элементов в растения из почв. Опыт применения биотехнологий с применением биопрепаратов на основе ризосферных бактерий для стимуляции роста растений и защиты от фитопатогенов свидетельствует о перспективности их использования. Эти препараты оказывают стимулирующее воздействие на многие виды сельскохозяйственных культур и повышают их устойчивость к различным негативным факторам среды [4]. Данное направление ориентировано также на сокращение применения минеральных удобрений и отказ от опасных для здоровья человека пестицидов.

В некоторых работах показано, что микроорганизмы, населяющие ризосферу растений, могут оказывать существенное воздействие на доступность тяжелых металлов растениями, что во многом зависит от физико-химических свойств почв pH, Eh, количества органического материала в почве, особенностей химических свойств самого элемента и его форм нахождения [2, 3]. Почвенные микроорганизмы обладают различной толерантностью к элементам-токсикантам. Это определяет их миграционную активность в системе «почва- растение». В связи с чем особой актуальностью являет-

ся изучение влияния ризосферных бактерий, входящих в состав биопрепаратов, которые используются в растениеводстве.

Проведен модельный эксперимент по изучению влияния живых ризосферных бактерий *Azotobacter* и *Bacillus*, входящих в состав биопрепаратов азотобактерина, фосфобактерина и кремнебактерина, на особенности миграции As Cd, Pb и P в системе «почва-растение».

Объектами исследования являлись почвы и выращенные на них растения (овес, горох, салат, редис), Биопрепараты, разработанные в Томском государственном университете, являются экологически чистыми, нетоксичными, безопасными для человека и животных стимуляторами роста растений [6]. Азотобактерин - препарат, разработанный на основе нового штамма азотфиксаторов *Azotobacter chroococcum*, Фосфобактерин – препарат на основе живых почвенных кислотообразующих бактерий *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, который способен высвобождать фосфор из нерастворимой фракции в доступную для растений форму и стимулировать корнеобразование у растений. Кремнебактерин – препарат на основе силикатных бактерий *Bacillus mucilaginosus*. Бактерии, содержащиеся в этом препарате, выделяют фермент силиказу и поставляют кремний и другие макро- и микроэлементы из природных силикатов в ризосферу растений.

Каждая почва с четырех участков разделена на контрольную и почву, обработанную биопрепаратами (опыт), на которых проведено выращивание растений в Фитотроне СИФИБР СО РАН.

Для химического анализа использовали растения, высушенные до воздушно сухого состояния. Выращивание растений проводили на почвах, отобранных из техногенной зоны г. Свирска. Почвы были взяты на трех участках с различным удалением от основного источника загрязнения, бывшего Ангарского металлургического завода (АМЗ) по производству мышьяка, расположенного в черте города, где загрязнение почв распространено на большей его части. В центральной зоне этой аномалии загрязнение грунтов и почв мышьяком, свинцом и другими тяжелыми металлами во много раз превышает ПДК. Почвы для модельного эксперимента отобраны из гумусового горизонта «А». На условно фоновом участке 1, расположенном в 15 км от г. Свирска, – из пахотных почв, на участке 2 – из

почв садово-огородных участков (в 500 м от источника загрязнения) и на участках (3, 4) – в 100 и 10 м от АМЗ.

Из почв, на которых выросли растения, проведена экстракция тяжелых металлов, мышьяка и фосфора с помощью этилендиамин-тетраацетата (ЭДТА) и изучены формы нахождения тяжелых металлов и мышьяка методом постадийных вытяжек [5]. Повышенные концентрации элементов во фракции ЭДТА могут указывать на возможность образования органических хелатных форм, большая часть из которых может быть доступна для аккумуляции в растениях и микроорганизмах.

Для определения массовой доли As, Pb, Cd в пробах почв использовали атомно-абсорбционный спектрометр модели 403 и 503 фирмы Perkin-Elmer, ошибка определения не превышала 5 – 20 %. Для анализа растений – метод ISP-MS, ошибка определения не превышала 5 – 10 %.

Таблица 1. Распределение содержаний As, Pb, Cd в выделенных фракциях почв в исходной почве (контроль)* и с добавлением биопрепарата (опыт)** в зоне влияния АМЗ и на фоновом участке, мг/кг почвы

Фракции	Участок 4			Фоновый участок 1		
	As	Pb	Cd	As	Pb	Cd
Легкообменная	41,3*	2,84	0,91	0,49	0,049	0,0001
	31,5**	2,70	1,23	0,53	0,032	0,0088
Карбонатная	609	11,2	0,91	1,09	0,15	0,005
	273	7,0	0,42	2,38	0,25	0,016
Органическая	32,6	2,91	0,49	0,01	0,25	0,063
	47,6	5,60	1,44	0,25	0,18	0,067
Гидроксид железа	107,3	8,70	0,55	0,18	0,49	0,060
	110,6	7,58	0,44	0,17	0,64	0,096
Остаточная	310	3185	1,88	20	21	0,095
	264	2400	1,68	35	18	0,088
ЭДТА	246	74,9	1,7	2,0	1,4	0,10
	443	115,5	3,4	2,0	1,2	0,17
Вал	3100	1260	5,1	30	23	0,25
	2640	2100	4,7	30	18	0,30
ПДК	10	32	0,5	10	32	0,5

Примечание: Жирным шрифтом выделено повышенное содержание при сопоставлении контрольного и опытного экспериментов. ПДК – предельно допустимая концентрация [1]

Одной из задач представленных исследований являлось изучение поведения тяжелых металлов, мышьяка и фосфора в системе «почва-растение» с различной степенью загрязнения почв при внесении в почву живых бактерий *Azotobacter* и *Bacillus*, входящих в состав биопрепаратов азотобактерина, фосфобактерина и кремнебактерина.

Максимально высокие валовые содержания As, Cd, Pb установлены в техногенных почвах вблизи отвалов мышьяка, в десятки и сотни раз превышающие ПДК. На удалении от источника загрязнения содержания их снижаются. В таблице 1 приведены результаты распределения форм нахождения тяжелых металлов и мышьяка в максимально загрязненных почвах и в

Таблица 2 . Содержание химических элементов в растениях (на сухое вещество, мг/кг), выращенных на техногенных и фоновых почвах

Растения	10 м от отвалов, участок 4				Фоновый участок 1			
	As	Pb	Cd	P%	As	Pb	Cd	P %
	Контроль				Контроль			
Салат	101	51,1	9,3	0,97	0,447	0,190	0,35	0,9
Редис	79,7	25,3	3,01	0,95	0,170	0,280	0,33	1,6
Горох	18,7	5,04	1,11	1,4	0,110	0,016	0,31	1,4
Горох корень	110	27,7	6,18	0,89	0,250	0,020	0,22	0,7
Овес	19,2	0,82	0,85	2,2	0,079	0,029	0,13	1,5
Овес корень	120	40,6	1,44	0,6	0,082	0,046	0,15	1,0
	Опыт				Опыт			
Салат	109	62,1	2,98	1,0	0,740	0,261	0,38	1,4
Редис	7,7	1,89	0,25	1,8	0,830	0,246	0,51	1,3
Горох	11,8	2,90	0,86	1,4	1,12	0,067	0,61	1,5
Горох корень	2,28	0,96	0,15	1,0	0,78	0,052	0,67	1,5
Овес	14,8	1,71	0,88	1,7	0,67	0,049	0,23	1,8
Овес корень	30,7	8,26	0,85	0,6	0,7	0,047	0,23	0,7

Примечание: контроль – исходная почва; опыт – почва с добавлением бактерий. Жирным шрифтом выделено повышенное содержание при сопоставлении контрольного и опытного экспериментов.

почвах с низкими содержаниями этих элементов для исходной почвы и с добавлением биопрепарата. На фоновом участке проследить закономерности в поведении химических элементов сложно, что обусловлено различной их миграционной подвижностью и низкими

содержаниями химических элементов. Прослеживается лишь тенденция увеличения содержаний кадмия в большинстве изученных фракций для опыта. На максимально загрязненном участке 4 наблюдается закономерное накопление As, Cd, Pb в органических фракциях, в том числе и фракции ЭДТА, в которой происходит основное закрепление этих элементов (табл. 1).

В результате при низких содержаниях элементов-токсикантов в почве ризосферные бактерии способствуют незначительному накоплению их в растениях, в техногенных почвах прослеживается обратная закономерность (табл. 2). По среднему содержанию химических элементов, рассчитанному для всех растений, установлено значительное снижение содержаний As, Cd, Pb в растениях, выращенных при влиянии ризосферных бактерий на максимально загрязненных почвах (рис. 1).

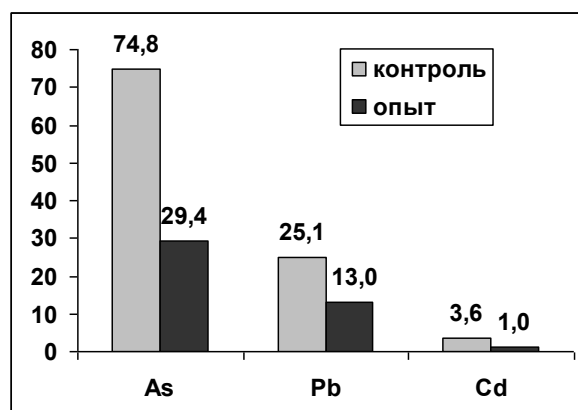


Рис. 1. Среднее содержание (мг/кг сухого вещества) тяжелых металлов и мышьяка в растениях (пшеница, овес, горох, редис), выращенных на техногенных почвах в исходных (контроль) и с добавлением ризосферных бактерий (опыт)

Содержание мышьяка, кадмия и свинца в растениях и почве имеют максимальную корреляцию с органической фракцией ЭДТА в хелатной форме, которая может играть ведущую роль в процессе миграции и бионакоплении тяжелых металлов и мышьяка микроорганизмами и растениями. Это видно на примере сопоставления содержаний мышьяка во фракции ЭДТА и в растениях (рис.2). Такое несоответствие в бионакоплении тяжелых металлов и мышьяка для фоновых и техногенных почв объясняется их формами нахождения в почве.

При высоких содержаниях тяжелых металлов в почве бактерии обладают способностью блокировать этот процесс, так как большое количество тяжелых металлов закрепляется в почве за счет ризобактерий. Это видно на примере распределения содержаний тяжелых металлов и мышьяка в вытяжке ЭДТА для участков с различной степенью загрязнения почв.

В отличие от тяжелых металлов и мышьяка, для фосфора сохраняется общая тенденция накопления его в растениях под влиянием ризосферных бактерий в условиях различного загрязнения почв, где основную стимулирующую роль, по-видимому, играет фосфобактерин (табл. 1). Снижение концентраций фосфора в растениях, выращенных на техногенных почвах, может быть обусловлено межэлементным его взаимодействием с повышенными содержаниями тяжелых металлов и мышьяка в растениях.

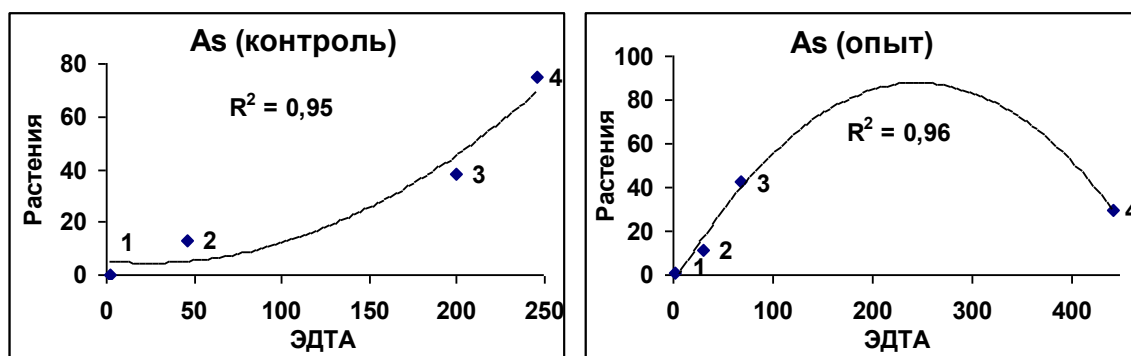


Рис. 2. Зависимость среднего содержания As (мг/кг сухого вещества) в растениях от его содержания в вытяжке ЭДТА (мг/кг). Участки: 1 – условно фоновый в 15 км; 2 – в 500 м; 3 – в 100 м; 4 – в 10 м от источника загрязнения

Проведенные исследования позволили установить закономерности влияния ризосферных бактерий на мобилизацию и иммобилизацию тяжелых металлов и мышьяка в системе «почва – растение» в условиях техногенеза и выделить основные факторы, влияющие на их миграцию. Установлена способность изученной группы ризосферных бактерий к биосорбции тяжелых металлов и мышьяка из загрязненных ими почв, что может иметь большое практическое значение при использовании новых биотехнологий в растениеводстве и для фиторемедиации почв. Изучение этой проблемы может иметь как теоретическое, так и практическое значение для понима-

ния биогеохимических циклов тяжелых металлов в системе «почва-растение» в природных и техногенных условиях и роли в них почвенных бактерий.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Томского государственного университета О. Б. Вайшля за предоставленную возможность исследования биопрепаратов. Исследования выполнены при финансировании базового проекта НИР VI.56.1.2 и VIII.69.1.6, финансовой поддержки грантов РФФИ № 12-05-00-257; № 15-05-03919.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Контроль химических и биологических параметров окружающей среды / под ред. Исаева Л.К. – СПб: эколого-аналитический информационный центр «Союз», 1998. 896 с.

2. Belimov A.A., Wenzel W.W. The role of rhizosphere microorganisms in heavy metal tolerance of higher plants // *Aspect Appl. Biol.* 2009. V. 98. P. 81-90.

3. G. A. Belogolova, M. G. Sokolova, O. N. Gordeeva, O. B. Vaishlya Speciation of arsenic and its accumulation by plants from rhizosphere soils under the influence of *Azotobacter* and *Bacillus* bacteria // *Journal of Geochemical Exploration.* 2015. V. 149. P. 52-58.

4. Sokolova M.G., Akimova G.P. Vaishlya O.B. Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2011. V.47. № 3. P. 302-307.

5. Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. Sequential extraction procedures for the speciation of particulate trace metals // *Anal. Chem.* 1979. V. 51. P. 844-851.

6. Vaishlya O.B., Amyago D.M., Guseva N.V. Role of *Bacillus Mucilaginosus* at Silicon Biogeochemical Cycle in a System “Soil – Plant” // *Mineralogical Magazine.* 2013. V. 77. P. 2383 (doi:10.1180/minmag.077.5.22).

REFERENCES

1. Belimov A.A., Wenzel W.W. The role of rhizosphere microorganisms in heavy metal tolerance of higher plants // *Aspect Appl. Biol.* 2009. V. 98. P. 81-90.

2. Belogolova G. A., Sokolova M. G., Gordeeva O. N., Vaishlya O. B. Speciation of arsenic and its accumulation by plants from rhizosphere

soils under the influence of Azotobacter and Bacillus bacteria // Journal of Geochemical Exploration. 2015. Vol. 149. P. 52-58.

3. Control over chemical and biological indices of the environment / Edited by L.K. Isayev. SPb: ecological-analytical information centre "Soyuz", 1998. 896 pp.

4. Sokolova M.G., Akimova G.P. Vaishlya O.B. Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants // Applied Biochemistry and Microbiology. 2011. V.47. № 3. P. 302-307.

5. Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. Sequential extraction procedures for the speciation of particulate trace metals // Anal. Chem. 1979. V. 51. P. 844-851.

6. Vaishlya O.B., Amyago D.M., Guseva N.V. Role of Bacillus Mucilaginosus at Silicon Biogeochemical Cycle in a System "Soil – Plant" // Mineralogical Magazine. 2013. V. 77. P. 2383 (doi:10.1180/minmag.077.5.22).

УДК 601.4 579.64

**РАСТЕНИЯ – ПРОДУЦЕНТЫ МИКРОБНЫХ ФИТАЗ:
ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД БИОТЕХНОЛОГИИ**

Валеева Л.Р.¹, Нямсурэн Ч.¹, Трошагина Д.С.¹, Шарипова М.Р.¹,
Шакиров Е.В.²

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, 420008, Россия, г. Казань, ул. Парижской коммуны, 9, lia2107@yandex.ru

²University of Texas at Austin, Section of Integrative Biology, Austin, TX, 78712 USA

Фосфор играет важную роль в функционировании живых организмов в составе таких молекул, как АТФ, фосфолипиды мембран, нуклеиновые кислоты, сигнальные мессенджеры. Исследование фосфорного метаболизма имеет фундаментальное и практическое значение. В связи с сокращением природных запасов минерального неорганического фосфора с каждым годом ощутимой становится

проблема фосфорного дефицита в питании живых организмов [8]. Почвенный фосфор представлен, в основном, органическими соединениями, большая их часть является труднодоступной для растений и животных (фитаты). Фитат (мио-инозитол гексакисфосфат) – лимитирующий фактор роста растений [11]. Растения не способны усваивать фосфор из фитата, хотя его содержание в семенах достигает 60-80% [4]. Фитат, как естественный компонент растительной пищи и корма, ограничивает фосфорное питание животных с однокамерным желудком. Кроме того, фитат связывает многие ионы металлов, белки и сахара, что так же мешает их усвоению [4; 7]. Решением проблемы фосфорного дефицита в питании живых организмов является использование фитата в качестве источника фосфора. Гидролиз мио-инозитол гексакисфосфата осуществляется под действием ферментов фитаз. Растения и животные не синтезируют внеклеточные фитазы, такие ферменты в природе синтезируют многие почвенные микроорганизмы [8].

Цель работы - разработка системы экспрессии микробной фитазы *Pantoea agglomerans* в растениях. Растения *A. thaliana* благодаря короткому жизненному циклу и знанию последовательности генома послужили основой для создания растений, экспрессирующих микробные фитазы.

Векторы и штаммы. Для трансформации растений использовали бинарный вектор pCEV04 с интегрированным модифицированным геном фитазы *P. agglomerans* *AtEx::paPhyC::HisStrep-Tag*. Конструкция экспрессионной системы содержала последовательность гена сигнального пептида экстенсина (*AtEx*), оптимизированный ген фитазы *paPhyC*, *His* и *Strep-Tag* последовательности. Для экспрессии в растениях использовали конститутивный сильный вирусный промотор *CaMV35S*, а также маркерный ген (*bar*) устойчивости к гербициду BASTA под управлением нопаинового промотора и терминатора.

Растения A. thaliana. Для получения трансгенных растений использовали *A. thaliana* (экотип Columbia). Растения-реципиенты дикого типа выращивали на почве в климат-камере с поддержанием условий роста, оптимальных для арабидопсиса: фотопериод 12 ч. день/12 ч. ночь, 20°C. Для трансформации использовали цветущие растения в возрасте 3-4 недель.

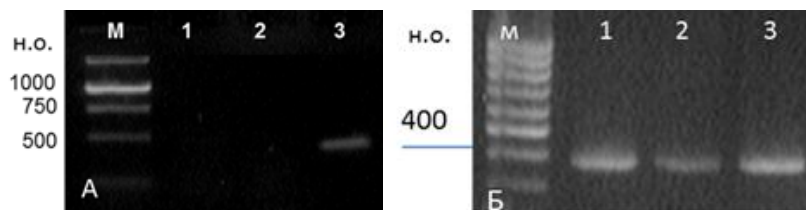


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации ДНК трансгенных растений: А – ПЦР для растений с интегрированным геном фитазы *P. agglomerans* под управлением промотора *CaMV35S* (линии E). Размер ПЦР-продукта около 500 п.о. М – маркер; 1 – O1-1 (отрицательный контроль); 2 – O1-2 (отрицательный контроль); 3 – линия E-1. Б – ПЦР на контрольной линии трансгенных растений без гена фитазы (линия O1). Ожидаемый размер ПЦР-продукта – 400 п.о. М – маркер; 1 – O1-1; 2 – O1-2; 3 – плазмидная ДНК (положительный контроль)

Трансформация растений и получение нескольких поколений трансгенных растений. Получили 3 независимые линии (E1, E2, E3 линии) растений T1 при использовании вектора *rCEV04* на основе вирусного промотора *CaMV35S*, содержащего модифицированный ген бактериальной фитазы *raPhyC*. Наличие вставки подтвердили ПЦР (рис.1А). Во втором поколении сегрегация признака трансгенной вставки составила 15:1 у четырех линий растений (E2-7, E2-16, E3-4, E3-5). Получили контрольную линию трансгенных растений без встроенного гена фитазы (O1 линия), содержащую лишь промотор *CaMV35S*. Наличие трансгенной вставки подтверждено ПЦР (рис.1Б). От растений линий E2-7, E3-4 и O1-1 получили растения третьего поколения с расщеплением по трансгенной вставке близкой 15:1: E2-7-5, E3-4-3, O1-1-5.

Экспрессия РНК гена фитазы в тканях трансгенных растений. Для растений второго поколения с геном фитазы под управлением промотора *CaMV35S* получили ПЦР-продукты 500 кДа; геномная ДНК в пробах не присутствовала (рис. 2А).

Провели анализ экспрессии РНК фитазы в линиях растений третьего поколения. кДНК амплифицировали с использованием праймеров к началу и концу гена фитазы *raPhyC* (рис.2Б).

Синтез стабильной РНК модифицированного гена фитазы в тканях растений подтвердили секвенированием продуктов амплификации с кДНК транскриптов.

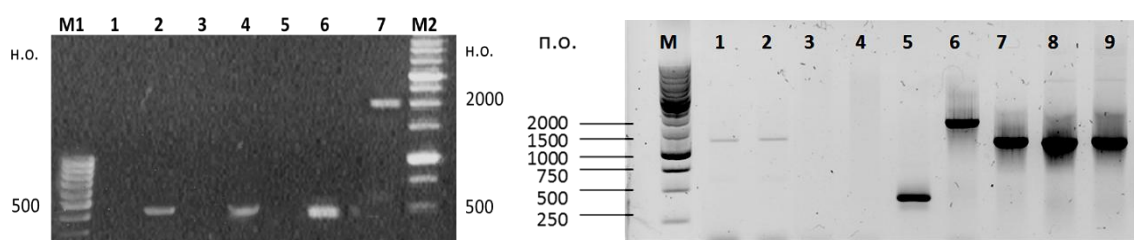


Рис. 2. Электрофорез продуктов амплификации кДНК трансгенных растений второго поколения. А – М1, М2 – ДНК маркеры; 1 – отрицательный контроль, Е1 - 1 (праймеры к растительному промотору); 2 – Е1-1; 3 – отрицательный контроль, Е1-2 (праймеры к растительному промотору); 4 – Е1-2; 5 – отрицательный контроль, Е1-3 (праймеры к растительному промотору); 6 – Е1-3; 7 – положительный контроль, плазмидная ДНК. Ожидаемый размер ПЦР-продукта 500 н.о. Б – М – ДНК маркер; 1 – Е2-7-5; 2 – Е3-4-3; 3 – отрицательный контроль, Е2-7-5 (праймеры к промотору и терминатору); 4 – отрицательный контроль, Е3-4-3; 5 – геномная ДНК О1-1-5 (праймеры к промотору и терминатору, около 400-500 п.о.); 6 – геномная ДНК Е2-7-5 (праймеры к промотору и терминатору, 1800 п.о.); 7 – геномная ДНК Е2-7-5 (праймеры к гену фитазы, 1200 п.о.); 8 – положительный контроль, плазида рСВК05 35S::раPhyC (1800 п.о.); 9 – положительный контроль рСВК05 35S::раPhyC (1200 п.о.)

Создание трансгенных растений с использованием генов микробных фитаз является перспективным направлением в решении проблемы дефицита фосфора в питании живых организмов. Бактериальные фитазы обладают высокой активностью и специфичностью и представляют интерес для создания экспрессионных систем для трансформации растительных клеток. Кислые бактериальные и грибные фитазы широко используются в трансформации растений, причем фитазная активность трансгенных растений, экспрессирующих рекомбинантные кислые фитазы, значительно возрастает по сравнению с диким типом растений, что позволяет таким растениям расти на средах с фитатом [10; 1]. Мы использовали ген кислой фитазы группы HAPs из *P. agglomerans*. Клонирование целевого гена

под управление сильного конститутивного промотора позволило получить высокую экспрессию рекомбинантного белка [3].

Скрининг растений по признаку устойчивости к гербициду BASTA позволил отобрать 3 линии растений с множественной вставкой гена фитазы, и линию без интегрированного гена фитазы с одной копией трансгена в геноме. Проблемой при создании трансгенных растений является элиминация гена. Показано, что во втором и в третьем поколениях растений ген бактериальной фитазы стабильно экспрессировался на уровне транскрипции. Это подтвердило экспрессию белка для полученных линий растений в ряду поколений, что необходимо при получении гомозиготных по трансгенной вставке растений.

Таким образом, разработана гетерологичная система экспрессии гена микробной фитазы в растениях *A. thaliana*, на основе которой получены три поколения трансгенных растений со множественной вставкой интегрированного гена фитазы *P. agglomerans*, стабильно экспрессирующегося на уровне РНК.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров, частично за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект №14-83).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Bilyeu K.D., Zeng P., Coello P., Zhang Z.J., Krishnan H.B., Bailey A., Beuselinck P.R., Polacco J.C. Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase // *Plant Physiology*. 2008. V. 146. P. 468–477.
2. Clough S.J., Bent A. F. Floral dip: a simplified method of Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Journal*, 1998. V.16(6). P. 735-743.
3. George T.S., Richardson A.E., Hadobas P.A., Simpson R.J. Characterization of transgenic *Trifolium subterraneum* L. which expresses phyA and releases extracellular phytase: growth and P nutrition in la-

boratory media and soil // Plant, Cee and Environment, 2004. V. 27. P. 1351-1361.

4. Haefner S., Knietsch A., Sholten E., Braun J., Lohscheidt M., Zelder O. Biotechnological production and applications o phytases // Microbiol. Biotechnol, 2005. V.68. P. 588-597.

5. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol Plant, 1962. V. 15. P. 473–497.

6. Plaxton W.C., Tran H.T. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants // Plant physiology, 2011. V. 156. P. 1006-1015.

7. Rao K.V, Rao T.P., Reddy V.D.. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview // Critical Reviews in Biotechnology, 2009. V. 29(2). P. 182–198.

8. Richardson A. Extracellular secretion of *Aspergillus phytase* from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate // The Plant Journal. 2001.V. 25(6). P. 641-649.

9. Singh B., Satyanarayana T. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion // Physiol. Mol. Biol. Plants, 2011. V. 17. P. 93–103.

10. Wang, Y., Ye X., Ding G., Xu F. Overexpression of phyA and appA genes improves soil organic phosphorus utilisation and seed phytase activity in *Brassica napus* // PLoS ONE. 2013. V. 8(4). P. 1-9.

УДК: 634.11: 581

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ
ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ**

С.Г. Долгих, А.Б. Нурдинова

Казахский научно-исследовательский институт плодоводства и виноградарства, Казахстан, 050060, г. Алматы, пр. Гагарина 238/5
e-mail: Dolgikhsvet@mail.ru

Производство высококачественного посадочного материала является важным направлением развития современного садовод-

ства. Переход на интенсивные сады возможен с созданием мощной базы маточников клоновых подвоев и перевод питомников на выращивание высококачественного безвирусного материала, отвечающего современным требованиям.

Использование биотехнологических методов в питомниководстве позволяет повысить эффективность оздоровления растений до 100%, в 5-10 раз и более увеличить коэффициент размножения и на 2-3 года ускорить внедрение новых оздоровленных сортов и форм в производство [3].

В большинстве стран (США, Италии, Великобритании, Голландии, Новой Зеландии, Франции) производство по выпуску оздоровленного посадочного материала плодовых и ягодных культур с использованием метода клонального микроразмножения поставлено на промышленную основу с дальнейшей тенденцией увеличения такого посадочного материала. Для удовлетворения спроса на внутреннем рынке Казахстана на безвирусный посадочный материал лаборатория биотехнологии Казахского НИИ плодоводства и виноградарства в настоящее время работает над проблемой создания базисных, базовых и репродуктивных маточных насаждений ценных форм клоновых подвоев яблони.

Один из самых перспективных путей оздоровления и ускоренного размножения клоновых подвоев яблони является клональное микроразмножение.

Цель: разработать технологию производства безвирусного посадочного материала клоновых подвоев яблони на основе клонального микроразмножения *in vitro* с использованием ДНК технологий.

Для проведения исследований были использованы интродуцированные и местной селекции, выделившиеся по ценным хозяйственно-биологическим признакам, включенные в «Государственный реестр селекционных достижений», допущенных к использованию в Республике Казахстан клоновые подвои яблони из коллекции Помологического сада: Арм18, Б7-35, Б16-20, 62-396 и Жетысу 5. Подвои Б16-20 и Б7-35 - получены на Буйнакской опытной станции садоводства Д.Н. Крыловым, Р.Г. Цаболовым (Дагестан). Арм 18 - выведен в Армянском НИИ виноградарства, виноделия и плодоводства (г. Ереван) селекционером Л.А. Апояном. Подвой 62-396 - выделен из гибридного фонда В.И. Будаговского

Мичуринского Государственного аграрного университета. Подвой Жетысу 5 -полукарликовый клоновый подвой яблони, селекции Казахского НИИ плодоводства и виноградарства.

Организация работ проводилась на основе методических указаний: «Производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных культур и винограда методом клонального микроразмножения» [4]; Методические указания по клональному микроразмножению подвоев и сортов яблони [5]; и собственных запатентованных исследований: № 9205 от 1999 г. [1]; № 46336 от 2004 г. [2]. Исследования по молекулярно-генетической оценке проводились методом ПЦР по протоколам Российской фирмы «Биоком». Фотографии агарозных гелей анализируют в программе Cross Checker 2,91 с составлением бинарных матриц присутствия /отсутствия фрагментов одинаковой длины.

При введении апексов клоновых подвоев яблони в культуру тканей на этапе стерилизации установлено, что активный хлор в концентрации 10% при экспозиции 5 минут имеет стерилизующий эффект -90%, активный хлор 20% при экспозиции 3 минут - 92-95 %, однако при такой концентрации наблюдается сильный химический ожог и до 20% апексов погибают. Стерилизующий эффект Диоксида 0,01% в экспозиции 5 минут составляет 85-87 % при полном отсутствии химического ожога.

На этапе регенерации в питательную среду вводили аминокислоту пролин и АТФ. Установлено, что пролин эффективен на этапе регенерации, т.е. когда растение испытывает стресс от введения в культуру тканей. Введение пролина увеличило процент регенерации апексов подвоев на 10-15%, влияние АТФ было неоднозначно для всех форм изучаемых подвоев. Наиболее отзывчивыми на введение АТФ были подвои Арм 18 и Б7-35 с 8-10% увеличением регенерации, у остальных подвоев этот показатель был ниже 5%.

Для активизации этапа пролиферации изучался цитокинин 6-БАП в разных концентрациях. Наиболее эффективным оказался БАП в концентрации 2,0 мг/л, обеспечивающий хорошее развитие побегов и максимальный коэффициент размножения до 8,4 на один пассаж (табл. 1).

Установлено, что для некоторых форм клоновых подвоев яблони постоянное присутствие в составе среды повышенных концен-

траций БАП вызывает образование витрифицированных побегов, вследствие этого более низкий процент растений, пригодных для укоренения. При этом нарушается технологический цикл получения растений-регенерантов, и теряется растительный материал *in vitro*. Наиболее подвержены витрификации тканей подвой яблони 62-396 и Б 16-20. Исследования показали, что для устранения витрификации при культивировании этих подвоев яблони целесообразно снижать содержание в среде БАП до 0,5-1,0 мг/л.

Таблица 1. Влияние цитокинина – 6-БАП на пролиферацию клоновых подвоев яблони

Подвой	Цитокинины, мг/л	Коэффициент размножения, за один пассаж, шт.	Количество побегов, пригодных для укоренения, %
62-396	БАП -1	5,0	90,0
	БАП -2	6,0	75,0
	БАП- 0,5	4,0	20,0
Арм18	БАП -1	6,0	100
	БАП-2	8,4	85,0
	БАП-0,5	3,0	18,3
Б7-35	БАП -1	4,0	90,0
	БАП-2	5,5	87,0
	БАП -0,5	2,6	14,4
Б16-20	БАП -1	3,8	90,1
	БАП-2	4,6	74,0
	БАП -0,5	3,2	16,0
Жетысу 5	БАП -1	4,0	100
	БАП-2	6,9	90,0
	БАП-0,5	3,0	15,0
НСР ₀₅		0,7	

Изучено влияние ауксинов и модифицированных сред (среды – McIlwain, Lloyd (WPM) и Schenk, Hildebrandt) [6] на активизацию ризогенеза микроклонированных клоновых подвоев яблони. Установлено, что ИМК в составе питательной среды на 15-20% эффективнее, чем ИУК в среднем по всем изучаемым подвоям.

В качестве минеральной основы наиболее подходят разбавленная вдвое среда Мурасиге-Скуга и WPM, содержащие набор витаминов как в средах для размножения и 20 г/л сахарозы. На рис. 1 представлено корнеобразование подвоя Арм.18 на среде WPM.

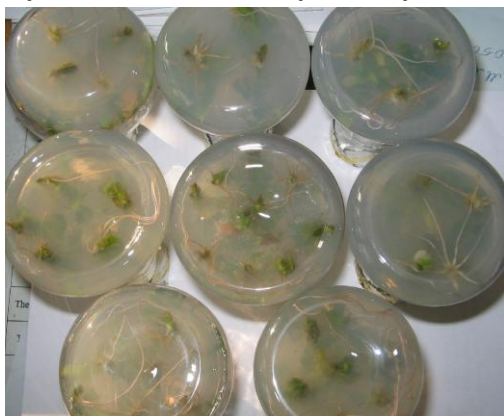


Рис. 1 Укоренение клонового подвоя яблони Арм.18 на среде WPM

В среднем на этой среде укоренилось до 75% микрорастений подвоя, на среде Schenk, Hildebrandt – 40% при 50% укоренении на контроле (рис. 2).

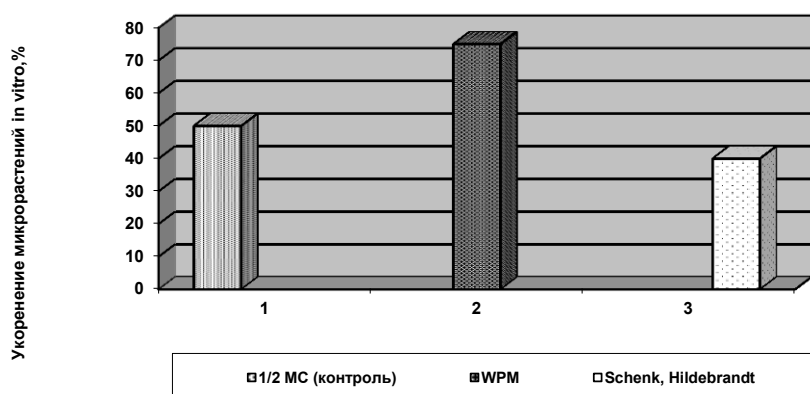


Рис. 2 Влияние питательной среды на ризогенез подвоев яблони *in vitro*

Генотипирование клоновых подвоев яблони – Арм.18, Жетысу-5, Б 16-20, Б7-35 и 62-396 проводилось 11 ISSR маркерами: M2 - (ac)₈(ct)g, M4- (ag)₈(ct)c, M7-(cag)₅, M8-(gtg)₅, M9- gac-acg-aca-cga-cac-gac-ac, M10- (cac-aca)₂(ag)g, M11- (cac-aca)₂(ag), M13- (cac-aca)₂(ag) (ct), UBC855- (aca-cac)₂ccy-t, UBC868- (gaa)₆ и UBC881-ggg-tgg-ggt-ggg-gtg.

Определена температура отжига 11 праймеров для проведения ПЦР.

Изначально температура отжига праймеров была рассчитана по формуле:

$$T = 4^{\circ}\text{C} \times (C+G) + 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) - 3,$$

где G, C, A, T – количество цитозиновых, гуаниновых, адениновых и тиминовых оснований, соответственно.

Таблица 2 - Характеристика молекулярных данных клоновых подвоев яблони

Подвой	Размеры фрагментов, пн								
	Маркеры								
	M4	M10	M7	M11	M13	UBC 881	M8	M2	M9
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Жетысу-5	240, 300	180, 240, 280, 350, 400, 470, 550, 650, 990	240, 330, 400, 490, 820, 1000		400, 800, 950, 1200, 1450		250, 350, 500, 600, 800, 900, 1300, 1900	200, 250, 700,	200, 300, 380, 450, 630, 700, 800, 1100, 2250
Арм18	240, 300	180, 200 , 240, 280, 350, 400, 470, 550, 650	220 , 240, 270, 300, 400, 490, 680, 820	320 , 500, 1000	270, 380 , 600 , 800, 1450	400	250, 350, 500, 600, 900, 1300, 2000	200, 250, 500, 600	200, 230, 350, 380, 630, 700, 800, 1100
Б7-35	240, 300	280, 350, 400, 470, 550, 650	270, 300, 400, 490, 700 , 820	500, 1000	270, 400		250, 350, 500, 600, 700 , 1000 , 1900	250, 350 , 500, 600	200, 230, 350, 380, 630, 700, 1100
Б16-20	240, 300, 370, 550, 690	280, 350, 400, 470, 550, 650, 990	200, 270, 300, 330, 400, 490, 680, 820, 900 , 1000, 1200	500, 600 , 950, 1100 , 1500	400	600 , 400, 500 , 1100 , 1350	250, 370 , 500, 650 , 1970	200, 250, 400, 600, 770	200, 230, 450, 630, 700, 800
62-396	240, 300	350, 400, 470, 650, 990	200, 240, 270, 300, 490, 680, 820, 1000, 1500	950	400, 800, 950, 1200, 1450		250, 350, 600, 770 , 800, 1000, 1500	200, 250, 400, 500, 560 , 750 , 900	200, 230, 380, 630, 700, 800

В дальнейшем эмпирически подобрали оптимальную температуру отжига праймеров путем уменьшения или увеличения ее, в зависимости от качества получаемого ПЦР-продукта. Оптимальная температура отжига олигонуклеотидов составила: M2-49,5⁰C; M4-50,8; M7-52,7-55,0; M8-52,7; M9-50,0; M10-44,8⁰C; M11-44,8⁰C; M13-49,5; UBC868; UBC855 и UBC881 – 51,0⁰C. Амплификация 5 форм подвоев проведена с 11 молекулярными маркерами и электрофоретическое разделение продуктов амплификации. Получены и про-

анализированы фотографии продуктов амплификации ДНК 5 форм клоновых подвоев яблони по 9 молекулярным маркерам (табл.2), за исключением олигонуклеотидов UBC868; UBC855, при амплификации с которыми не получены ампликоны.

Всего получено 217 ампликонов, из них 31 информативных (выделены жирным шрифтом), описывающие уникальные сайты ДНК клоновых подвоев яблони.

Установлены уникальные участки ДНК, охватывающие от 200 до 22500 пар нуклеотидов. Подвой Б16-20 идентифицируется шестью маркерами: М4, М7, М11, М8, М2 и UBC 881. Подвои 62-396 и Б7-35 идентифицируются по трем маркерам М7, М8 и М2. Подвой Жетысу 5 идентифицируется по двум маркерам М8 и М9, Подвой Арм.18 идентифицируется по пяти маркерам – М7, М8, М10, М11 и М13. Наименьшую информативность имел маркер М 10, у всех изучаемых ДНК клоновых подвоев не обнаружено уникальных ампликонов. Олигонуклеотид UBC 881 идентифицировал только подвой Б16-20.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Долгих С.Г., Избасаров Д.С., Нусипкожаев Е.Б. Способ микрклонального размножения плодовых растений / Патент №9205, заявл. 11.03.1999.
2. Долгих С.Г., Избасаров Д.С. Способ выращивания саженцев семечковых культур *in vitro* / Патент № 46336, 2004.
3. Куликов И.М., Воробьев В.Ф., Косякин А.С., Конькова Н.А. Стратегия развития садоводства и питомниководства РФ до 2020 // ж. Садоводство и виноградарство, № 1, 2011, -с.10-13.
4. Методические указания по клональному микроразмножению подвоев и сортов яблони. - Москва. - 1984. - 20 с.
5. Производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных культур и винограда методом клонального микроразмножения.- Агропромиздат.- Москва. -1989. -8 с.
6. McIown, Lloyd (WPM) (1980), Anderson (1978), Schenk, Hildebrandt, (1972). Plants from test tubes / An Introduction to Micropropagation. – Revised Edition. Lydian Kyte. Timber Press. Portland. Oregon, 1987. P.160

УДК 634.8:581.143.6

ПРОИЗВОДСТВО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ВИНОГРАДА, ОБЛАДАЮЩЕГО ВЫСОКОЙ АДАПТИВНОСТЬЮ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

С.Г. Долгих¹, Л.Ж. Уранбекова²

¹Казахский НИИ плодоводства и виноградарства», г.Алматы,

² Казахстанский инженерно-технологический университет, г. Алматы

¹Казахский научно-исследовательский институт плодоводства и виноградарства, Казахстан,

050060, г. Алматы, пр. Гагарина 238-5, e-mail: Dolgikhsvet@mail.ru

Виноград имеет важнейшее значение в питании человека, обеспечивая его необходимыми для организма витаминами и другими биологически активными веществами. Особенно они важны для населения экологически неблагоприятных районов.

В некоторых районах Казахстана, в результате выбросов в атмосферу отходов промышленных предприятий, сформировались биогеохимические территории с недопустимо высоким содержанием в почве и растениях тяжелых металлов. К наиболее опасным загрязнителям почв, отравляющим виноград на юге и юго-востоке Казахстана относятся тяжелые металлы: свинец, кадмий и цинк. Интегральное загрязнение диктует необходимость решения проблемы подбора сортов, обладающих комплексной устойчивостью к приоритетным загрязнителям с разработкой способов нейтрализации последствий тяжелых металлов на растения. Генетическая варибельность по толерантности к этим металлам отмечена у разных сортов винограда. Известно, что присутствие в почве ионов Zn^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} ведет к нарушению функционирования токсических ионов в клеточных стенках, митохондриях, ядре и в целом, ведет к снижению энергоемкости клеток.

Выращивание качественной продукции винограда на таких загрязненных землях имеет актуальное значение. Поэтому сейчас необходимы высокоэффективные технологии размножения оздоровленного посадочного материала устойчивого к абиотическим факторам среды.

Около 40% виноградников Казахстана произрастает на лугово-черноземных засоленных почвах с избыточным содержанием бора – 0,15-4,42 мг/кг хлоридов и сульфатов [1]. В этих условиях поглощение микроэлементов растениями затрудняется из-за повышенной подвижности бора, связанной с увеличением концентрации в почве легкорастворимых солей хлоридов и сульфатов. Это нарушает режим питания виноградников, что отрицательно сказывается на урожае и его качестве [2].

При закладке базовых виноградных маточников на таких биогеохимических территориях ценность безвирусного посадочного материала нивелируется токсическим действием бора и тяжелых металлов.

Цель исследований - изучить сорта и клоны винограда, обладающие комплексной устойчивостью к приоритетным загрязнителям для производства безвирусного посадочного материала с разработкой способов повышения адаптивности винограда к бору, цинку, кадмию и свинцу при культивировании *in vitro*.

Объекты и методы исследований – перспективные, выделенные по хозяйственно-ценным признакам востребованные производством шесть сортов винограда: Илийский, Саперави, Алиготе, Алмалы, Береке, выращиваемые на коллекционном участке Помологического сада.

Для оздоровления и ускоренного размножения винограда использовали культуру изолированных тканей. В качестве экспланта были взяты меристемы тронувшихся в рост почек вызревшей лозы (с марта по май). Размер оптимальных эксплантов для размножения винограда 0,5-2,0 мм. Экспланты культивировали на жидкой питательной среде с цитокинином – 6 бензиламинопурином (6-БАП). В состав питательной среды входили макро и микро соли по Мурасиге и Скуга, двойное количество хелата железа; витамины: аскорбиновая кислота – 1 мг/л, тиамин – 10 мг/л, пиридоксин – 5,5 мг/л, никотиновая кислота 4,5 – мг/л, парааминобензойная кислота – 5 мг/л, мезоинозит – 75 мг/л; аминокислоты: глицин – 10 мг/л, глутамин – 50 мг/л; углеводы: сахароза – 30 г/л и регуляторы роста: цитокинин – 6-БАП -1 мг/л.

Энергоемкость растений определяли тестером ДМ-6013 L, который калибровался по стандартным конденсаторам. При измере-

нии емкости два электрода тестера накладывались сверху на лист (без введения электродов в ткань листа) и после стабилизации показаний брался отсчет по цифровому датчику прибора. Энергоемкость определяется в микрофарадах (мкф), $1 \text{ мкф} = 10^{-6} \text{ ф}$. За единицу емкости (1 фарада) принимается емкость (С) такого конденсатора, который накапливает заряд в один кулон (1 кл) при напряжении (U) между обкладками в один вольт: (1В): $C = q/U$.

Перед введением в культуру тканей апексы винограда стерилизовали, т.к. эффективное размножение *in vitro* на начальном этапе культивирования тесно связано с получением асептических эксплантов. При введении в культуру тканей поверхностную инфекцию устраняли с помощью триклозана в составе мыла, диоцидом и гипохлоритом натрия.

Последовательная стерилизация почек винограда триклозаном и диоцидом в период выхода их из состояния покоя, обеспечивала 100% исключение контаминации. Хлор был эффективен на 100% при стерилизации вегетативных зеленых побегов. При культивировании апикальных меристем винограда на жидкой питательной среде через 30 дней они увеличивались в размере до 1-2 см. Их повторно пассировали на жидкую питательную среду и по достижении побегов винограда длины 4 см с 6-8 почками, разрезали на 2-3 микрочеренка с одним-двумя почками и культивировали каждый на свежей питательной среде. Отмечена сортовая реакция на этапе пролиферации, с коэффициентом размножения от 2,9 до 5,8 в зависимости от сорта (табл.1).

Таблица 1. Влияние состава питательной среды на пролиферацию различных сортов винограда

Сорт	Коэффициент размножения, шт./экспл. 1 пасаж	Длина побега, см	Число узлов, шт.
Илийский	$2,9 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3$
Алиготе	$3,5 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,3$
Саперави	$5,6 \pm 0,8$	$4,2 \pm 0,4$	$4,0 \pm 1,0$
Алмалы	$3,0 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,6$	$4,8 \pm 0,4$
Береке	$4,8 \pm 0,6$	$0,4 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,2$

На данной питательной среде за один пассаж наивысший коэффициент размножения $5,6 \pm 0,8$ отмечен у Саперави. Длина побега и число узлов на микрорастении в целом не зависели от коэффициента размножения.

Микрорастения с длиной побегов более 1 см укореняли на модифицированной жидкой питательной среде. Нами предложен способ укоренения винограда *in vitro* на целлюлозной стерильной вате, пропитанной жидкой питательной средой. Формирующиеся корни пронизывают вату и при пересадке в условия *ex vitro* растения помещали в почвенную смесь вместе с ватой, что обеспечивало лучшую приживаемость и исключало ломкость корней [3].



Регенерация винограда in vitro



Микрочеренкование и укоренение винограда in vitro



Доращивание растений винограда в теплице

Первые 2 недели после переноса растений винограда из условий *in vitro* в условия *ex vitro* создавали повышенную влажность, закрывая микрорастения пленкой или каждое растение химическим стаканчиком. Лучшее время перевода растений в теплицу март-апрель. На рисунке представлена технология производства элитного посадочного материала винограда.

Осенью, к концу вегетации саженцы вырастают до стандартных размеров, после опадения листьев их выкапывают и в холодильнике хранят до посадки в маточник.

Особый интерес представляет изучение толерантности растений винограда к цинку, кадмию и свинцу, поскольку эти тяжелые металлы являются наиболее опасными загрязнителями почв на юге и юго-востоке Казахстана.

Известно, что устойчивость к различным ионным стрессам не является феноменом, который выражается исключительно на уровне целого организма. Устойчивость к ионному стрессу у растений, прежде всего, обусловлена наличием клеточных механизмов устойчивости. Поэтому прикладные исследования по повышению устойчивости винограда к тяжелым металлам на уровне культуры клеток и тканей являются актуальными.

В связи с этим изучались сорта и клоны винограда, обладающие комплексной устойчивостью к приоритетным загрязнителям для производства безвирусного посадочного материала с разработкой способов повышения адаптивности винограда к цинку, кадмию и свинцу в процессе клонального микроразмножения *in vitro*.

В результате проведенных исследований было установлено, что тяжелые металлы вызывали снижение энергоемкости тканей листьев и корней, что отрицательно сказывалось на эффективной работе мембраны клеток. Наблюдались сортовые различия по воздействию тяжелых металлов на энергоемкость тканей. Наиболее устойчивым был сорт Алиготе, далее Ркацители, Илийский, Саперави и Береке - соответственно коррелятивно снижалась энергоемкость их тканей. Энергоемкость сортов винограда, выращиваемых на фоне тяжелых металлов соответствовала следующим значениям: Алиготе – 0,66 мкф; Ркацители – 0,85 мкф; Илийский – 0,72; Саперави – 0,59 мкф; Береке – 0,48 мкф. Известно, что аденозинтрифосфат (АТФ) является очень энергоемким соединением, а токсическое действие тяжелых металлов связано с недостатком внутриклеточной АТФ и ГТФ.

Исследования по изучению толерантности сортов винограда проводили в культуре тканей, на фоне токсичных концентраций солей Zn^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} , введенных в состав питательной среды. Ориентируясь на имеющиеся в литературе данные об уровнях накопления тяжелых металлов в тканях растений (как в норме, так и в условиях химического загрязнения) [2], и учитывая результаты наших предварительных экспериментов [4], изучалась концентрация 5ПДК солей тяжелых металлов [$Pb(NO_3)_2$; $ZnSO_4$ и $CdSO_4$], в составе агаризованной питательной среды.

Для детоксикации тяжелых металлов в питательную среду вводились аминокислоты: цистеин, пролин, глицин и сумма аминокислот.

Цистеин был взят для исследований, поскольку известно, что тяжелые металлы в клетке связываются фитохелатинами, которые представляют собой цистеин богатые, растворимые белки – металло-тионеины с низкой молекулярной массой.

Пролин является универсальным защитным механизмом от различных стрессовых факторов, его накопление клетками определяет: осморегуляцию, защиту клеточных мембран и ферментов, консервацию энергии для послестрессового роста.

Аминокислота глицин является регулятором обмена веществ, а также исходным веществом наряду с пиридоксаль-Р и сукцинил-СоQ для биосинтеза протопорфирина, который в свою очередь является общим предшественником хлорофиллов, железопорфириновых соединений и ферментов каталазы и пероксидазы, играющих важную роль в дыхании растений и нейтрализации перекиси водорода.

Тяжелые металлы и аминокислоты вводились в питательную среду Мурасиге-Скуга на этапе регенерации винограда. Вводимая концентрация каждой аминокислоты – 10 мг/л.

На рисунке 1 показана регенерация апексов винограда на фоне тяжелых металлов с аминокислотами.

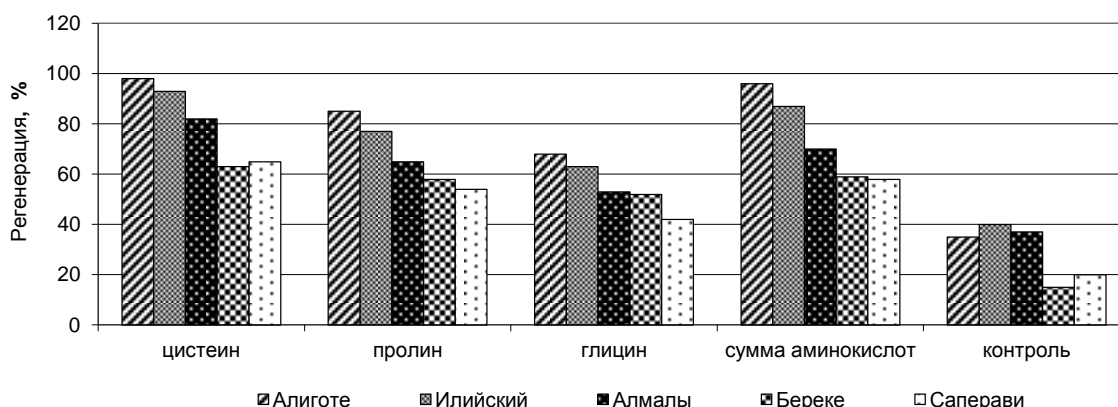


Рис. 1. Регенерация апексов винограда на фоне 5ПДК тяжелых металлов с аминокислотами

Как видно из рисунка наблюдалась сортовая изменчивость по устойчивости к тяжелым металлам и адаптации к ним с помощью аминокислот. Наименьшей устойчивостью отличались сорта Береке

и Саперави у которых регенерировало 15-20% апексов соответственно. Несмотря на изначально низкую толерантность к тяжелым металлам сорта Береке, аминокислоты оказали довольно сильное воздействие на повышение его адаптивности (в среднем по всем аминокислотам на 43%). Наибольшая отзывчивость на действие аминокислот отмечена у сорта Алиготе (в среднем на 52%) и Илийский (39%). Меньше у Алмалы (31%) и Саперави (33,5%). Наиболее активной аминокислотой в снятии стресса и повышении адаптивности был цистеин – в среднем по сортам 80,2% и сумма аминокислот – 74%, ниже пролин -68% и глицин -55%.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что при выращивании безвирусного посадочного материала винограда в культуре *in vitro*, возможно, одновременно оценивать толерантность сортов винограда к тяжелым металлам и увеличивать адаптацию винограда включением в состав питательных сред свободных аминокислот: цистеина, пролина и глицина.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Избасаров Д.С., Коваленко Е.М. Оптимизация питания виноградников, произрастающих на почвах с избыточным содержанием солей и бора. // Вестник АСХН Казахстана.- 2001 №1 .- с. 31-36.
2. Адрианова Г.П., Драгавцева И.А., Зелепухин В.Д., Кехаев В.К., Коваленко Е.М., Савин И.Ю., Святкина О.А. Экологизация садоводства в Краснодарском крае и в южных районах Казахстана. г. Краснодар.- 2004. - 141 с.
3. Долгих С.Г. Гусакова Л.С. Патент № 61335 от 22.09.2008. Способ укоренения винограда *in vitro*. Приоритет 22.09.08.
4. Долгих С.Г. Влияние цистеина и тяжелых металлов на регенерационные процессы винограда *in vitro* / Актуальные проблемы производства и переработки с.-х. продукции в условиях рыночной экономики.//Материалы межд. научно-практической конференции. - г. Алматы.-2-3 ноября.-2006. - С.245-249.

УДК 636.085.13

БИОКОНВЕРСИЯ ПРОТЕИНА И ЭНЕРГИИ КОРМА В БЕЛОК И ЭНЕРГИЮ ТЕЛА БЫЧКОВ

Р.С. Исхаков, Х.Х. Тагиров

ФГБОУ ВПО Башкирский государственный аграрный университет
450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34. Тел./факс 8-347-248-28-70,
tagirov-57@mail.ru

В результате сравнительной оценки качественных показателей мясной продуктивности бычков черно-пестрой породы и ее помесей с абердин-ангусами и лимузинами с учетом эффективности биоконверсии питательных веществ и энергии корма в питательные вещества и энергию мясной продукции установлено превосходство помесных животных по оцениваемым показателям. Помеси обладали лучшей трансформацией кормового протеина и энергии рационов в съедобную часть тканей тела.

Ключевые слова: черно-пестрая, лимузинская, абердин-ангусская, помеси, мясная продуктивность, конверсия.

Одной из актуальных задач агропромышленного комплекса России является увеличение производства и повышение качества мяса. Основным источником говядины в настоящее время являются животные молочных и комбинированных пород скота [2,3].

Большинство молочных пород крупного рогатого скота по своим хозяйственно-биологическим свойствам имеют высокие потенциальные возможности для увеличения производства молока и мяса. Это, прежде всего, касается черно-пестрой породы, которая в России получила значительное распространение [1-3]. Отличаясь рядом хозяйственно-биологических признаков, животные этой породы характеризуются относительно низкой мясной продуктивностью, которую можно повысить путем межпородного промышленного скрещивания с быками мясных пород [1], при создании надлежащих условий кормления и содержания [4,5].

В настоящее время в мясном скотоводстве эффективно используются абердин-ангусская и лимузинская породы, которые ха-

рактируются высокой мясной продуктивностью и хорошим качеством мяса.

Скращивание коров черно-пестрой породы с быками абердин-ангусской и лимузинской позволит получить животных, сочетающих в себе положительные хозяйственно-биологические признаки, присущие данным генотипам.

Таким образом, сравнительная оценка мясной продуктивности и качества мяса бычков черно-пестрой породы и ее помесей с абердин-ангусами и лимузинами с учетом эффективности биоконверсии питательных веществ и энергии корма в питательные вещества и энергию мясной продукции является актуальным и представляет определенный научный и практический интерес.

Для проведения исследований были подобраны полновозрастные коровы (5–7 лет) черно-пестрой породы. Маточное поголовье согласно схеме опыта осеменяли спермой высококлассных быков абердин-ангусской и лимузинской пород. Из полученного приплода было сформировано 3 группы бычков по 15 голов в каждой. В I группу входили чистопородные бычки черно-пестрой породы, во II – полукровные помесные абердин-ангус х черно-пестрая, в III - полукровные помесные бычки лимузин х черно-пестрая.

Бычки до 6-месячного возраста выращивались методом ручной выпойки молока, а затем они были переведены на откормочную площадку.

Для изучения мясных качеств бычков разных генотипов проводился контрольный убой 3 животных из каждой группы согласно схеме опыта в 15 и 18 месяцев по методикам ВАСХНИЛ, ВИЖ, ВНИИМП (1977), ВНИИМС (1984) в условиях Дюртюлинского мясокомбината Республики Башкортостан.

Оценку бычков по эффективности конверсии корма в основные питательные вещества мясной продукции проводили согласно «Методических рекомендаций по комплексной оценке мясной продуктивности животных» (ВАСХНИЛ, 1983).

С возрастом увеличивается расход сырого протеина и энергии корма на 1 кг прироста живой массы (табл. 1).

Большой расход этих величин был отмечен у чистопородных черно-пестрых бычков. Так, от рождения до 15 мес молодняком I группы было затрачено на 1 кг прироста на 1,3% больше протеина,

чем помесными сверстниками II и III групп, а в 18-месячном возрасте эта разница составила соответственно 3,7 и 4,2%.

Накопление в туше белка и жира с возрастом увеличилось. Если в 15-месячном возрасте черно-пестрые животные уступали помесам II и III групп по содержанию белка в мякоти туши на 2,72 кг (9,0%) и 3,36 кг (11,1%), то в 18 мес – соответственно на 3,00 кг (8,3%) и 4,36 кг (12,0%). По содержанию жира в 15 мес – соответственно на 1,53 кг (10,3%), 2,57 кг (17,3%), в 18 мес – на 3,72 кг (14,8%) и 4,64 кг (18,4%).

Таблица 1. Трансформация основных питательных веществ и энергии корма в съедобные части туши бычков

Возраст, мес.	Потреблено на 1 кг живой массы		Масса съедобных частей туши, кг	Содержание питательных веществ в туше, кг		Выход на 1 кг предубойной живой массы			Коэффициент конверсии, %	
	сырого протеина, г	энергии, МДж		белка	жира	белка, г	жира, г	энергии, МДж	протеина	энергии
Черно-пестрая										
15	1016	76,27	161,3	30,19	14,92	75,82	37,47	2,76	7,46	3,62
18	1057	81,95	198,8	36,26	25,15	77,35	53,65	3,42	7,32	4,17
Абердин-ангусская × черно-пестрая										
15	1003	75,22	174,8	32,91	16,45	79,69	39,83	2,92	7,95	3,88
18	1019	79,06	214,3	39,26	28,87	80,07	58,88	3,67	7,86	4,64
Лимузин × черно-пестрая										
15	1003	75,18	179,9	33,55	17,49	78,61	40,98	2,95	7,84	3,93
18	1014	78,55	226,4	40,62	29,79	79,29	58,14	3,62	7,82	4,61

Важным показателем при производстве говядины является конверсия энергии и протеина в съедобную часть тканей тела. В 15-

месячном возрасте коэффициент конверсии протеина составлял от 7,46 до 7,95%, энергии – от 3,62 до 3,93%, в 18 мес – соответственно от 7,32 до 7,86%, и от 4,17 до 4,64%. При этом лучшей трансформацией протеина в мясную продукцию обладали бычки всех групп в 15-месячном возрасте. Помесный молодняк II и III групп по данному показателю превосходил сверстников I группы в 15 мес на 0,49 и 0,38%.

С возрастом у молодняка всех групп в тканях тела происходило усиленное отложение жира и несколько меньше белка. Так, при сравнении показателя коэффициента конверсии протеина с 15- до 18-месячного возраста, отмечалось его снижение во всех группах на 0,02-0,14%, а коэффициента конверсии энергии – увеличение на 0,55-0,76%.

Таким образом, помесные бычки (абердин-ангус × черно-пестрая, лимузин × черно-пестрая) в сравнении с чистопородными черно-пестрыми сверстниками обладали более качественными показателями мяса и лучшей трансформацией кормового протеина и энергии рационов в съедобную часть тканей тела.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гизатуллин Р.С., Хазиахметов Ф.С., Седых Т.А. Ресурсосберегающая технология ведения мясного скотоводства: рекомендации с грифом МСХ РБ. - Уфа: РИЦ БашИФК, 2011. - 56 с.
2. Гиниятуллин Ш.Ш., Тагиров Х.Х. Влияние голштинизации на мясную продуктивность черно-пестрого скота. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2011. -288 с.
3. Миронова И.В., Тагиров Х.Х. Рациональное использование биоресурсного потенциала бестужевского и черно-пестрого скота при чистопородном разведении и скрещивании. - М.: Лань, 2013. - 330 с.
4. Хазиахметов Ф.С. Корма из козлятника восточного в рационах сельскохозяйственных животных и птицы/Оценка земельных ресурсов и создание адаптивных биоценозов в целях рационального природопользования: история и современность//Материалы Международной научно-практической конференции. – Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2008. - С. 242-246.

5. Хазиахметов Ф.С. Рациональное кормление животных. - СПб.: Лань, 2011. – 368 с.

УДК 579.64

**ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ РИЗОСФЕРЫ И ХАРАКТЕРИСТИКА
БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ МИКРОМИЦЕТОВ Р. *FUSARIUM***

А.М. Марданова, М.Т. Лутфуллин, Г.Ф. Хадиева, Л.Ф. Миннуллина

Институт фундаментальной медицины и биологии, К(П)ФУ
420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, mardanovaayslu@mail.ru

Из ризосферной микрофлоры картофеля выделено 5 штаммов, проявляющих антагонистическую активность в отношении фитопатогенных микромицетов р. Fusarium. Наиболее эффективно рост фитопатогенов ингибируют штаммы B. subtilis 1 и B. subtilis 2. Эти штаммы могут рассматриваться в качестве основы для создания биопрепаратов, которые будут предназначены для контроля возбудителей сухой гнили картофеля, распространенных на территории Республики Татарстан.

Библиогр. 5 назв.

Ключевые слова: ризосферные бактерии; антагонизм; Fusarium; биоконтроль фитопатогенов

Использование биопрепаратов против сельскохозяйственных вредителей и болезней является эффективной альтернативой использованию пестицидов. Возможность применения в сельском хозяйстве биологических средств защиты растений изучается на протяжении десятков лет [1; 4]. Но только в последнее время, когда был накоплен колоссальный исследовательский материал по успешному применению бактерий-антагонистов в сельскохозяйственной практике, начались действительно широкомасштабные разработки технологий получения биопрепаратов различного назначения на основе микроорганизмов [3; 5]. В настоящее время исполь-

зование микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности в качестве альтернативы химическим пестицидам, разработка и создание биопрепаратов на их основе рассматривается как чрезвычайно перспективное направление биотехнологии.

В данной работе было проведено выделение бактерий из ризосферной микрофлоры картофеля с целью оценки потенциала использования этих штаммов в качестве биологических агентов в отношении фитопатогенов.

В качестве тест-культур были использованы штаммы микромицетов-фитопатогенов из коллекции кафедры микробиологии КФУ: *Fusarium sp.*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium tricinctum*, *Alternaria tenuissima*.

Бактерии культивировали на средах МПА (мясо-пептонный агар) и LB (Лурия-Бертани): триптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl - 5 г/л. Среда LBA: триптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl - 5 г/л, агар - 2%. Культивирование проводилось в термостате при температуре 37°C или 28°C при интенсивности качания 200 об/мин для жидких культур.

Для культивирования микромицетов использовали среду **Чапека**: глюкоза - 14,0 г/л, CaCO₃ - 0,7 г/л, KNO₃ - 0,7 г/л, MgSO₄ - 0,35 г/л, NaCl - 0,35 г/л, K₂HPO₄ - 0,35 г/л, FeSO₄ - следы; агар-агар - 20,0 г/л. Микромицеты культивировали при 28°C.

Для идентификации изолятов бактерий использовали отдельные колонии 18-часовой культуры, выращенной при 37°C. Бактерии идентифицировали методом масс-спектрометрии на MALDI BioType (Bruker Daltonik).

Антагонистическую активность бактерий определяли методом агаровых блоков. Культуры микромицетов высевали газоном в чашки Петри со средой Чапека. Чашки помещали в термостат при температуре 28°C на 5-7 суток. Бактерии-антагонисты засевали газоном на поверхность среды МПА. Посевы инкубировали в течение 24 часов. Стерильным пробочным сверлом вырезали блоки микромицетов и помещали их в центр чашки Петри на среду Чапека. На расстоянии 2-2,5 см от блока с микромицетом размещали 2-3 блока с бактериями-антагонистами. Культуры инкубировали при 25-28°C в

течение 3-15 суток. Антагонистическую активность оценивали по степени подавления роста колонии микромицетов.

Для оценки антимикробной активности экзометаболитов использовали культуральную жидкость бактерий, которую вносили в среду культивирования микромицетов в количестве 1:20 по объему после стерилизации. На поверхность среды в чашке Петри накладывали блоки микромицетов и культивировали при температуре 28°C в течение 5-7 суток. Антимикробную активность оценивали по степени подавлению роста колонии микромицета в сравнении с контролем.

Математическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Microsoft Excel» путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$.

Для выделения ризосферных бактерий корешки картофеля раскладывали на поверхности среды МПА в чашке Петри. Для дальнейшего анализа отбирали колонии бактерий, вокруг которых обнаруживалась зона подавления роста других культур. Было выделено 5 штаммов бактерий, чистые культуры которых были идентифицированы на MALDI BioTyper (Bruker Daltonik) (таблица 1). Значение score от 2.0 до 2.5 позволяет определить видовую принадлежность бактерий.

Таким образом, на основе Maldi-анализа и исследований морфологических свойств была определена видовая принадлежность 4 изолятов. Один изолят был идентифицирован как *Bacillus sp.*

Известно, что бактерии рода *Bacillus* могут использоваться в качестве агентов биоконтроля, поскольку они обладают антагонистической активностью в отношении широкого спектра фитопатогенов. К примеру, показано, что штамм *B. subtilis* SKT1-1 обладает высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микроорганизмов *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas axonopodis* и *Pythium aphanidermatum* [3].

Методом агаровых блоков была исследована способность выделенных изолятов ингибировать рост микромицетов *Fusarium sp.* Известно, что микромицеты р. *Fusarium* являются серьезными патогенами многих сельскохозяйственных растений и, в том числе, вызывают сухую гниль картофеля [2]. Нами было установлено, что *Ba-*

cillus sp. и *A. calcoaceticus* практически не ингибируют рост микромицета. *E. ludwigii*, *B. subtilis* 1 и *B. subtilis* 2 ингибировали рост колонии микромицета на 3 сутки культивирования на 13, 35 и 50% соответственно. Для дальнейших исследований фунгицидной активности были отобраны три самых активных штамма: *E. ludwigii*, *B. subtilis* 1 и *B. subtilis* 2.

Таблица 1. Идентификация ризосферных бактерий на MALDI BioTyper

№	Название изолята	Score Value
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2,573
2	<i>Bacillus sp.</i>	1,991
3	<i>Enterobacter ludwigii</i>	2,424
4	<i>Bacillus subtilis</i> 1	2,336
5	<i>Bacillus subtilis</i> 2	2,295

Исследовали способность бактерий *E. ludwigii*, *B. subtilis* 1 и *B. subtilis* 2 подавлять рост колоний микромицетов *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* и *A. tenuissima*. Эффективность ингибирования выражали в % относительно контроля. В качестве контроля использовали рост колонии микромицетов на среде Чапека (табл. 2 и рис. 1).

Таблица 2. Антагонизм ризосферных бактерий и фитопатогенных микромицетов

№	Бактерии	Подавление роста колонии микромицетов через 7 суток, % от контроля				
		<i>F. solani</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. tricinctum</i>	<i>Alternaria tenuissima</i>
1	<i>E. ludwigii</i>	43	63	0	53	77
2	<i>B. subtilis</i> 1	80	71	84	63	80
3	<i>B. subtilis</i> 2	78	74	73	77	83

Посевы анализировали через 3, 5 и 7 суток. Наиболее эффективно рост колоний микромицетов *F. solani*, *F. avenaceum*, *A. tenuis-*

sima ингибировал штамм *B. subtilis* 1 (на 80-84% от контроля). *B. subtilis* 2 ингибировал рост микромицетов на 73-83%. Штамм *E. ludwigii* подавлял рост микромицетов *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, *A. tenuissima* на 43-77% от контроля, однако он не подавлял рост *F. avenaceum*.

Исследовали антимикробную активность экзометаболитов штаммов *E. ludwigii* и *B. subtilis* 2. Для этого в среду Чапека вносили культуральную жидкость 3-х суточных культур бактерий в количестве 5% от объема. О степени ингибирования судили по диаметру колонии микромицета в сравнении с ростом на контрольной среде в течение 7 сут (рис. 2).

Как видно из рисунка 2, бактерии *B. subtilis* 2 ингибируют рост микромицета *F. oxysporum* гораздо эффективнее, чем *E. ludwigii*. Диаметр колоний микромицетов на среде с экзометаболитами *B. subtilis* 2 и *E. ludwigii* на 66% и 20% меньше, чем в контроле.

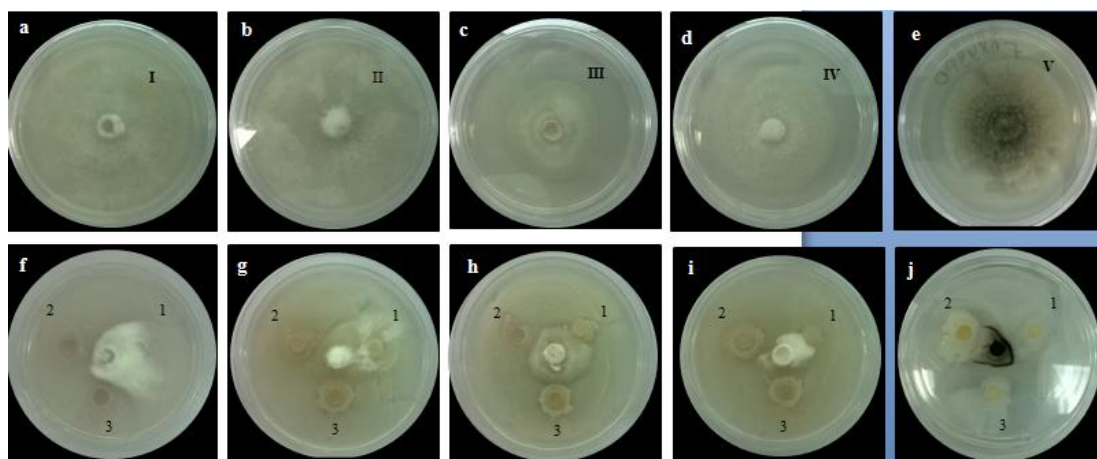


Рис. 1. Ингибирование роста колоний микромицетов ризосферными бактериями. (а-е) – микромицеты: I – *F. avenaceum*, II – *F. solani*, III – *F. tricinctum*, IV – *F. oxysporum*, V – *A. tenuissima*. (f-j) – бактерии и микромицеты: 1 – *E. ludwigii*, 2 – *B. subtilis* 1, 3 – *B. subtilis* 2

Таким образом, из ризосферы картофеля выделены штаммы бактерий с антагонистической активностью в отношении фитопатогенных микромицетов. Наиболее эффективно ингибируют рост колоний фитопатогенов штаммы *B. subtilis* 1 и *B. subtilis* 2. Эти штаммы могут рассматриваться в качестве основы для биопрепаратов, которые будут предназначены для контроля возбудителей сухой

гнили картофеля (р. *Fusarium*), распространенных на территории Республики Татарстан.

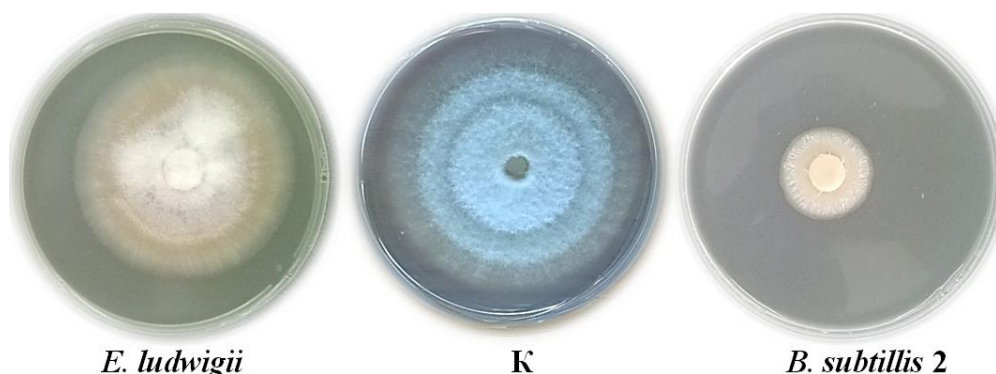


Рис. 2. Рост колонии *F. oxysporum* в присутствии экзометаболитов *B. subtilis 2* и *E. ludwigii*. 7 суток культивирования. К – контроль

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной КФУ для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект 14-83).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Babalola O.O. Beneficial bacteria of agricultural importance. // Biotechnol Lett. 2010, 32, 11, P.1559-1570.
2. Du M., Ren X., Sun Q., Wang Y., Zhang R. Characterization of *Fusarium* spp. Causing potato dry rot in china and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen. // Potato Research, 2012, 55, P.175-184.
3. Huang T.P., Tzeng D.D., Wong A.C., Chen C.H., Lu K.M., Lee Y.H., Huang W.D., Hwang B.F., Tzeng K.C. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. // PLoS One. 2012, 7, 7:e42124.
4. Saraf M., Pandya U., Thakkar A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. // Microbiol Res. 2014, 169, 1, P.18-29.
5. Xu S.J., Kim B.S. Biocontrol of *Fusarium* crown and root rot and promotion of growth of tomato by *Paenibacillus* strains isolated from soil. // Mycobiology. 2014, 42, 2, P.158-166.

УДК: 632.939

ВЛИЯНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ КОЛЬЦЕВАЯ ГНИЛЬ НА ХРАНЕНИЕ И ВЕГЕТАЦИЮ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

А.И. Перфильева, Е.В. Рымарева, Е.Г. Рихванов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, e-mail: alla.light@mail.ru

В работе исследовали взаимодействие возбудителя кольцевой гнили с картофелем в климатических условиях Восточной Сибири. Для этого клубни картофеля осенью искусственным путем заражали кольцевой гнилью. После хранения весной анализировали влияние заражения на длину и количество проростков. Затем клубни высаживали в почву и в период вегетации исследовали ростовые параметры. Во время уборки урожая определяли продуктивность. Показано, что заражение возбудителем кольцевой гнили подавляло рост проростков после хранения, но не имело отрицательного эффекта на вегетацию и продуктивность картофеля.

Библиогр. 2 назв.

*Ключевые слова. Картофель, кольцевая гниль, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, продуктивность.*

Картофель является одной из наиболее широко возделываемых культур в России. Средняя урожайность картофеля в нашей стране ниже потенциальной продуктивности используемых сортов. На сегодняшний день широко распространены различные заболевания картофеля, большинство из которых вызываются патогенными грибами и бактериями. До половины урожая картофеля в странах Северной Европы и Канады теряется в результате заболевания кольцевая гниль картофеля, которая вызывается грамположительной бактерией - *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) [1]. Согласно данным Европейской и Средиземноморской организации защиты растений (<http://www.eppo.int>) кольцевая гниль широко распространена в европейских регионах России, хотя и не является ка-

рантинным организмом. Можно ожидать, что в связи с глобальным потеплением климата ареал обитания возбудителя будет расширяться, что приведет к распространению данного заболевания и в Восточной Сибири. В настоящее время в Иркутской области по данным карантинной службы *Cms* достаточно часто обнаруживается в образцах картофеля, но развивается ли заболевание в условиях Сибири.

Цель работы – изучить проявление симптомов заболевания кольцевая гниль на этапе хранения и вегетации картофеля в условиях Восточной Сибири.

В работе были использованы клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Лукьяновский – восприимчивого к бактериальному фитопатогену *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*). Высокоурожайный - до 700 ц/га. Крахмалистость 13-15%. Клубни овальные, белые, крупные, мякоть светло-жёлтая. Цветки белые. Отличается устойчивостью к картофельной нематоде, мало устойчив к вирусным болезням, фитофторозу [2]. В исследованиях были использованы два штамма *Cms*: штамм Ас1405 (мукоидный, вирулентный, получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Москва) и штамм В 66 (получен из коллекции института картофелеводства НАН Белоруссии РУП, г. Минск).

Работа выполнялась в течение 2013-2014 гг. и включала в себя инфицирование клубней картофеля двумя штаммами *Cms*, закладку на хранение, анализ влияния заражения на прорастание клубней (весной, после хранения), высаживание этих клубней в почву, наблюдение за растениями в процессе вегетации (подсчет количества побегов, измерение длины побегов, учет цветения), анализ продуктивности. На каждый вариант брали по 30 клубней.

После заражения осенью, клубни помещали в деревянные ящики в условия овощехранилище на 8 месяцев при температуре +4°C, влажности 85%. Весной 8 апреля и 21 апреля подсчитывали количество и измеряли длину проростков у клубней. На следующем этапе, в мае 2014 г, клубни сорта Лукьяновский, которые осенью 2013 г были заражены различными штаммами *Cms*, были высажены на экспериментальном участке СИФИБРа. Чтобы уравнивать шансы, все образовавшиеся проростки во время хранения, были удалены. На каждый вариант обработки брали по 25 клубней. В

период вегетации растения выращивали в естественных климатических условиях с периодической прополкой и окучиванием. Количество побегов, их длину, а также процент цветущих растений оценивали 15 июля 2014 г. После окончания срока вегетации анализировали продуктивность растений путем определения массы клубней.

Полученные результаты были статистически обработаны с использованием пакета программ Excel.

Было показано, что заражение двумя штаммами *Sms* не оказывало отрицательного эффекта на количество проростков у клубней, но замедляло их прорастание (табл. 1). Наблюдения за растениями картофеля в период вегетации показало, что заражение патогеном может приводить к увеличению процента цветущих растений по сравнению с контролем. У растений, зараженных штаммом Ac1405, количество побегов и их длина достоверно превышало эти показатели у контрольных растений. Заражение штаммов B66 повышало количество побегов, но не влияло на их длину (табл. 1). Определение продуктивности показало, что заражение штаммом Ac 1405, приводило к некоторому повышению продуктивности, заражение штаммом B66 ее снижало (табл. 1).

Таблица 1. Влияние заражения *Sms* (штамм B66, Ac 1405) на хранение клубней, вегетацию и продуктивность картофеля сорта Лукьяновский

Вариант	Количество проростков шт./клубень	Длина проростков, см.	Количество побегов в период вегетации шт./куст	Длина побега, см	Количество цветущих, %	Продуктивность кг/куст
К	5,7±0,8	8,9±1,2	4,6±0,3	52,9±1,3	75	0,9±0,1
B66	6,3±0,5	1,4±0,07	5,5±0,4	55,0±1,7	72	0,8±0,1
Ac1405	4,1±0,5	2,7±0,2	6,0±0,4	60,2±1,2	87,5	1,1±0,1

Примечание: К – контроль, B66 – заражение клубней штаммом B66, Ac1405 – заражение клубней штаммом Ac 1405. n=20, t±S.E.

Также нами была определена структура урожая (табл. 2). Результаты показали, что заражение клубней возбудителем кольцевой гнили никак не влияло на данный показатель.

Таблица 2. Влияние заражения *Sms* (штамм В66, Ас 1405) на структуру урожая картофеля сорта Лукьяновский (% к контролю)

Вариант	Крупные клубни	Средние клубни	Мелкие клубни
к	60,7	28,6	10,7
В-66	50	34,3	15,7
Ас1405	54	28	18

Примечание: К – контроль, В66 – заражение клубней штаммом В66, Ас1405 – заражение клубней штаммом Ас 1405. $n=20$, $m \pm S.E.$

Таким образом, было показано, что исследуемые штаммы бактерии *Sms* подавляют прорастание клубней картофеля во время хранения, не влияя на продуктивность. Более того, заражение может стимулировать рост и развитие растений, повышая количество побегов и их длину на стадии вегетации. Отсутствие отрицательного эффекта заражения *Sms* на продуктивность может быть вызвано латентным характером заболевания [1], а также климатическими условиями Восточной Сибири, ограничивающими распространение заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 14–404107 РФФИ_Сибирь.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Eichenlaub R., Gartemann K.H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // Annu Rev Phytopathol. 2011. V. 49. P. 445-464.
2. Romanenko A.S., Riffel A.A., Graskova I.A., Rachenko M.A. The role of extracellular pH-homeostasis in potato resistance to ring-rot pathogen // J. of Phytopathology. 1999. V. 147. № 11-12. P. 679-686.

УДК 634.861

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РИЗОСФЕРНЫХ
БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS SP.* И ГЛАУКОНИТА
ДЛЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН МОРКОВИ**

Н.Н.Терещенко, А.В. Кравец

Федеральное бюджетное государственное научное учреждение Си-
бирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и
торфа,

г. Томск, Россия, ул. Гагарина, д.3, тел: (3822) 53-33-90, факс: 53-
50-93, ternat@mail.ru

*Изучение в условиях полевого опыта эффективности приема предпосевной обработки семян моркови посевной ризосферными бактериями *Pseudomonas sp.*, адсорбированными на поверхности глинистого минерала глауконита, показало, что бактеризация способствует 37% повышению товарности корнеплодов и продлению сроков зимнего хранения моркови за счет 2-кратного уменьшения поражения плодов фомозом и фузариозом и почти 1,5-кратного – склеротинией.*

*Ключевые слова: морковь посевная, бактеризация, *Pseudomonas sp.*, глауконит, хранение, корневые гнили.*

Морковь посевная является одной из наиболее традиционных овощных культур выращиваемой как в условиях крупномасштабного аграрного производства, так и на частных подворьях. Хорошо известны полезные пищевые и лечебные свойства моркови, корнеплоды которой содержат витамины группы В, РР, С, Е, К, а также каротин – вещество, которое в организме человека превращается в витамин А. Плоды моркови содержат до 1,3 % белков и 7-8 % углеводов. Немало в моркови и минеральных веществ, необходимых для организма человека, таких как калий, железо, фосфор, магний, кобальт, медь, йод, цинк, хром и др.

Как известно одной из основных проблем, возникающей при производстве моркови, является ее низкая лежкость в овощехранилищах вследствие поражения корнеплодов возбудителями корне-

вых гнилей и бактериозов. Подавляющее большинство способов повышения сохранности моркови основано на обработке корнеплодов фунгицидами и применении некоторых физических методов, таких, например, как обработка электромагнитным полем низкой частоты (Обломий Р.Н. и др., 2008). В работе Shoji Koide с соавт. (2011) также показана высокая эффективность применения для этих целей подогретой, слабокислой электролизованной воды.

Кроме того для повышения урожайности моркови и снижения риска ее поражения корневыми гнилями, как правило, применяют различные химические протравители, а иногда препараты со свойствами стимуляторов роста растений, такие, например, как препарат Вэрва, получаемый путем эмульсионной экстракции древесной зелени пихты и применяемый для предпосевной обработки семян и последующего опрыскивания всходов в фазу 3-4 настоящих листьев (Шморгунов Г.Т. и др., 2006) или препарат НИКФАН, также рекомендуемый для предпосевного протравливания семян моркови посевной (Демьянова-Рой Г.Б. и др., 2001).

Несмотря на общемировую тенденцию к увеличению масштабов применения микробиологических средств защиты растений, к сожалению, в научной литературе информации о результатах бактериализации семян моркови для повышения урожайности и продления сроков хранения корнеплодов крайне мало. Между тем в некоторых работах, например, О.В. Орловой (2011) продемонстрирована высокая эффективность применения биологически активных удобрений Бамил и Омуг, обеспечивающих 12-284 %-е увеличение урожайности моркови и других овощных культур по сравнению с контролем.

В связи с недостаточной изученностью данного вопроса основной целью наших исследований была оценка влияния предпосевной обработки семян моркови накопительной культурой ризосферных бактерий *Pseudomonas* sp., изолированных из копролитов дождевых червей *Eisenia foetida* и адсорбированных на поверхности природного глинистого минерала глауконита, на показатели заболеваемости корнеплодов моркови в процессе зимнего хранения.

В опыте использовали морковь среднеспелого сорта «Без сердцевины» сортотипа «Нантская» агрофирмы «Поиск». Семена соответствуют ГОСТ Р 52 171-2003. Сорт отличается высоким содержанием каротина. Перед посевом семена моркови обрабатыва-

ли полужидкой пастой из мелкоразмолотого глауконита, в состав которой была введена накопительная культура бактерий *Pseudomonas* sp., обладающая высоким уровнем фунгистатической активности по отношению к возбудителям корневых гнилей.

Полевой мелкоделяночный опыт был заложен на среднесуглинистой серой оподзоленной почве в трех повторностях. В качестве контроля использовали семена, обработанные H₂O дист. Через 2 недели после появления всходов посевы проредили, оставив между растениями интервал в 3 см. Учет урожайности проводили в последней декаде сентября.

Несмотря на то, что бактеризация семян не оказала влияния на урожайность моркови, в опытных вариантах было отмечено на 37% меньше нетоварных (мелкой и/или неправильной формы) корнеплодов, чем в контроле.

Учет заболеваемости корнеплодов моркови, проведенный через 2 месяца хранения показал, что в опытном варианте количество корнеплодов, пораженных бактериозом, было в 2,5 раза, а белой гнилью – в 4,5 раза меньше, чем в контроле. Распространенность болезни в опытном варианте была в 4 раза меньше (11 %) чем в контроле (44%).

Повторный анализ заболеваний корнеплодов, проведенный через 5 месяцев хранения показал, что в опытном варианте количество корнеплодов, больных фомозом и фузариозом было в 2 раза меньше, чем в контроле, а количество корнеплодов, больных склеротинией – почти в 1,5 раза (таблица).

Таблица – Учет болезней моркови через 5 месяцев хранения

Вариант опыта	Фомоз, %	Склеротиния, %	Фузариоз, %	Распространенность болезни, %	Степень поражения, балл
Контроль	12,0	67,2	11,4	65,5	1,8
Бактери- зация	5,5	48,4	5,5	55,3	1,2

Таким образом, на основании предпринятых исследований можно сделать вывод о перспективности приема предпосевной бак-

теризации семян овощной культуры моркови ризосферными бактериями *Pseudomonas* sp. в составе глинистого минерала глауконита для повышения товарности моркови и продления срока хранения корнеплодов за счет снижения пораженности моркови корневыми гнилями.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Обломий Р.Н., Исагулян Э.А., Мгебришвили Т.В. Способ хранения моркови. Заявка на изобретение № 2008152473/12 от 10.07.2010

2. Шморгунов Г.Т., Коковкина С.В., Триандафилова С.Н., Хуршайнен Т.В., Кучин А.В. Способ стимулирования роста и развития моркови столовой. Заявка на изобретение № 2006146890/13 от 28.12.2006

3. Демьянова-Рой Г.Б., Бруснигина Т.П. Способ повышения урожая и качества семян моркови. Заявка на изобретение № 2001132113/12 от 26.11.2001

4. Shoji Koide, Douglas Shitanda, Mizuho Note, Wei Cao Effects of mildly heated, slightly acidic electrolyzed water on the disinfection and physicochemical properties of sliced carrot // Food Control. 2011. Vol. 22. pp. 452-456

УДК 633.11

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ

ПО ПРИЗНАКУ «СОДЕРЖАНИЕ ЛЕКТИНА В СЕМЕНАХ»

М.А. Ханадеева¹, Н.И. Старичкова², Е.Ф. Соболева¹, Н.В. Евсеева¹,
Л.П. Антонюк¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
410049, Россия, г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13,
ant306@ibppm.sgu.ru

²Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
410026, Россия, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, natstar-12@mail.ru

Лектин пшеницы (агглютинин зародышей пшеницы, АЗП) – белок, присутствующий не только в зародыше, но и в корневых выделениях растения. Этот белок физиологически активен как в самом растении, так и в отношении его симбионтов; он входит в состав современных биопрепаратов для растениеводства. Для получения сведений о функциях АЗП, в частности в симбиозе, актуальным является создание наборов сортов пшеницы, различающихся по содержанию данного лектина. С помощью двух методов – реакции гемагглютинации и иммуноферментного анализа, оценивали сортовую вариабельность АЗП в семенах 25 сортов яровой и озимой пшеницы. Наибольшая вариабельность по содержанию лектина, с 40-кратной разницей между максимальными и минимальными значениями, была выявлена у сортов мягкой пшеницы.

Библиография – 7 названий.

Ключевые слова: пшеница, лектин, агглютинин зародышей пшеницы, сортовая вариабельность.

Белки семян пшеницы – основной пищевой культуры человека, изучаются не один десяток лет, и к настоящему времени по этим белкам накоплен уже довольно большой массив данных. Между тем, большинство работ в этой области посвящено глиадинам, глютеинам и другим белкам эндосперма, значимым для качества муки (Zilić *et al.*, 2011), в то время как о белках зародышей, остающихся при помоле в отрубях, известно значительно меньше.

Одним из наиболее перспективных в биотехнологическом отношении белков является лектин – агглютинин зародышей пшеницы (АЗП). Помимо ряда функций в самом растении этот белок важен и для взаимодействия растений пшеницы с микрофлорой – как патогенной, так и симбиотической (Бабоша, 2008). Этот белок обнаруживается не только в зародыше, но и в корнях, в местах скопления ризобактерий. Наши более ранние работы показали, что АЗП взаимодействует с природным симбионтом пшеницы – эндофитной бактерией *Azospirillum brasilense* Sp245, стимулируя азотфиксацию, продукцию азоспириллой гормона ИУК и другие физиологические процессы, значимые для роста и развития растения-хозяина (Антонюк и Игнатов, 2001; Антонюк и Евсеева, 2006). Считается, что АЗП спо-

способствует колонизации растения полезными для него микробами, а также формированию устойчивых и эффективных симбиозов. На рынке биотехнологической продукции уже появился препарат – Азолек, в состав которого помимо ризобактерий входит лектин пшеницы (Кириченко и соавт., 2005).

Предполагается, что уровень лектина в семенах и проростках пшеницы важен для отзывчивости растений на предпосевную микробную обработку семян. Получение прямых доказательств этой гипотезы связано с большими методическими трудностями, в первую очередь, из-за невозможности получения безлектиновых мутантов пшеницы (мутация летальна). В связи с этим большое значение приобретает создание наборов сортов пшеницы, значительно различающихся по содержанию АЗП. Это, в свою очередь, ставит задачу оценки сортов пшеницы по признаку «содержание АЗП». В связи с вышесказанным, в задачу работы входило изучить сортовую вариабельность содержания лектина в семенах 25 сортов мягкой и твердой пшениц.

В работе использовались семена 13 сортов яровой мягкой, 5 сортов озимой мягкой и 7 сортов твердой пшеницы, выведенных в НИИ сельского хозяйства Юго-Востока (табл. 1 и 2.). Содержание АЗП в семенах пшеницы оценивали двумя методами – в стандартной реакции гемагглютинации (РГА) и с помощью непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА).

Метод РГА основан на оценке биологической активности лектина – его способности агглютинировать эритроциты крови. Анализировали экстракты, полученные из шрота семян пшеницы (Старичкова и соавт., 2010), используя 2% суспензию нативных эритроцитов кролика в фосфатно-солевом буфере. О лектиновой активности судили по конечному разведению экстракта, вызывающему гемагглютинацию. Данные представлены в виде среднего из трех повторностей; приведено максимальное разведение экстракта, дающее РГА.

Конкурентный ИФА выполнялся в варианте, предложенном Р.М. Хайруллиним с соавторами (1992) для оценки содержания АЗП в семенах и проростках пшеницы. Для определения необходимого в ИФА титра антител использовали двойную радиальную иммунодиффузию, которую проводили по стандартной методике; в качестве антигена использовали экстракт АЗП в концентрациях 0.5 мг/мл

и 5 мг/мл. Титры антител и АЗП подбирали экспериментально, исходя из результатов иммунодиффузии и предварительных опытов методом ИФА. Экстракты АЗП для анализа получали из зародышей пшеницы таким же образом как и в случае РГА.

Оценка содержания АЗП в семенах пшеницы методом РГА. Как видно из представленных в таблице 1 данных, сорта мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) значительно различались между собой по содержанию лектина в зерновках. Среди протестированных сортов можно выделить три группы: с высоким, низким и средним содержанием лектина. Группа пшениц с высоким уровнем АЗП в семенах включала 3 сорта – яровые Саратовская 60 и Саратовская 64, а также озимую Саратовская 90. У этих сортов гемагглютинирующая активность выявлялась при высоких разведениях экстрактов (от 1:96 до 1:178). Наименьший уровень содержания лектина был выявлен у яровых пшениц Альбидум 28 и Лебедушка, а также у озимой Левобережная-1. Высокие разведения экстракта в этой группе не давали положительной реакции, и активность АЗП можно было выявить только при небольших разведениях (1:4–1:5). Остальные сорта занимали промежуточное положение по содержанию АЗП в семенах – средние конечные разведения экстрактов, выявляющие тестируемый белок, колебались между значениями 1:11 и 1:64.

Важно отметить отсутствие резких границ между группой сортов со средним уровнем АЗП, с одной стороны, и группами с низким или высоким содержанием лектина – с другой. Проведенный анализ показал, что генотипическая вариабельность признака «содержание АЗП» у яровых мягких пшениц саратовской селекции исключительно высока: максимальные и минимальные значения этого признака имели примерно 40-кратные отличия. Несколько иную картину вариабельности признака наблюдали в группе сортов твердой пшеницы (*T. durum*), которая была меньше первой и включала 6 сортов (табл. 1). Часть вариантов (Саратовская 57, Золотая волна, Елизаветинская) имела средний, по сравнению с сортами *T. aestivum*, уровень АЗП. И только сорт Ник имел высокое содержание АЗП в зерновках: лектиновая активность выявлялась при разведении экстракта в среднем 1:128.

Отдельные сорта яровой мягкой пшеницы были оценены по содержанию АЗП также с помощью ИФА. Для иммуноферментного анализа было отобрано три сорта яровой мягкой пшеницы, контраст-

ных по содержанию лектина: низколектиновый Альбидум 28, среднелектиновый Альбидум 29 и высоколектиновый Саратовская 64 (по данным РГА). В дополнение к ним тестировали высоколектиновый сорт яровой мягкой пшеницы Саратовская 29 (Антонюк и Евсева, 2006; Старичкова и соавт., 2010). Полученные методом ИФА

Таблица 1. Вариабельность признака «содержание АЗП» у сортов пшеницы саратовской селекции по данным РГА

№	Сорт пшеницы	Титр РГА
Яровая мягкая пшеница		
1.	Альбидум 28	1:4
2.	Альбидум 29	1:11
3.	Лебедушка	1:5
4.	Фаворит	1:32
5.	Саратовская 38	1:37
6.	Саратовская 42	1:21
7.	Саратовская 52	1:27
8.	Саратовская 58	1:32
9.	Саратовская 60	1:171
10.	Саратовская 64	1:96
11.	Саратовская 66	1:32
12.	Саратовская 68	1:64
13.	Саратовская 70	1:27
Озимая мягкая пшеница		
14.	Левобережная-1	1:4
15.	Губерния	1:21
16.	Лютесценс-230	1:43
17.	Жемчужина Поволжья	1:64
18.	Саратовская 90	1:128
Твердая пшеница		
19.	Золотая волна	1:21
20.	Елизаветинская	1:21
21.	Саратовская 57	1:32
22.	Валентина	1:43
23.	Аннушка	1:64
24.	Янтарь Поволжья	1:107
25.	Ник	1:128

результаты подтвердили высокую вариабельность признака «содержание АЗП» у разных сортов пшеницы (табл. 2). У Альбидум 28 концентрация лектина была самой низкой, у Альбидум 29 – более

высокой (209 и 240 нг/г сырой массы, соответственно). Сорты Саратовская 64 и Саратовская 29 показали себя как высоколектиновые. Эти данные хорошо согласуются с результатами РГА (табл. 1).

Таким образом, оба использованных метода, ИФА и РГА, выявляли высокую вариабельность признака «содержание АЗП» в растениях. Она была характерна для всех проанализированных групп – яровые мягкие, озимые мягкие и твердые пшеницы. Наибольшая генотипическая вариабельность признака была выражена у яровых мягких пшениц: максимальные и минимальные значения этого признака имели примерно 40-кратные отличия.

Представленные результаты хорошо согласуются с полученными ранее данными (Антонюк и Евсеева, 2006). В цитируемой работе сравнивали модификационную изменчивость АЗП и пролиферативного антигена инициалей (ПАИ) – белков, совпадающих по тканевой локализации, но различающихся по функциям. АЗП и ПАИ обнаруживаются в меристематических тканях, причем первый из них локализуется в вакуолях и выделяется в окружающую среду, а второй находится в цитозоле клетки и связан с ее делением. Совокупность полученных ранее и представленных в данной работе результатов свидетельствует о высокой генетической и модификационной изменчивости АЗП, в то время как в случае ПАИ изменчивости признака обнаружить не удалось (Антонюк и Евсеева, 2006).

Таблица 2. Концентрация АЗП в экстрактах, полученных из зародышей яровой мягкой пшеницы по данным ИФА

№	Сорт пшеницы	АЗП, нг/г сырой массы зародыша
1.	Альбидум 28	209
2.	Альбидум 29	240
3.	Саратовская 64	465
4.	Саратовская 29	1190

Предполагается, что вариабельность признака «содержание лектина» у растений пшеницы обусловлена совокупностью его функций. Коллекция сортов пшеницы, контрастных по содержанию АЗП, может быть использована для дальнейшего исследования по изучению функций данного лектина.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Антонюк Л.П., Игнатов В.В. О роли агглютинаина зародышей пшеницы в растительно-бактериальном взаимодействии: гипотеза и экспериментальные данные в ее поддержку // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 3. – С. 427–433.
2. Антонюк Л.П., Евсеева Н.В. Лектин пшеницы как фактор растительно-микробной коммуникации и белок стрессового ответа // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 544–549.
3. Бабоша А. В. Индуцибельные лектины и устойчивость растений к патогенным организмам и абиотическим стрессам // Биохимия. – 2008. – Т. 73. – С. 1007–1022.
4. Кириченко Е.В., Жеймода А.В., Коць С.Я. Влияние растительно-бактериальной композиции на продуктивность яровой пшеницы // Агрехимия. – 2005. – №10. – С. 41–47.
5. Старичкова Н.И., Надкерничная Е.В., Крапивина Л.И., Безверхова Н.В., Антонюк Л.П. Оценка перспективных сортов пшеницы по содержанию лектина // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2010, вып. 1. – Т. 10. – С. 35–40.
6. Хайруллин Р.М., Шакирова Ф.М., Безрукова М.В., Ямалеев А.М. Использование твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа для определения содержания лектина в семенах и проростках пшеницы // Прикладная биохимия и микробиология – 1992 – Т. 28, вып. 3. – С. 468–474.
7. Zilić S, Barać M, Pešić M, Dodig D, Ignjatović-Micić D. Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – V. 12, № 9. – P. 5878–5894.

УДК 579.64

БАЦИЛЛЯРНАЯ РИБОНУКЛЕАЗА КАК СРЕДСТВО ПРОТИВ ФИТОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ

М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, А.А. Тойменцева, Д.С. Баранова,
А.О. Тихонова

Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008, Россия, г. Казань, Кремлевская 18, marsharipova@gmail.com

*В ходе исследования выявлен биотехнологический потенциал бациллярной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* для целевого применения в качестве профилактического противовирусного агента для защиты сельскохозяйственных растений от инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами. Максимальное ингибирование вируса RCMV (более 90%) рибонуклеазой показано при обработке растений гороха ферментом за 1 - 2 суток до инфицирования при концентрации препарата 50-100 мкг/мл. Бациллярная рибонуклеаза проявляла максимальную эффективность, сравнимую с противовирусным эффектом эукариотических РНКаз в более низкой концентрации.*

Библиогр. 4 назв.

*Ключевые слова: *Bacillus pumilus*; внеклеточная рибонуклеаза; противовирусный эффект; РНК-содержащие фитовирусы,*

Вирусы являются хроническими патогенами сельскохозяйственных культур, ущерб от которых не меньше, чем от других болезней. Проблема вирусных заболеваний усугубляется накоплением смешанных инфекций и передачей их последующим поколениям культурных растений. В практике используют химиотерапию вирусных заболеваний растений, известен ряд ингибиторов вирусов, в том числе 8-азагуанин, карбендазим, другие аналоги пуриновых или пиримидиновых оснований нуклеозидов, нуклеотидов, а также антибиотики, полианионы, триазины, диазолы, производные мочевины, оксазолы и др. (Daglia, 2012) Однако химические препараты имеют ряд ограничений: каждый препарат обладает узкой видоспецифичностью, ингибирует один вид вируса и не действует на другие, ряд препаратов, например 2-тиоурацил, хотя и подавляет репродукцию фитовирусов, но не применяется из-за токсичности для растений, многие химические препараты обладают высокой токсичностью для человека и животных, кроме того, они плохо утилизируются в природе и представляют экологическую опасность. Практический интерес могут представлять биогенные белковые препараты, к которым относятся секретлируемые бациллярные РНК-деполимеразы.

Целью работы являлось поисковое изыскание средств защиты сельскохозяйственных растений от вирусных инфекций. Для борьбы

с вирусными инфекциями, приносящими экологический убыток сельскому хозяйству мы тестировали бациллярную рибонуклеазу.

Для изучения противовирусного действия рибонуклеазы *B. pumilus* использовали модельные системы вирус-растение, указанные в табл. 1.

Таблица 1. Модели фитопатогенных вирусов

Фитопатогенные вирусы	Хозяева системно размножающихся вирусов
Red clover mottle virus (RCMV) – вирус крапчатости красного клевера	<i>Pisum sativum</i> L. convar. <i>speciosum</i> (Dierb) Alef Nadja - Горох посевной
Potato virus X (PVX) - X-вирус картофеля	<i>Nicotiana tabacum</i> L. Samsun - Табак сорта Самсун

Растения выращивали в горшках с перлитом в постоянных условиях при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 60-80%, длительности фотопериода в течении 16 ч при силе облучения 9000 lux .

Для инфицирования растений гороха *Pisum sativum* L. convar. *speciosum* (Dierb) Alef вирусом RCMV использовали 10-дневное растение. Для заражения применяли растительный сок зараженных растений, полученный размельчением растительного материала в 0.025 М фосфатном буфере. Через 10 дней после инфицирования растения срезали, получали растительный сок и анализировали его на содержание вирусов. Для инфицирования вирусом PVX листьев табака *Nicotiana tabacum* L. Samsun листья размельчали на прессе Френча, отжимали сок, разводили дистиллированной водой (1:1) и заражали растения в возрасте 40-45 дней.

Для определения вируса RCMV в растениях фасоли использовали серологический тест как описано в работе (Kluge, Marcinka, 1979). Для определения содержания вируса PVX в листьях табака использовали реакцию агглютинации. Растительный сок инкубировали 10 мин при 42°C и центрифугировали 20 мин при 5000 об/мин на центрифуге К-23. Надосадочную жидкость разводили 1:2, 1:4, 1:8...1:64 и добавляли раствор антител к нему (в 0.025 М фосфат-

ном буфере рН 8.0). Реакцию агглютинации наблюдали под микроскопом. Разведение, при котором последний раз наблюдали агглютинацию, фиксировали как последнюю степень разведения. Из 5 повторностей находили среднее число таких степеней и определяли эффект ингибирования, как описано для вируса RCMV.

Для изучения действия РНКазы в зависимости от срока нанесения растения обрабатывали ферментом (50 и 100 мкг/мл) за 4 суток до заражения с интервалом 24 часа, в момент заражения, а также через 24 ч после заражения вирусами.

Тестировали противовирусную активность рибонуклеазы *B. pumilus* 7P/3-19, 12.3 кДа, КФ 3.1.27.2, уд. активность 1.3×10^6 ед/мг белка (Рижский завод медпрепаратов) Для сравнения использовали ферменты: рибонуклеаза *B. Amyloliquefacien*, 12.3 кДа, КФ 3.1.27.2, уд. активность 2.6×10^6 ед/мг белка, получена по методу, описанному в работе (Hartley, Rogerson, 1972) на экспериментальном производстве Рижского завода медпрепаратов. Рибонуклеаза Т1 - эндонуклеаза (10.8 кДа, КФ 3.1.27.3), «Fermentas», Литва. Эндонуклеаза *S. marcescens*, 33 кДа, КФ 3.1.30.2, гидролизует РНК и ДНК, уд. активность 0.35×10^6 ед/мг белка, препарат фермента любезно предоставлен для работы М.Н.Филимоновой. Рибонуклеаза панкреатическая, 14 кДа, КФ 3.1.27.5, уд. активность 0.35×10^6 ед/мг (Санкт-Петербург). Дезоксирибонуклеаза панкреатическая, 30 кДа, КФ 3.1.21.1, уд. активность 0.5×10^6 ед/мг белка, (Санкт-Петербург). Применяли концентрацию ферментов, которая обеспечивала одинаковую каталитическую активность.

Активность ферментов определяли по продуктам гидролиза РНК, растворимым в 4% HClO_4 с 12% уранилацетатом (Лещинская с соавт., 1980). За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало увеличение E_{260} на 1 оптическую единицу в пересчете на 1 мл ферментного раствора за 1 ч инкубации.

Математическую обработку результатов проводили в программной среде «Microsoft Excel».

Исследовали действие рибонуклеазы *B. pumilus* в качестве противовирусного агента при заражении растений гороха *Pisum sativum* convar. *speciosum* Dierb. Alef («Nadja») вирусом крапчатости красного клевера RCMV. Раствором рибонуклеазы в конечной концентрации 50 мкг/мл и 100 мкг/мл обрабатывали растения за 4 суток

до заражения вирусом RCMV с интервалом в 24 часа, затем одновременно с заражением и через 24 после заражения вирусом крапчатости красного клевера. Через 10 дней после инфицирования анализировали растительный сок на содержание вирусов серологическим методом. Опыты проводили в 8 повторностях (горшках), в каждом горшке было по 5-6 растений. Результаты представлены в таблице 2.

Согласно полученным данным максимальное ингибирование вируса RCMV рибонуклеазой *B. pumilus* наблюдали, когда раствором фермента в концентрации 50-100 мкг/мл обрабатывали растения за 1 - 2 сут до инфицирования вирусом. При нанесении фермента вместе с вирусом ингибирование снижалось в среднем на 20%. Обработка ферментом после заражения вирусом оказалась менее эффективной, частичное ингибирование (до 30%) наблюдали при использовании более высоких концентрациях фермента (100 мкг/мл).

Таблица 2. Влияние рибонуклеазы *B. pumilus* на системное развитие вируса крапчатости красного клевера RCMV на хозяине системного размножения RCMV – горохе-*Pisum sativum convar. speciosum* Dierb. Alef Nadja

Варианты	Ингибирование вируса (в%) после обработки растений рибонуклеазой в зависимости от времени нанесения (в сутках)*					
	До заражения вирусом				Во время заражения вирусом	После заражения вирусом
	4	3	2	1		
Контроль (без обработки рибонуклеазой)	0	0	0	0	0	0
Обработка ферментом – 50 мкг/мл.	58+	65++	71++	82++	50+++	0
Обработка ферментом – 100 мкг/мл.	50+	75+++	83++	91+++	79++	29+

*обозначение достоверностей: + 5% $\geq p > 1\%$; ++ 1% $\geq p > 0.1\%$; +++ 0.1% $\geq p$

Чтобы оценить эффективность бациллярной рибонуклеазы по сравнению с другими нуклеазами, обладающими противовирусным эффектом, использовали коммерческие препараты. Опыты проводили с растениями табака *Nicotiana tabacum* L. «Samsun», которые заражали вирусом X картофеля (PVX). На основании выше полученных данных обработку ферментами проводили за 1 сут до инокуляции вирусом, данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. Влияние нуклеаз на развитие вируса PVX на хозяине системного размножения растениях табака сорта Samsun.

Варианты	Первично инфицированные листья при инокуляции вирусом		Вторично инфицированные листья при системной вирусной инфекции	
	Ингибирование, %	Растения, свободные от вирусов	Ингибирование, %	Растения, свободные от вирусов
Контроль	0	0	0	0
РНКаза <i>B.pumilus</i> 50 мг/мл	92 ⁺⁺⁺	90 ⁺⁺⁺	91 ⁺⁺⁺	90 ⁺⁺⁺
РНКаза <i>B.amyloliquefacien</i> 50 мг/мл	100 ⁺⁺⁺	100 ⁺⁺⁺	77 ⁺⁺⁺	50 ⁺⁺⁺
РНКаза T1 100 мг/мл	90 ⁺⁺⁺	89 ⁺⁺⁺	90 ⁺⁺⁺	88 ⁺⁺⁺
РНКаза A 300 мг/мл	92 ⁺⁺⁺	40 ⁺	80 ⁺⁺⁺	60 ⁺⁺
Нуклеаза <i>S. marcescens</i> 300 мг/мл	84 ⁺⁺⁺	60 ⁺⁺	43 ⁺	20 ⁺
ДНКаза I 300 мг/мл	0	0	0	0

*обозначение достоверностей: + 5% \geq p >1%; ++ 1% \geq p >0.1%; +++ 0.1% \geq p

Рибонуклеаза *B.pumilus* и исследованные ферменты проявляли ингибирующее действие по отношению в РНК-геномным фитовирусам даже при системном размножении в растении. Сравнительные исследования нуклеаз показали, что только нуклеазы с РНК-деполимеразной активностью обладает ингибирующим действием по отношению в РНК-геномным фитовирусам. Таким образом, ингибирующее действие ферментов связано с их каталитической активностью (табл.2) и в соответствии, с удельной активностью

ферментного препарата могут быть подобраны оптимальные концентрации ингибитора. При этом рибонуклеаза *B.pumilus* проявляла максимальную эффективность, сравнимую с противовирусным эффектом эукариотических РНКаз в более низкой концентрации, 50 мг/мл против 300 мг/мл. Более эффективны рибонуклеазы при острой инфекции, чем при системном размножении вирусов. Наилучший эффект показала обработка ферментом растений профилактически до инфицирования их вирусом. Действие рибонуклеазы *B.pumilus* проявлялось в более широких условиях, включая лечение заболеваний, когда зараженные листья обрабатывали ферментом (табл.2) или фермент и вирус вносили одновременно, а также профилактику вирусной инфекции в условиях, приближенный к практике сельского хозяйства, когда растения обрабатывали ферментом за несколько дней до заражения вирусом, предупреждая развитие заболевания. Успешное ведение сельского хозяйства предполагает снижение потерь от болезней растений или предупреждение этих болезней. Профилактика обходится дешевле и дает лучший эффект. В связи с чем, различные агротехнические приемы, предупреждающие болезнь и способные ограничить распространение патогена представляют биотехнологический интерес. Кроме того, бациллярные рибонуклеазы нетоксичны для человека, животных и растений, являясь белками, они быстро разлагаются в природе и поэтому экологически безопасны.

Авторы выражают признательность З. Ключе и А. Рокштро (Германия) за инициацию исследований и помощь в работе, М.Н. Филимоновой за препарат нуклеазы *S. marcescens*. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Лещинская И.Б., Балабан Н.П., Капанова М.Н., Голубенко И.А. Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. Казань: Изд-во КГУ, 1980. 118 с.

2. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents // Curr. Opin. Biotechnol., 2012, V. 23(2), P.174-181.

3. Kluge S, Marcinka K. The effects of polyacrylic acid and virazole on the replication and component formation of red clover mottle virus // Acta Virol., 1979, V. 23(2), P. 148-152.

4. Hartley RW, Rogerson DL Jr. Production and purification of the extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) and its intracellular inhibitor (barstar). I. Barnase // Prep Biochem., 1972, V. 2(3), P. 229-242.

УДК 579.26+632.937

ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

М.В. Штерншис, В.П. Цветкова, Т.В. Шпатова, Е.И. Шаталова,
А.А. Беляев, С.А. Бахвалов

Новосибирский государственный аграрный университет,
630039, Россия, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160
shternshis@mail.ru

*Изучены полифункциональные свойства *Bacillus thuringiensis* и *Beauveria bassiana*, В лабораторных опытах показано инсектицидное действие бактериального и грибного энтомопатогенов на личинок колорадского жука и их антифунгальная активность в отношении возбудителя ризоктониоза картофеля *Rhizoctonia solani*. В полевых условиях доказан антагонистический эффект энтомопатогенной бактерии в подавлении ризоктониоза картофеля. Полученные результаты представляют интерес для биотехнологии получения биопрепаратов для защиты растений полифункционального действия с целью повышения их конкурентоспособности с химическими пестицидами.*

Библиогр. 8 назв.

*Ключевые слова: энтомопатогенные микроорганизмы, *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, полифункциональные свойства, колорадский жук, ризоктониоз.*

Энтомопатогенные микроорганизмы уже многие годы служат основой экологически безопасных биопрепаратов для защиты растений от насекомых. В то же время широкое использование этих биопрепаратов ограничивается достаточно узким спектром их действия. Фактором повышения конкурентоспособности биопрепаратов является полифункциональная активность биологических агентов-микроорганизмов, выражающаяся в одновременном инсектицидном, антифунгальном и ростостимулирующем действии. Так, обнаружено антифунгальное действие энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* [1,3] и энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* [8]. В лабораторных условиях показан эффект *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*, активной против колорадского жука, в отношении нескольких фитопатогенных грибов [3]. Эти работы явились предпосылкой проведения данного исследования по изучению полифункциональных свойств бактериального и грибного энтомопатогенов с использованием местной популяции колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* L. и возбудителя ризоктониоза картофеля *Rhizoctonia solani* Kuhn.

Для оценки инсектицидной активности *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (*BtH₁₀*) и *Beauveria bassiana* в отношении личинок колорадского жука в чашки Петри с листьями картофеля помещали по 10 личинок и опрыскивали бактериальной или грибной суспензией (10^6 КОЕ/мл), учитывая гибель насекомых в последующие сутки. Исходя из значений гибели личинок, рассчитывали биологическую эффективность по формуле Аббота. Для определения антагонистической активности *in vitro* использовали методику агаровых блоков [2]. Антифунгальную активность биологических агентов против гриба *R. solani*, выделенного из почвы картофельного поля в Новосибирской области, учитывали по изменению диаметра колонии гриба в сравнении с контрольным вариантом и рассчитывали ингибирующую активность [4]. В полевых условиях оценивали действие бактериального штамма *BtH₁₀* на ризоктониоз картофеля. Перед посадкой клубни картофеля сорта Юна обрабатывали бактериальной суспензией. Развитие ризоктониоза в период вегетации оценивали по пятибалльной шкале Франка на стеблях и столонах [5], рассчитывая распространенность и развитие болезни. Для клуб-

ней нового урожая определяли доли мелкой, средней и крупной фракций и общую биомассу. Лабораторные опыты проводили в пяти повторностях, полевые – в трех. Данные обрабатывали статистически, для полевых опытов рассчитывали наименьшую существенную разницу ($НСР_{05}$). Материал для исследований предоставлен к.б.н. С.Д. Гришечкиной (*BtH₁₀* из коллекции ГНУ ВНИИСХМ, С.- Петербург) и к.б.н. А.А. Леляк (*B. bassiana* из коллекции НПФ «Исследовательский центр», наукоград Кольцово).

Таблица 1. Инсектицидная активность энтомопатогенов в отношении личинок 1 (L_1) и 2 (L_2) возрастов колорадского жука в лабораторных условиях

Вариант опыта	Возраст личинок	Биологическая эффективность по суткам, %		
		3	5	7
<i>BtH₁₀</i>	L_1	80,0	96,7	100,0
	L_2	66,7	93,3	93,3
<i>B. bassiana</i>	L_1	23,3	33,3	46,7
	L_2	23,3	26,7	40,0

В лабораторном эксперименте биологическая эффективность бактериальной суспензии в отношении колорадского жука увеличивалась со временем и была выше для личинок первого возраста (табл. 1), что соответствует общим тенденциям инсектицидной активности *B.thuringiensis*. Эффективность гриба *B. bassiana* по всем датам учета была ниже, чем *BtH₁₀*.

Помимо инсектицидной активности оба энтомопатогенных микроорганизма проявили антагонистическую активность *in vitro* в отношении местного штамма возбудителя ризоктониоза *R. solani* (табл.2). При этом отмечена более высокая ингибирующая активность бактериального энтомопатогена по сравнению с грибным, особенно на третьи сутки учета роста колоний фитопатогена.

Полученные в лабораторных условиях результаты более яркого проявления инсектофунгицидных свойств энтомопатогенной бактерии явились основанием для испытания антифунгального действия этого агента биоконтроля в отношении ризоктониоза картофеля в полевых условиях. Годы исследований отличались погодными условиями. Более высокая

Таблица 2 .Влияние гриба *B. bassiana* и бактерии *BtH₁₀* на рост фитопатогенного гриба *Rhizoctonia solani*

Вариант опыта	Диаметр колоний, см, по суткам			Ингибирующая активность, %, по суткам		
	3	5	7	3	5	7
Контроль	4,24±0,12	8,98±0,02	8,98±0,02	-	-	-
<i>BtH₁₀</i>	1,26±0,02	1,72±0,11	3,28±0,35	69,0	81,0	63,3
<i>B. bassiana</i>	2,74±0,16	3,40±0,50	4,44±0,67	35,7	62,2	51,1

влажность, наблюдаемая в 2013 г. по сравнению с 2014 г., способствовала более сильному проявлению болезни картофеля, вызванной фитопатогенным грибом *R. solani* (табл.3). Тем не менее, на разных фонах проявления болезни растений в контрольном варианте, пораженность стеблей и столонов через 6 недель после обработки клубней снижалась под влиянием бактериального энтомопатогена, хотя и в разной степени (табл. 3). Чем сильнее проявлялся ризоктониоз картофеля, тем в большей степени происходило его сдерживание энтомопатогенным микроорганизмом. Так, развитие болезни на стеблях картофеля по сравнению с контролем уменьшалось в 12 раз в 2013 г. и в 7 раз в 2014 г. Такая же тенденция наблюдалась и для распространенности болезни на столонах (табл.3).

Таблица 3. Влияние *BtH₁₀* на развитие и распространенность ризоктониоза на стеблях и столонах картофеля, %

Вариант	Развитие болезни на стеблях, %		Распространенность болезни на столонах, %	
	2013 г.	2014 г.	2013 г.	2014 г.
Контроль	27,8	14,3	34,2	18,2
<i>BtH₁₀</i>	2,3	1,9	12,7	9,1
НСР ₀₅	4,2		3,6	

Следствием микробиологического контроля ризоктониоза картофеля во время вегетации стало увеличение биомассы и увеличение доли крупной фракции клубней нового урожая (табл.4).

Таблица 4. Влияние VtH_{10} на биомассу клубней картофеля нового урожая

Вариант	Фракционный состав клубней (в среднем за 2 года), %			Биомасса клубней, г/растение	
	Мелкая	Сред- няя	Крупная	2013 г.	2014 г.
Контроль	4,8	34,9	60,3	426,8	310,4
VtH_{10}	1,6	6,2	92,3	980,7	539,6
НСР ₀₅	-			64,6	

Таким образом, показана возможность использования потенциала энтомопатогенного гриба *B. bassiana* и энтомопатогенной бактерии *B.thuringiensis* как агентов биологического контроля инсектофунгицидного действия. В случае бактериального энтомопатогена доказан его антифунгальный эффект на примере ризоктониоза картофеля в полевых условиях. Проявление энтомопатогенной бактерией *B.thuringiensis* антагонизма к фитопатогенным грибам может быть связано как с продукцией хитиназы [7], так и с продукцией липопептидных биосурфактантов [6]. Полученные результаты представляют интерес для биотехнологии получения биопрепаратов для защиты растений полифункционального действия для повышения их конкурентоспособности с химическими пестицидами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-16-00101).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кузин А.И., Кузнецова Н.И., Григорьева Т.М., Зубашева М.В., Николаенко М.А., Азизбекян Р. Р. Штамм *Bacillus thuringiensis* T-281, обладающий бинарной пестицидной активностью // Биотехнология. 2008. № 4. С.39-48.
2. Рудаков О.Л. Микофильные грибы, их биология и практическое значение, Наука, М., 1981.
3. Смирнов О.В. Гришечкина С.Д. Полифункциональная активность *Bacillus thuringiensis* Berliner // С.-х. биология. 2011. № 3. С. 123-126.

4. Соколова М.В. Хитинолитическая и антигрибная активность трех штаммов бактерии рода *Serratia* // Современная биотехнология в решении проблем защиты растений. СПб., 1995. С.214-224.

5. Frank J.A., Leach S.S., Webb R.A. Evaluation of potato clone reaction to *Rhizoctonia solani* // Plant Dis. Rep. 1976. V. 60. No. 11. P.910-912.

6. Issazaden K., Rad S.K., Zarrabi S., Rahimibashar M.R. Antagonism of *Bacillus* species against *Xantomonas campestris* pv. *campestris* and *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* // Afr. J. Microbiol. Res. 2012. V.67, No.7. P.1615-1620.

7. Mehmood M.A., Latif M.,/ Hafeez F.Y. Heterologous expression and characterization of an antifungal chitinase Chi39 from *Bacillus thuringiensis* ser. *konkukian* // Pak. J. Life Soc. Sci. 2012. V.10. No.4. P. 116-122.

8. Ownley B.H., Gwinn K.D., Vega F.E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution // BioControl. 2010. V. 55. P.113-128.

УДК 573.6:631.527

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ,
ПОЛУЧЕННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

О.Н. Шуплецова, И.Г. Широких

ФГБНУ «Зональный научно-исследовательский институт сельского хозяйства Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого»,
610007, Россия, Киров, ул. Ленина 166а, тел.: (8332)33-10-26,
olga.shuplecova@mail.ru

Оценивали хозяйственную ценность сортов ячменя, созданных методом клеточной селекции на устойчивость к токсичности алюминия и засухе. Исследования в рамках лабораторных и вегетационных опытов показали преимущество регенерантных форм над исходными генотипами и стандартными сортами по степени проявления чувствительности к ионной токсичности и осмотическому стрессу, продуктивным признакам. Иммунологическая

оценка выявила среди регенерантных линий с устойчивостью к абиотическим стрессам формы с низкой степенью поражения фитопатогенными грибами. В результате полевых испытаний выделены сорта регенератного происхождения, стабильно превышающие урожайность стандартных сортов на 10,0-43,2%.

Ключевые слова: ячмень, регенерантная линия, почвенная кислотность, токсичность алюминия, засуха, стрессоустойчивость, хозяйственная ценность, иммунологическая оценка, урожайность.

Негативное влияние повышенной кислотности и токсичности алюминия в почвах Нечерноземья усугубляется в условиях неравномерного выпадения осадков на фоне повышения среднемесячных температур. Основная роль в повышении устойчивости культурных растений к абиотическим стрессам принадлежит селекции, эффективность которой повышается с внедрением методов клеточной инженерии. Благодаря соматклональной изменчивости в каллусных культурах возможно получение генотипов с изменёнными свойствами, которые при последующей регенерации растений могут быть перспективным материалом для адаптивной селекции. Однако, возникающая *in vitro* изменчивость, не всегда является адаптивной: отдельные признаки могут изменяться как в сторону повышения, так и понижения значений по сравнению с исходным сортом. Растения-регенеранты зачастую обладают более низкой продуктивностью относительно исходного сорта [1, 2]. Поэтому важным этапом успешного создания стрессоустойчивых сортов является оценка хозяйственной ценности регенерантных растений.

Для создания адаптивных сортов ячменя, обладающих хозяйственно ценными свойствами, в культуре *in vitro* получали соматклональные варианты. Для отбора устойчивых форм использовали селективные среды, которые, имитируя естественные стрессовые условия, обеспечивали возможность отбирать нужные варианты. К настоящему времени разработаны эффективные схемы отбора устойчивых каллусных линий ячменя на селективных питательных средах с ионами H^+ , Al^{3+} и полиэтиленгликолем в качестве осмотика. Селективные агенты вносили на этапах пролиферации и морфогенеза каллусной ткани отдельно и в различных комбинациях для получения форм с комплексной устойчивостью [4]. В каллусной

культуре получены соматклоны, устойчивые к ионной токсичности алюминия в условиях кислых почв и осмотическому стрессу, а также формы, устойчивые к комплексному воздействию этих факторов. Получено семенное потомство регенерантных линий, которое оценивали в лабораторных и вегетационных опытах. Полевые испытания проведены в лаборатории селекции и первичного семеноводства ячменя.

Об изменении устойчивости растений к кислотности и алюминию судили на основании определения индекса длины корней (ИДК) в условиях водной культуры. Сравнение показателя ИДК в стрессовых условиях (20 мг/л Al^{3+} , pH 4,0) выявило преимущество большинства регенерантов (четыре из пяти генотипов с ИДК 1,0-1,4) по сравнению с исходными генотипами (ИДК 0,7). Преимущество регенерантных линий перед исходными генотипами подтверждено оценкой их засухоустойчивости: у соматклонов, прошедших отбор *in vitro*, способность зерновок прорасти в условиях осмотического стресса повышалась в среднем в 2,3 раза.

Семенное потомство перспективных регенерантных линий также оценивали по биохимическим и физиологическим показателям: интенсивности перекисного окисления липидов, содержанию антоцианов и аскорбиновой кислоты в листьях, показателям CO_2/H_2O -газообмена. Был отмечен низкий уровень проявления симптомов оксидативного стресса у регенерантов по сравнению с исходными генотипами. Выявлены существенные положительные изменения в уровне накопления листьями низкомолекулярных антиоксидантов (снижение антоцианов в 2 раза) и в интенсивности видимого фотосинтеза (увеличение скорости в 2 раза), транспирации (усиление на 30-50%) и эффективности использования воды (выше на 15-39%) листьями ячменя в результате проведения через культуру каллуса и, особенно, в результате использования селективных систем *in vitro* [3]. Слабое проявление симптомов окислительного стресса, тестируемое по перекисному окислению липидов в течение всей вегетации, невысокий выход электролитов, особенно в период созревания семян, стабильное содержание хлорофиллов и антоцианов свидетельствуют о большей сбалансированности редокс-состояния регенерантных растений. Положительные изменения у отдельных соматклонов явились предпосылкой к формированию вы-

сокой урожайности в условиях стресса. Биохимические и физиологические оценки нашли подтверждение в результатах вегетационных и полевых испытаний.

В условиях вегетационного опыта изучали структурные показатели регенерантных линий 496,-07, 917-01, 774-04, 780-04 и их исходных генотипов на провокационном ($\text{pH}_{\text{сол}}$ 3,8-4,1, содержание Al^{3+} 12,78 мг/100 г почвы) и контрольном (0,45 Al мг/100г почвы при pH 5,5) почвенных фонах. Регенерантные генотипы по сравнению исходными сортами были менее чувствительны к токсичности алюминия и водорода в почве, что выражалось в повышении уровня всхожести (в среднем на 12%), увеличении продуктивной кустистости (на 21%), озерненности колоса (в 2,3 раза), массы зерна с растения (в 1,5 раза). У всех исследованных регенерантных форм выявлена повышенная средообразующая способность корневой системы, что проявлялось в оптимизации кислотности в зоне корней (сдвиг в щелочную сторону до 1,5 ед. pH) на кислом фоне.

Наряду с устойчивостью к абиотическим стрессам, сорта ячменя регенерантного происхождения зачастую выделялись более низкой степенью поражения фитопатогенными грибами (фузариозно-гельминтоспориозные корневые гнили, полосатая и сетчатая пятнистость). Очевидно, наблюдаемые кросс-адаптации становятся возможными, благодаря активации на клеточном и молекулярном уровне ряда механизмов, участвующих в формировании общей ответной реакции растения на стрессовые воздействия [1]. В результате иммунологической оценки на естественном и инфекционном фонах выделены генотипы: 917-04, 530-98, 496-07, 781-04, у которых степень поражения болезнями была достоверно ниже в сравнении со стандартными сортами Нур и Биос 1 (корневые гнили в 1,5-2 раза, полосатая пятнистость в 8 раз, сетчатая пятнистость в 2-3 раза).

В результате полевых испытаний отобраны генотипы регенерантного происхождения, на протяжении ряда лет стабильно обеспечивающие на 10,0-43,2% более высокую урожайность, чем стандартный сорт (табл.).

Таблица. Продуктивные показатели перспективных регенерантных генотипов в конкурсных сортоиспытаниях

Регенерантные линии	Урожайность (средняя за три года), т/га	Отношение к стандарту Биос 1	
		±, т/га	%
496-07	6,47	+1,72*	136,2
917-01	4,76	+0,49	111,5
781-04	4,99	+0,50	110,6
530-98	5,14	+0,57	112,4
507-07	5,07	+1,07*	121,3
514-07	5,83	+2,58*	143,2
542-08	5,10	+0,88	117,6
550-08	4,95	+0,87	115,6
530-98	5,74	+1,56*	127,5

* - достоверное отличается при $P \leq 0,05$

На основе регенерантной линии 496-07 создан сорт Бионик (заявка на патент № 65197/8558123, дата приоритета 18.11.2014 г.) путем отбора в каллусной культуре *in vitro* на селективных средах с ионами H^+ , Al^{3+} и осмотиком. В лабораторных испытаниях отмечено его превышение над стандартом и исходным генотипом в 1,5 и 2,3 раза по уровню ИДК. Преимущество нового сорта проявилось особенно наглядно на провокационном по кислотности фоне (рН 4,2) в условиях аномально жаркого и засушливого 2010 года. Прибавка к стандарту Биос 1 составила 1,73 т/га (36%). Сорт характеризуется высокой урожайностью (в среднем 6,47 т/га) в сочетании с устойчивостью к пыльной головне на естественном и искусственном инфекционных фонах.

В 2014 году передан на Государственное сортоиспытание созданный на основе регенерантной линии 917-01 сорт Форвард (заявка на патент № 65195/8558125, дата приоритета 18.11.2014 г.), рекомендованный к использованию на кислых дерново-подзолистым почвах Волго-Вятского региона для зернофуражного использования. Главное достоинство сорта – толерантность к кислым почвам. В условиях эдафического стресса (рН 3,8-4,5; Al^{3+} 0,5-9,6 мг/100г почвы) – урожайность Форварда достигала 5,5 т/га, в обычных условиях в среднем за три года 6,2 т/га. Отмечена устойчивость сорта к засухе в период налива зерна, наряду с устойчивостью к полеганию. Высокая урожайность Форварда сочетается с устойчивостью (пораже-

ние менее 1,0%) к пыльной головне, сетчатой и темно-бурой пятнистостям листьев и средней устойчивостью к полосатой пятнистости (поражение 5-6%), поражению шведской мухой. Экономический эффект нового сорта при выращивании элитного зерна предполагается получать в размере 21,4 тыс. руб. /га, при выращивании на благоприятном фоне и 33,7 тыс. руб./га при выращивании на почвах с повышенной кислотностью.

Наряду с созданием новых стрессоустойчивых сортов, полученные путем клеточной селекции одиннадцать соматональных линий ячменя включены в предварительный каталог коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова в качестве генетических источников толерантности к засухе и повышенному содержанию в почве ионов водорода и алюминия.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Шаяхметов И.Ф. Соматический эмбриогенез и селекция злаковых культур. Уфа: Изд-во Башкирск. ун-та, 1999. 166с.

2. Шевелуха В.С. (Отв. ред.) Сельскохозяйственная биотехнология: учеб. 2-е изд.- М.: Высш. шк., 2003. 421с.

3. Широких И.Г., Огородникова С.Ю., Далькэ И.В., Шуплецова О.Н. Биохимическая и физиологическая оценка растений-регенерантов, полученных в селективных системах // Известия РАН. Серия биологическая. 2011. № 6. С.703-709.

4. Шуплецова О. Н, Щенникова И.Н., Широких И.Г. Создание генотипов ячменя с комплексной устойчивостью к эдафическим стрессам методами клеточной селекции // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2015. №1-2. С.16-20.

УДК 636.087.8 : 637.12.04/07 (470.57)
СОСТАВ МОЛОКА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ
В КОРМЛЕНИИ КОРОВ ПРОБИОТИКА «ВЕТСПОРИН-АКТИВ»

Ф.Ф. Вагапов, Р.С. Юсупов.

ФГБОУ ВПО Башкирский государственный аграрный университет
450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34. Тел./факс 8-347-248-28-70,
vaqarov-63@mail.ru

Приведены результаты испытания кормового пробиотика на дойных коровах черно-пестрой породы. Использование в составе рациона коров кормовой добавки «Ветоспорин-актив» оказывало положительное влияние на химический состав и свойства молока. Наибольшее влияние оказало использование добавки в дозе 100 г на 1 т корма, что подтверждается большим выходом жира и белка, повышением его пищевой и энергетической ценности.

Ключевые слова: коровы, кормовая добавка, пробиотик, состав молока, продуктивность.

Увеличение объемов производства продукции молочного животноводства возможно за счет стабилизации поголовья животных и увеличения их продуктивности, путем создания сбалансированной кормовой базы и перехода к новым технологиям содержания и кормления [1,2].

С целью нормализации и активизации метаболических процессов в организме животных активно используются пробиотические кормовые добавки [3, 4]. Перспективным при этом является пробиотический препарат «Ветоспорин-актив», состоящий из живых микроорганизмов сенной палочки штаммов *Bacillus subtilis* 12В и *Bacillus subtilis* 11В.

Следовательно, комплексное изучение влияния пробиотического препарата «Ветоспорин-актив» на качественный состав и свойства молока, полученного от черно-пестрых коров, является актуальным и представляет большой научный и практический интерес.

Исследования проводились в период 2011-2012 гг. на базе СПК-колхоз «Герой» Чекмагушевского района Республики Башкортостан.

Из числа полновозрастных коров по принципу групп-аналогов были сформированы четыре группы животных по 12 голов в каждой. Коровы контрольной группы получали хозяйственный рацион, а коровам опытных групп в смеси с концентрированными кормами один раз в сутки во время утреннего кормления индивидуально дополнительно скармливали пробиотическую добавку «Ветоспорин-актив» в дозе: II группа – 50 г пробиотической добавки на 1 т корма, III группа – 100 г и IV группа – 200 г соответственно.

Химический состав молока определяли по методикам: отбор проб молока по ГОСТ 26809-86; массовая доля жира в молоке – кислотным методом Гербера по ГОСТ 2867-90; содержание в молоке сухого обезжиренного молочного остатка (СОМО), казеина и сывороточных белков – рефрактометрическим способом на анализаторе молока АМ-2; содержание в молоке лактозы – на ФЭК по ГОСТ Р 51259-99; массовая доля кальция в молоке – комплексометрическим методом; массовая доля фосфора в молоке – спектрометрическим методом ГОСТ Р 51473-99; органолептические свойства молока по методу В.П. Шидловской (2000); диаметр мицелл казеина, \bar{A} и масса мицелл казеина, млн. единиц молекулярного веса – по методике П.В. Кугенева и Н.В. Барабанщикова (1973); для установления наличия бактерий групп кишечной палочки делали посев на среду Эндо; стафилококков – высевом молока на среды Стафилококкагар и ГРМ № 1; для выявления дрожжеподобных и плесневых грибов – питательную среду Сабуро; безопасность молока в эпидемиологическом и радиационном отношении осуществляли в соответствии с ГОСТами.

Число и диаметр жировых шариков определяли микроскопическим исследованием и подсчетом в камере Горяева согласно рекомендациям П.В. Кугенева (1988). Количество молочного жира и белка расчетным методом. Физико-химические показатели молока изучались в сезонном аспекте (табл. 1).

Замечено, что кислотность молока имела сезонную изменчивость. Наибольшее значение кислотности молока наблюдалось в зимний период, наименьшее – в летний, в весенний и осенний сезо-

ны года отмечались промежуточные значения. В то же время во все сезоны года в молоке коров всех подопытных групп значения кислотности находились в пределах нормы и соответствовали требованиям ГОСТ Р 52054-2003.

Таблица 1. Химический состав и качество молока коров ($\bar{X} \pm S_x$)

Показатель	Сезон года	Группа			
		I	II	III	IV
Кислотность, °Т	весна	16,74±0,08	16,79±0,08	16,83±0,05	16,82±0,04
	лето	16,66±0,08	16,73±0,04	16,75±0,03	16,76±0,06
	осень	16,82±0,08	16,88±0,04	16,94±0,08	16,92±0,07
	зима	16,92±0,07	17,04±0,08	17,12±0,07*	17,10±0,08
Плотность, °А	весна	27,82±0,08	27,90±0,08	27,98±0,10	27,96±0,12
	лето	27,64±0,10	27,78±0,07	27,84±0,04*	27,82±0,07
	осень	28,52±0,08	28,74±0,08*	28,86±0,06**	28,82±0,12*
	зима	28,80±0,09	29,08±0,07*	29,20±0,05**	29,18±0,05**
Сухое вещество, %	весна	12,34±0,11	12,37±0,01	12,46±0,06	12,42±0,08
	лето	12,21±0,08	12,24±0,03	12,31±0,05	12,32±0,03
	осень	12,43±0,04	12,47±0,03	12,54±0,05	12,50±0,04
	зима	12,53±0,03	12,61±0,09	12,68±0,04**	12,66±0,07
Массовая доля жира, %	весна	3,67±0,06	3,70±0,02	3,72±0,05	3,72±0,06
	лето	3,73±0,03	3,75±0,03	3,79±0,02	3,80±0,02
	осень	3,89±0,04	3,91±0,04	3,93±0,05	3,92±0,03
	зима	3,91±0,05	3,93±0,07	3,95±0,06	3,95±0,05
Массовая доля белка, %	весна	3,12±0,03	3,14±0,02	3,15±0,02	3,15±0,03
	лето	3,16±0,04	3,18±0,02	3,20±0,03	3,20±0,03
	осень	3,15±0,05	3,17±0,01	3,20±0,02	3,19±0,02
	зима	3,27±0,02	3,31±0,02	3,34±0,01*	3,33±0,02
Лактоза, %	весна	4,72±0,03	4,72±0,02	4,73±0,01	4,73±0,01
	лето	4,64±0,01	4,63±0,01	4,65±0,01	4,64±0,01
	осень	4,68±0,01	4,69±0,01	4,71±0,01*	4,70±0,01*
	зима	4,65±0,01	4,67±0,02	4,68±0,01***	4,67±0,01

Исследованиями установлено, что молоко коров всех подопытных групп во все сезоны года характеризовалось высокой пищевой ценностью. При этом анализ межгрупповых различий свидетельствует о превосходстве по содержанию сухого вещества молока коров опытных групп. Так, весной превосходство коров II группы над сверстницами I группы по содержанию сухого вещества в молоке составляло 0,03%, летом – 0,03%, осенью – 0,04%, зимой – 0,08%,

III группы – 0,12%; 0,10%; 0,11% и 0,15% ($P < 0,01$), IV группы – 0,08%; 0,11%; 0,07% и 0,13% соответственно. Среди коров опытных групп наибольшее содержание сухого вещества во все сезоны года наблюдалось в молоке коров III группы, получавших в составе рациона добавку в дозе 100 г на 1 т корма.

Анализ данных органолептической оценки свидетельствует, что молоко все подопытных групп коров отвечало требованиям ГОСТ Р 52054-2003 «Молоко натуральное коровье – сырье» и соответствовало 5 баллам.

Таким образом, изучая физико-химические показатели молока, можно судить об их закономерном изменении во все сезоны года. При этом использование в составе рациона коров черно-пестрой породы кормовой добавки «Ветоспорин-актив» оказывало положительное влияние на химический состав и свойства молока. Наибольшее влияние оказало использование добавки в дозе 100 г на 1 т корма, что подтверждается большим выходом жира и белка, повышением его пищевой, биологической и энергетической ценности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Миронова И.В., Тагиров Х.Х. Рациональное использование биоресурсного потенциала бестужевского и черно-пестрого скота при чистопородном разведении и скрещивании. МСХ РФ, ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный аграрный университет», Издательство «Лань». Москва, 2013. – 400 с.

2. Тагиров Х.Х., Шакиров Р.Р. Воспроизводительные качества телок черно-пестрой породы на фоне скармливания пробиотической кормовой добавки «Биогумитель». Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2013. №3 (41). С.129-132.

3. Тагиров Х.Х., Юсупов Р.С. Мясная продуктивность бычков при скармливании им пробиотической кормовой добавки «Биогумитель». Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. № 1. С. 60-64.

4. Тагиров Х.Х., Шакиров Р.Р., Миронова И.В. Особенности репродуктивной функции телок черно-пестрой породы при использовании пробиотической кормовой добавки «Биогумитель». Вестник мясного скотоводства. 2013. Т. II. № 80. С. 62-67.

VI. БИОАНАЛИТИКА И ХИМИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 504.45. 064.2 (504.064.3:573.6)

ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ВОДЫ ПРЕСНОВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

Е.В. Верховина ¹, В.А. Верховина ², В. В. Верхотуров ²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Земной Коры СО РАН (ИЗК СО РАН),
664033, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова 128, verhel@crust.irk.ru

² Иркутский национальный исследовательский технический университет
664074, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова 83, verhval@mail.ru

Более 1000 штаммов микроорганизмов, выделенных из водной толщи и донных осадков глубоких рифтовых озер мира: Байкала (Россия) и Ньяса (Юго-Восточная Африка) были исследованы на наличие ферментов эндонуклеаз рестрикции (рестриктазы). В прибрежной части Байкала, находящейся под антропогенным влиянием, выявлены уникальные (Fap I и Aca I, Sse91), а также весьма редкие, нетипичные для водных экосистем ферменты (Bsi I, Cci N I). В чистых участках водной толщи и в кернах глубинного бурения донных отложений обнаружены только известные ферменты рестрикции.

Ключевые слова: ферменты, эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы), антропогенное влияние, штаммы микроорганизмов, экологические исследования, биотехнологические подходы.

Проблема контроля качества воды всегда привлекала усиленное внимание государственных органов и специалистов, ответственных за охрану здоровья населения и защиту окружающей среды. Это обусловлено той особой ролью воды, которую она играет в становлении биосферы и развитии жизни. В связи с антропогенным

загрязнением окружающей среды, пресная вода становится одним из важнейших и трудно возобновляемых природных ресурсов. Особенно это касалось озера Байкал – участка мирового природного наследия.

Одной из актуальнейших проблем в экологических исследованиях является выяснение роли микроорганизмов и возможной их изменчивости в процессах превращения веществ, поступающих в озеро Байкал при антропогенном влиянии. Сравнение состава бактериопланктона по наличию или отсутствию ферментов эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) позволяет оценить изменение структуры микроорганизмов.

Известно, что специфичность рестриктазы определяет характеристику бактерии, из которой она выделена. Поэтому этот фермент может служить характеристикой специфичности самой бактерии- продуцента. Многолетние исследования, начиная с 50-х годов, дают основание такую характеристику бактерии не менее достоверной, чем морфологические отличия и физиолого- биохимические признаки [1],

Бактерии- продуценты рестриктаз, известны ранее лишь теоретически, были выделены из озера Байкал в районах антропогенного влияния (вблизи п. Листвянка и г. Байкальска). В настоящее время антропогенное воздействие на озеро усиливается с каждым годом, особенно в районе его южной части. Указанное положение обусловлено не только относительно высокой плотностью проживающего здесь населения, но и развитием в этом районе интенсивного отечественного и международного туризма. Кроме того, в результате техногенного воздействия на экосистему Байкала после строительства ГЭС в 1958 году, озеро стало практически изолированным регулируемым водохранилищем каскада Ангарских водохранилищ. Изолированность экосистемы Байкала обеспечивает благоприятные условия для образования новых видов микроорганизмов. Поскольку хорошо известно, что при прочих равных условиях скорость эволюции вида обратно пропорциональна продолжительности генерации [2], то очевидна целесообразность поиска эндемичных видов и, следовательно, продуцентов новых ферментов среди байкальских микроорганизмов.

Бактерии-продуценты рестриктаз, известные ранее лишь теоретически, были обнаружены лишь в районах антропогенного влияния. Так, например, штамм бактерий *Flavobacterium aquatil*- продуцент рестриктазы Fau I был выделен из воды оз. Байкал в районе п. Листвянка. Штамм бактерии *Acinetobacter calcoaceticus*- продуцент рестриктазы Aca I был выявлен в районе г. Байкальска [3]. Продуцент *Bacillus sphaericus* эндонуклеазы рестрикции Bsi I, который является новым ферментом среди известных рестриктаз, был выделен из этого же района. В районе истока Ангары выделен штамм бактерии *Curtobacterium citrium*, продуцент Cci NI, который является изошизомером Not I [4]. В штаммах бактерий, выделенных из чистых участков озера и древних донных осадков рестриктазы обнаруживаются редко или являются хорошо известными [5].

Бактерии- продуценты рестриктаз, были обнаружены в районах антропогенного влияния (район Листвянка с 2004 по 2014 г.). Частота встречаемости ферментов рестриктаз представлена в таблице 1. Чаще всего выявляются рестриктазы HaeIII, ClaI, а реже - рестриктазы EcoRV и BamHI.

Таблица 1. Частота встречаемости ферментов рестриктаз в процентах за период 2005-2014 гг.

Прототип	Сайт узнавания	% встречаемости
HaeIII	5'-GGCC-3'	14
ClaI	5'-ATCGAT-3'	9
PstI	5'-CTGCAG-3'	4
Bpu10I	5'-CCTNAGC-3'	5
Sau96I	5'-GGNCC-3'	7
MboI	5'-GATC-3'	7
EcoRII	5'-CCWGG-3'	5
XhoII	5'-RGATCY-3'	4
BalI	5'-TGGCCA-3'	4
XhoI	5'-CTCGAG-3'	9
EcoRV	5`-GATATC-3`	4
BamHI	5`-GGATCC-3`	4

Подобный результат - изменение качественного состава бактериопланктона в районах антропогенного влияния, подтверждают и исследования близнеца Байкала - озера Ньяса. Исследовано более 350 проб, в одной из них обнаружена рестрикционная активность (Xho I) со специфичностью очень близкой к той, что обнаружена и в байкальском керне и хорошо известной ранее и даже точно такая же (Xho II). Этот район находится в области существенно меньшего антропогенного пресса (население не более 1000 человек), чем указанные районы Байкала с антропогенным влиянием. Лишь в порту Утунга, где население значительно выше чем в других районах оз. Ньясы, в грунте обнаружен уникальный штамм бактерий с двумя рестриктазами (Xmn I и Bal I).

Как нам видится, объяснение этому явлению состоит в том, что бактерии являются прокариотами, т.е. одноклеточными, не имеющими иммунной системы, которая защищала бы их от врагов, например вирусов. Эту роль и выполняет фермент рестриктаза, который уничтожает любую попавшую внутрь клетки постороннюю молекулу ДНК, разорвав ее по определенной последовательности. После этого, молекула ДНК становится неспособной к воспроизводству и "погибает". Поэтому, где есть "посторонние" вирусы, появляются штаммы бактерий с уникальными рестриктазами. И только эти бактерии могут защищаться от "врагов" - посторонних вирусов и микроорганизмов, неспецифичных для водоема, а поступающие туда с человеческой деятельностью.

Таким образом, проделанные оригинальные исследования с использованием биотехнологических методов в экологических задачах, дают возможность судить о качественном изменении микроорганизмов в прибрежной части Байкала, находящейся под антропогенным влиянием. Полученные результаты многолетних исследований показали, что микроорганизмы являются хорошими индикаторами на ранней стадии антропогенного влияния. Качественное изменение бактериопланктона по наличию или отсутствию рестриктаз выявлено в районах антропогенного влияния. В бактериях, полученных из чистых участков озера и кернов донных осадков, рестриктазы в бактериальных штаммах обнаруживаются редко и являются хорошо известными. [5].

Это позволяет рекомендовать их для мониторинговых наблюдений глубоководных рифтовых пресноводных озер. Полученные результаты являются вкладом в решение проблемы надежности индикации качества воды, именно на ранней стадии антропогенного влияния, что крайне необходимо для прогноза дальнейшего развития опасных антропогенных воздействий на пресноводные экосистемы, в том числе и на экосистему Байкала.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Янулайтис А.А. Рестрикционные эндонуклеазы //Журн. Всесоюзн. Хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1984. Т.29. №2. С 133-138.
2. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции (пер. с англ. под ред Б.Н. Сидорова). М. Мир 1984. 96 С.
3. Дедков В.С., Репин В.Е., Речкунова Н.И. Дегтярев С.Х., Верховина В.А. и др. Выявление штаммов- продуцентов эндонуклеаз рестрикции среди водных микроорганизмов озера Байкал. // Изв. Сиб. Отд. АН СССР, сер. "Биологич. науки". 1990. №1. С. 35-37.
4. Гончар Д.А., Дедков В. С., Верховина В.А. и др. Эндонуклеаза рестрикции Sse91 из штамма *Sporosarcina* sp. 9D узнает последовательность 5'-AATT-3'. Молекулярная генетика. 1998. №1.С. 32-34.
5. Верховина Е.В., Верховина В.А., Гончар Д. А., Дедков В. С., Дегтярев С. Х., Чернухин В. А. Разработка и апробация физико-химических методов в экологических исследованиях //Вода: химия и экология 2014. № 10. С. 119-122.

УДК 615.281.9, 543.544.5.068.7
ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИСТЬЕВ
***SOLANUM NIGRUM* L. С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ**
БИОПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Д.Д. Вилкова, О.В. Астафьева, К.В. Попко

ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет»,
414000 Россия, Астрахань, пл. Шаумяна, 1, тел. (8512) 52-49-95,
факс (8512) 51-82-64, easy_breath@mail.ru

*В работе проводили исследования химического состава экстрактов листьев паслена черного (*Solanum nigrum* L.) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Были определены некоторые органические кислоты, наличие которых в экстрактах может свидетельствовать об их антимикробных свойствах. Была исследована антибактериальная активность экстрактов листьев в отношении условно-патогенных штаммов *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и зафиксировано ингибирующее действие в их отношении. В дальнейшем на основе этих экстрактов возможны будут разработки биопрепаратов с антибактериальными свойствами.*

Табл. 1. Библиогр. 7 назв.

*Ключевые слова: паслен черный, *Solanum nigrum* L., ВЭЖХ, экстракция, антибактериальная активность.*

Паслен черный (*Solanum nigrum* L.) - это однолетнее травянистое растение. Цветет маленькими белыми цветками летом и осенью. Завязывает ягоды, которые по мере созревания становятся черными. Растет практически везде, кроме самых северных районов и пустынь [3]. Объектом исследований являлось именно это растение, так как в нашей стране его химический состав и свойства мало изучены. По данным имеющейся литературы известно, что он обладает антибактериальными свойствами [6]. Известно, что в листьях этого растения имеются аскорбиновая кислота, стероидные сапонины, каротин, лимонная кислота [1]. Эти или же другие пока еще не-

известные компоненты могут обладать антибактериальной активностью и, в дальнейшем на их основе можно разработать биопрепараты.

Объектом исследования являлись экстракты листьев *S. nigrum*. Согласно методикам [7,5] были получены водный экстракт из свежих листьев и 70 % спиртовой экстракт из сухих листьев паслена.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) определяли наличие органических кислот и их количество. Определение проводили на жидкостном хроматографе Waters Alliance 2695 Separations Module с использованием стандартов органических кислот.

Для определения антибактериальных свойств были выбраны тест-объекты условно-патогенные штаммы *Escherichia coli* Migula СК ВКПМ В-1911, *Bacillus subtilis* Ehrenberg ВКПМ В-1919, *Staphylococcus aureus* Rosenbach ВКПМ В-1899, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ФГУП ГосНИИГенетика). Влияние экстрактов листьев *S. nigrum* исследовали методом прямой диффузии в питательную среду (РПА) с использованием лунок [4]. Посевы инкубировали в течение 7 дней при температуре, оптимальной для роста каждого вида бактерий. В качестве контроля использовали дистиллированную воду и 70 % этиловый спирт.

Результаты экспериментов обрабатывали общепринятыми методами математической статистики [2] в виде таблиц с помощью программы Microsoft Excel, BioStat, использовали текстовый редактор Microsoft Word.

Методом ВЭЖХ в водном экстракте сухих листьев *S. nigrum* были определены следующие органические кислоты: аспарагиновая кислота (0,151 г/л), фумаровая кислота (0,010 г/л). В спиртовом экстракте *S. nigrum* из свежих листьев были обнаружены пировиноградная кислота (0,019 г/л), уксусная кислота (1,187 г/л), лимонная кислота (0,993 г/л), янтарная кислота (0,208 г/л).

Результаты оценки антибактериальной активности двух экстрактов показали отличные друг от друга результаты (табл. 1). Спиртовой экстракт проявил ингибирующее действие в отношении

E. coli на 3 день эксперимента, в то время как водный экстракт - на 5 день роста. Максимальная зона задержки роста *B.subtilis* и *S.aureus* наблюдалась под воздействием водного экстракта, но следует отметить, что на 5 день виден вторичный рост *B.subtilis*. Также спиртовой экстракт оказал наиболее подавляющее действие на рост *B.subtilis* и *S.aureus* на 5 день.

Как видно, спиртовой экстракт листьев *S. nigrum* обладал хорошо выраженной антибактериальной активностью в отношении всех трех исследуемых штаммов бактерий. Также именно в данном экстракте был определен отличный от водного экстракта состав органических кислот. Это говорит о необходимости дальнейшего исследования химического состава данных экстрактов, а также других биологически активных свойств.

Таблица 1 Сравнительное антибактериальное действие экстрактов листьев *S. nigrum*

Исследуемые тест-культуры	ДЗЗР, мм							
	Экстракт спиртовой		Экстракт водный		Контроль (вода дист.)		Контроль (этиловый 70 %спирт)	
	3 день	5 день	3 день	5 день	3 день	5 день	3 день	5 день
<i>E. coli</i>	19,3±3,2*	16±4,2*	10±2,1*	18,7±3,3*	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B.subtilis</i>	9±1,1*	15±3,9*	22,2±0,9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>S.aureus</i>	15,7±2,1*	17,7±3,9*	20,2±1,01*	18,7±3,3*	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание: * - разница с контролем достоверна при $p < 0,05$; ДЗЗР - диаметр зоны задержки роста.

Водный экстракт из свежих листьев и спиртовой экстракт из сухих листьев паслена черного (*S. nigrum*) обладают выраженной в разной степени антибактериальной активностью в отношении *E. coli*, *B.subtilis*, *S.aureus*.

Водный и спиртовой экстракты в отношении *S.aureus* и *E. coli*, соответственно, обладали пролонгирующим действием (т.е. не сни-

жали свою активность на протяжении определенного времени эксперимента).

Наибольшая зона задержки роста *B. subtilis* и *S. aureus* под действием спиртового экстракта и *E. coli* под действием водного экстракта наблюдалась на 5 день, в то время как водный экстракт в отношении *B. subtilis* являлся стимулятором роста.

Наличие в экстрактах лимонной, уксусной и фумаровых кислот обуславливает их антибактериальный эффект, так как известно, что они входят в состав многих биопрепаратов с антибактериальными свойствами.

Выраженное антибактериальное действие исследуемых экстрактов листьев *S. nigrum* позволяет говорить о возможности более детального исследования состава и свойств экстрактов с целью дальнейшей разработки биопрепаратов с ценными свойствами.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Здоровье человека и средства народной медицины. - Режим доступа: <http://www.smdoctors.ru/pdf/paslen-cherniie>
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие для биол. спец. вузов, 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
3. Мартынова Е. Паслен черный, 2013 - Режим доступа: <http://fb.ru/article/57762/paslen-cherniy>
4. Сухенко Л.Т. Лабораторно-практические занятия по микробиологии с основами вирусологии, в 2 ч., Ч.2. Астрахань: Изд-во АГПУ, 1999. С. 5—9.
5. Aamir Mushtaq, Mahmood Ahmad. Hepatoprotective activity of Aqueous-Ethanol Extract of Solanum nigrum against nimesulide intoxicated albino rats // European Journal of Zoological Research. 2013. V.2, №2. P.19-25
6. Parameswari K., Sudher Aluru, Kishori. B. In vitro antibacterial activity in the extracts of Solanum nigrum // Indian Streams Research Journal. 2011. V.2, №7. P. 1-4.
7. Sweta Prakash, Ashok K. Jain. Antifungal activity and preliminary phytochemical studies of leaf extract of Solanum nigrum Linn // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2011. V.3, №4. P. 352-355.

УДК 579.222, 577.118, 502.75

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ЛИПИДНЫЕ
КОМПОНЕНТЫ ГРИБНЫХ КУЛЬТУР *GANODERMA*
РАЗНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН**

О.М. Цивилева¹, Т.Ф. Нгуен², Л.Н. Ву², М.П. Чернышова¹,
Н.А. Юрасов³, А.Н. Петров⁴

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук
410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13, (8452)970444,
tsivileva@ibppm.sgu.ru

²Южный институт экологии Вьетнамской академии наук и технологий
Вьетнам, г. Хошимин, 01 Мак Дин Чи, Дист 1, npthao.tnsv@gmail.com

³Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, nik-yurasov@yandex.ru

⁴Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, (3952)241927

*Представлено краткое описание исследований химических компонентов мицелия представителей пяти видов высшего гриба *Ganoderma*, источником получения коллекционных культур которых служили территории Национальных парков Вьетнама (*Ganoderma colossus*, *G. neojaponicum*, *G. cattienensis*, *G. lucidum*, *G. arplanatum*). Для сравнения использовали культуры трех штаммов *Ganoderma*, представленных в коллекциях РФ. Низкомолекулярную химическую составляющую мицелия и культуральной жидкости характеризовали методами газовой хроматографии в вариантах ГХ-МС и ГЖХ. 2-Монолинолеин, 2,3-дигидроксипропилэлаидат, жирные спирты, алкиловые эфиры жирных кислот, свободные жирные кислоты, детектированные в пигментированном мицелии на плотных средах и в глубинных культурах при варьировании условий выращивания, являются перспективными объектами применения в биотехнологии пищевых добавок, биотоплива, систем доставки лекарственных средств с использованием липидов.*

Ключевые слова: *Ganoderma*, объекты биотехнологий, липиды высших грибов, химический состав, газохроматографический анализ.

Одними из наиболее биотехнологически ценных высших грибов - ксилотрофов являются представители рода *Ganoderma*. Национальные парки Вьетнама - природоохранные территории, чьи богатые ресурсы включают и различные виды макромицетов-деструкторов древесины, съедобных и/или лекарственных видов.

Сравнительные исследования вьетнамских и российских коллекционных культур *Ganoderma* предприняты с целью выявления и систематизации физиолого-биохимических различий видов *Ganoderma* в плане свойств ряда вторичных метаболитов и стрессоустойчивости, а также на развития фундаментальных основ видоспецифичности внутри рода *Ganoderma* и практических рекомендаций по оптимизации целенаправленного культивирования отдельных видов [1].

Редкие виды *G. colossus*, *G. neojaponicum*, *G. cattienensis* и характерные для тропических регионов штаммы *G. lucidum*, *G. applanatum* использовали для сравнительных исследований с коллекционными штаммами *G. lucidum*, *G. applanatum*, *G. valesiacum* (ИБФРМ РАН и Иркутский государственный университет).

При подготовке ГХ-МС исследований сухие образцы мицелия, белого или с развитой пигментацией, полученного твердофазным культивированием, экстрагировали смесями этанол-метанол-вода. Измерения проводили на газовом хромато-масс-спектрометре Finnigan, модель Trace DSQ ("ThermoFinnigan", США). Распознавание обнаруженных соединений проводили путем сравнения полученных масс-спектров с масс-спектрами библиотеки NIST, 2011. Относительный уровень каждого компонента (как отношение абсолютной величины площади его хроматографического пика к сумме величин площадей в данном образце) выражали в массовых процентах. Мольный процент каждого химического компонента вычисляли по отношению к общему числу моль всех компонентов.

При подготовке ГЖХ исследований воздушно-сухой (35°C) мицелий, полученный глубинным культивированием, механически измельчали, экстрагировали смешанными растворителями. Свободные жирные кислоты (ЖК) анализировали в форме их метиловых

эфиров [2] на газожидкостном хроматографе Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Япония) с капиллярной колонкой Equity-1 (Supelco, США) и пламенно-ионизационным детектором, в Центре коллективного пользования (ЦКП) научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН). ЖК идентифицировали по величинам времени удерживания их метиловых эфиров.

Пигментированный мицелий изучаемых видов *Ganoderma* содержал ценные низкомолекулярные вещества. Разнообразные жидкокристаллические системы основаны на природных соединениях низкой молекулярной массы - производных липидов. Они служат в качестве химических стабилизаторов и покрытий для защиты лекарственных средств при их доставке в организме, в качестве субъекта широкой дискуссии вокруг биотоплив [5]. Среди детектированных соединений - моноглицериды. Как глицерилмоноолеат, так и глицерилмонолинолеат интенсивно изучаются на предмет их использования в биоадгезивных системах доставки лекарств [6]. Кубические кристаллы глицерилмоноолеата - компонент трансдермальных систем доставки лекарств с минимальными побочными эффектами [7]. 2-Моноолеин демонстрирует разнообразные биологические активности (в том числе сильные антиоксидантные и антиатеросклеротические свойства, [8]), служит эмульсификатором и ПАВ в пищевых производствах, фармацевтической и косметической индустрии. Таким образом, перспективное биотехнологическое применение может базироваться на компонентах липидной природы пигментированного мицелия ганодермы.

Состав ЖК общих липидов глубинного мицелия исследуемых штаммов *Ganoderma* представляли в виде табличных данных. Содержание каждого компонента выражали как процент от суммы ЖК в образце (Таблица).

Количественно оценивали суммарное содержание ЖК разных групп (насыщенных, мононенасыщенных, полиненасыщенных, короткоцепочечных и длинноцепочечных кислот, гидроксикислот). В экстрактах общих липидов глубинного мицелия доминировали 9,12-октадекановая, гексадекановая и 9-октадеценная кислоты.

Таблица. Жирнокислотный состав общих липидов глубинного мицелля *Ganoderma* (% от суммы жирных кислот)

ЖК ^a	Объект исследования ^b							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
11:0	–	0.68 ± 0.06	2.20 ± 0.17	0.12 ± 0.02	4.72 ± 0.36	2.39 ± 0.18	16.0 ± 1.2	0.42 ± 0.05
2-OH 10:0	–	0.71 ± 0.06	1.08 ± 0.09	0.10 ± 0.03	2.60 ± 0.20	2.22 ± 0.17	11.4 ± 0.9	0.29 ± 0.03
12:0	–	0.43 ± 0.05	–	0.36 ± 0.03	–	tr	–	0.12 ± 0.03
13:0	–	–	–	tr	–	0.37 ± 0.03	–	tr
2-OH 12:0	–	0.50 ± 0.05	0.39 ± 0.03	tr	0.69 ± 0.06	0.70 ± 0.06	tr	0.16 ± 0.03
3-OH 12:0	–	0.44 ± 0.05	1.15 ± 0.09	–	–	–	–	–
[14:1 cis] c	2.15 ± 0.26	–	–	–	4.85 ± 0.56	–	tr	–
[14:1 trans]	0.72 ± 0.06	–	–	–	tr	–	tr	–
14:0	1.01 ± 0.09	1.24 ± 0.11	1.24 ± 0.09	1.06 ± 0.09	1.60 ± 0.12	2.26 ± 0.18	6.67 ± 0.51	0.49 ± 0.05
15:0	1.48 ± 0.12	6.52 ± 0.50	2.73 ± 0.21	2.12 ± 0.17	3.85 ± 0.31	4.09 ± 0.32	5.62 ± 0.44	4.30 ± 0.33
3-OH 14:0	–	–	1.35 ± 0.11	–	–	–	–	–
i-16:0	–	0.35 ± 0.03	–	–	–	–	–	–
16:1 cis9	1.63 ± 0.14	tr	–	tr	0.37 ± 0.04	tr	tr	0.48 ± 0.05
[16:1 trans9]	tr	0.30 ± 0.03	–	tr	2.06 ± 0.17	tr	tr	1.70 ± 0.14
16:0	23.8 ± 1.8	23.0 ± 1.8	19.0 ± 1.4	24.9 ± 2.0	27.1 ± 2.0	28.9 ± 2.2	39.0 ± 3.0	19.4 ± 1.8
17:0	–	1.77 ± 0.13	1.66 ± 0.14	0.91 ± 0.08	2.57 ± 0.19	0.97 ± 0.08	tr	0.80 ± 0.06
[18:4]	2.81 ± 0.22	–	6.72 ± 0.51	tr	4.69 ± 0.36	9.81 ± 0.75	tr	1.62 ± 0.13
2-OH 16:0	–	0.43 ± 0.05	–	tr	–	tr	–	0.10 ± 0.03
18:2 cis9,12	25.3 ± 1.9	47.7 ± 3.6	35.8 ± 2.7	46.5 ± 3.4	26.5 ± 2.1	20.3 ± 1.7	7.06 ± 0.54	58.3 ± 4.3
18:1 cis9	32.7 ± 2.5	8.10 ± 0.62	15.6 ± 1.1	21.3 ± 1.7	6.75 ± 0.52	14.7 ± 1.1	14.3 ± 1.2	6.63 ± 0.51
18:1 trans9	1.19 ± 0.09	4.85 ± 0.38	1.44 ± 0.11	0.58 ± 0.06	3.96 ± 0.31	0.61 ± 0.06	tr	3.90 ± 0.31
18:0	7.29 ± 0.55	2.93 ± 0.23	5.95 ± 0.46	1.76 ± 0.14	6.98 ± 0.52	12.8 ± 1.1	tr	1.27 ± 0.13
[20:1 20:2] +	–	–	3.38 ± 0.26	–	–	–	–	–
20:0	–	–	0.28 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.73 ± 0.07	tr	tr	–

^a (Число атомов углерода) : (Число двойных связей в ацильной цепи жирной кислоты)

^b I - *G. colossus* SIE1303; II - *G. neojaponicum* SIEbgm; III - *G. cattienensis* SIE1302; IV - *G. lucidum* SIE1303; V - *G. applanatum* SIE1304; VI - *G. lucidum* 1315; VII - *G. applanatum* 0154; VIII - *G. valesiacum* 120702

^c в скобках - наиболее вероятная идентификация; "-" - отсутствует; tr - количества < 0.1 %

Массовая доля этих трех соединений находилась в пределах от 61% (*G. applanatum* 0154) до 94% (*G. lucidum* 1315). Короткоцепочечные и ЖК с очень длинными цепями не являлись преобладающими фракциями свободных ЖК мицелия *Ganoderma*.

1-Октен-3-ол и 3-октанол выявлены как основные летучие соединения в наших экспериментах, что не противоречило более ранним работам других авторов, изучавших летучие компоненты мицелия *Ganoderma lucidum* [3] и *G. sinense* [4].

Основные различия между профилями ЖК глубинного мицелия изучаемых видов были количественными, и, согласно представлениям [9], достаточно четко отражали систематическую принадлежность видов. Суммарное содержание ЖК было максимально в культуре *G. lucidum* SIE1303, а также высоко в *G. valesiacum* и *G. colossus*; в остальных штаммах было в 2 - 4 раза меньше.

В целом результаты анализа ЖК глубинного мицелия *Ganoderma* свидетельствовали о более высоком уровне ненасыщенных кислот по сравнению с насыщенными. Высокая степень ненасыщенности общих липидов мицелия была характерна для *G. valesiacum*, содержавшей около 58% их в форме C_{18:2}. Несколько меньшие относительные количества линолевой кислоты, около 47%, были детектированы в *G. neojaponicum* SIEbgm и *G. lucidum* SIE1303. Максимальный в нашем эксперименте уровень C_{18:1} (около 33% от суммы ЖК) оказался в *G. colossus*. Пул ненасыщенных липидов перечисленных видов включал также мононенасыщенную C_{14:1}, найденную у *G. colossus* (и *cis*-, и *trans*-изомеры) и *G. applanatum* SIE1304 (*cis*-изомер).

Длинноцепочечные ЖК (16-19 атомов углерода в молекуле), детектированные для всех штаммов *Ganoderma*, были представлены (в порядке снижения уровня кислоты) линолевой, пальмитиновой, олеиновой, стеариновой кислотами. При этом пальмитиновая кислота преобладала среди перечисленных соединений в *G. lucidum* 1315 и *G. applanatum* SIE1304. Известно, что пальмитиновая кисло-

та способна индуцировать апоптоз клеток MOLT-4 (лейкемия человека), а стеариновая - ингибировать способность раковых клеток к колониеобразованию [10].

ЖК с разветвленным углеродным скелетом $i\text{-C}_{16:0}$ была детектирована в заметных количествах в *G. neojaponicum*. Этот факт наряду с высоким содержанием (6.5%) ЖК с нечетным числом атомов углерода $\text{C}_{15:0}$ и присутствием гидроксикислоты $\text{C}_{2\text{-OH } 16:0}$ выявлены как особенности именно данного биологического вида. Другая гидроксикислота $\text{C}_{3\text{-OH } 14:0}$ нами детектирована исключительно у *G. cattienensis*. Принято считать, что среди гидроксикислот высших грибов преобладают кислоты с 2-ОН группами. Обнаружение 3-гидрокси-соединений, $\text{C}_{3\text{-OH } 12:0}$ и $\text{C}_{3\text{-OH } 14:0}$, в двух видах *Ganoderma* заслуживает дальнейшего исследования на предмет возможности использования в таксономических целях.

Следует отметить также необычное разнообразие гидрокси-, короткоцепочечных, ненасыщенных ЖК, кислот с нечетным атомов углерода в молекуле в мицелии *Ganoderma valesiacum*. Выдающиеся лекарственные свойства *Ganoderma* усилены низкомолекулярными компонентами мицелия липидной природы.

Настоящее исследование частично поддержано грантом РФФИ № 12-04-93013_Viet-a, и грантом VAST.HTQT. NGA.08/2012-2013 Вьетнамской академии наук и технологий.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Tsivileva O.M., Nguyen T.P., Vu L.N., Lyubun E.V., Voronin S.P., Gumenyuk A.P., Nikitina V.E. Biotechnologically valuable species as subjects of Russian-Vietnamese research cooperation in 2012-2014 dealt with mycology // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2014. № 3 (8). С. 75-77.
2. Song C.H., Cho K.Y., Nair N.G., Vine J. Growth stimulation and lipid synthesis in *Lentinus edodes* // *Mycologia*. 1989. V. 81, № 4. P. 514-522.
3. Chen Z.J., Yang Z.D., Gu Z.X. Determination of volatile flavor compounds in *Ganoderma lucidum* by HS-SPME-GC-MS // *Food Research and Development*. 2010. V. 31, № 2. P. 132-135.
4. Wang X.L., Han W.J., Zhou G.Y. Analysis of Volatile Flavor Compounds in Submerged Cultured *Ganoderma sinense* Mycelium by

Headspace Gas Chromatography // *In: 2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI'09), IEEE, 2009. P. 1-4.*

5. Likozar B., Levec J. Transesterification of canola, palm, peanut, soybean and sunflower oil with methanol, ethanol, isopropanol, butanol and *tert*-butanol to biodiesel: Modelling of chemical equilibrium, reaction kinetics and mass transfer based on fatty acid composition // *Applied Energy*. 2014. V. 123. P. 108-120.

6. Zabara A., Mezzenga R. Controlling Molecular Transport and Sustained Drug Release in Lipid-Based Liquid Crystalline Mesophases (Review) // *Journal of Controlled Release*. 2014. V. 188. P. 31-43.

7. Estracanhollí É.A., Praça F.S.G., Cintra A.B., Pierre M.B.R., Lara M.G. Liquid Crystalline Systems for Transdermal Delivery of Celecoxib: *In Vitro* Drug Release and Skin Permeation Studies // *AAPS PharmSciTech*. 2014. V. 15, № 6. P. 1468-1475.

8. Wang X. (Xiaosan), Liang L., Yu Z., Rui L., Jin Q., Wang X. (Xingguo). Scalable synthesis of highly pure 2-monoolein by enzymatic ethanolysis // *European Journal of Lipid Science and Technology*. V. 116, № 5. P. 627-634.

9. Marekov I., Momchilova S., Grung B., Nikolova-Damyanova B. Fatty acid composition of wild mushroom species of order Agaricales - Examination by gas chromatography-mass spectrometry and chemometrics // *J. Chromatogr. B*. 2012. V. 910. P. 54-60.

10. Lau B.F., Abdullah N., Aminudin N., Lee H.B., Yap K.C., Sabaratnam V. The Potential of Mycelium and Culture Broth of *Lignosus rhinocerotis* as Substitutes for the Naturally Occurring Sclerotium with Regard to Antioxidant Capacity, Cytotoxic Effect, and Low-Molecular-Weight Chemical Constituents // *PloS one*. 2014. V. 9, № 7. e102509.

УДК 541.061, 54.384.2

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
КОМПОНЕНТОВ СОЦВЕТИЙ БАРХАТЦЕВ
ОТКЛОНЕННЫХ *TAGETES PATULA* L.**

К. В. Попко, Д. Д. Вилкова, О. В. Астафьева

ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный университет»,
414000 Россия, Астрахань, пл. Шаумяна, 1, тел. (8512) 52-49-95,
факс (8512) 51-82-64, enogue50@gmail.com

Исследованы экстракты, полученные из соцветий Tagetes patula L. методом проведения качественных реакций на наличие веществ классов флавоноидов, терпеноидов, алкалоидов. Выбранные методы экстракции направлены на выделение фенольных (в частности, флавоноидов) и терпеновых соединений.

Ключевые слова: Бархатцы отклоненные, Tagetes patula L., экстракты, качественные реакции, флавоноиды, терпеноиды, алкалоиды.

Рис. 1. Табл. 1. Библиогр. 5 назв.

Бархатцы отклоненные относятся к ботаническому роду *Tagetes*, насчитывающему около 50 видов. Однолетние теплолюбивые растения. Происхождением обязаны Южной Америке и Южной Африке, в Европе присутствуют как садовые декоративные растения.

За долгую историю бархатцы нашли многостороннее применение, люди используют их в пищевой промышленности как пряность, в парфюмерной промышленности используется их эфирное масло. Также обнаружены антибактериальные, противогрибковые и некоторые другие свойства. Столь обширное применение этих растений обусловлено их химическим составом [2]. Комплексы веществ флавоноидной и алкалоидной природы несут в себе самые разнообразные свойства. Данная работа направлена на изучения составляющей этих веществ.

Объектом исследования являлись соцветия бархатцев отклоненных *Tagetes patula* L. Собранные в момент цветения соцветия *T.*

patula, искусственно культивируемых в Астраханской области, были высушены при комнатной температуре.

В результате анализа литературных данных [1,5] подобраны методы экстрагирования и экстрагенты для приготовления экстрактов. Как экстрагенты выбраны 70% этиловый спирт и дистиллированная вода. Было выбрано четыре метода экстрагирования:

Спиртовая (70% этанол) экстракция методом дробного кипячения.

Спиртовая (70% этанол) экстракция методом настаивания в течение 48 часов.

Водная экстракция методом кипячения

Водная экстракция методом настаивания в течение 48 часов.

Химический анализ полученных экстрактов проводили серией качественных реакций: реакции на определение флавоноидов (реакция с хлоридом железа (III), реакция с аммиаком, борно-лимонная реакция), реакции на определение гликозидов: реакция Келлер-Килиани; реакции осаждения на определение алкалоидов (реакция Вагнера-Бушарда, реакция Марки).

Специфических реакции для всех флавоноидов не существует. Однако реакция с хлоридом железа (III) дает зеленый цвет, что свидетельствует о присутствии флавонолов, коричневая — флавононов и халконов, красноватая или бурая — флавоны. Борно-лимонная реакция позволяет обнаружить 5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы, которые взаимодействуют с борной кислотой в присутствии лимонной, образуя желтую окраску.

Так же характерной реакцией на флавоноиды считается их взаимодействие с аммиаком: флавоны, флавонолы, флавононы и флавононолы растворяются с образованием желтой окраски, которая при нагревании изменяется до оранжевой или коричневой [3,4].

В таблице №1 представлены результаты качественных реакций на обнаружение флавоноидов в четырех образцах экстрактов (образец №1 — 70% этанольный экстракт, полученный методом кипячения, №2 — 70% спиртовой экстракт, полученный методом настаивания, №3 — водный экстракт, полученный методом кипячения, №4 — водный экстракт, полученный методом настаивания).

Таблица 1. Качественные реакции на определение флавоноидов в экстрактах соцветий бархатцев отклоненных

Качественные реакции на фенольные соединения	Цвет окрашивания			
	Образец № 1	Образец №2	Образец №3	Образец №4
С хлоридом железа (III)	Зеленый	Зеленый	Коричневый	Коричневый
С аммиаком	Оранжевая	Оранжевая	Оранжевая	Коричневая
Борно-лимонная	Красновато-желтая	Красновато-желтая	Желтая	Желтая

В качестве подтверждения также были проведены спектрометрический и хроматографический анализы, подтверждающие наличие веществ фенольного класса.

Качественные реакции на алкалоиды не дали нужных результатов, ни в одной из проб не образовалось осадка. В первую очередь это указывает на то, что метод экстрагирования подобранный нами не подходит для извлечения алкалоидных соединений.

Реакция Келлер-Килиани представляет собой образование двухфазной субстанции, на границе разделения двух фаз (смеси сульфата железа с образцом и концентрированной серной кислотой). Можно наблюдать желтоватое с бурым окрашивание, что свидетельствует о присутствии гликозидов (рис. 1).



Рис. 1. Реакция Келлер-Килиани

В результате исследования состава экстрактов соцветий бархатцев отклоненных, собранных в Астраханской области, были обнаружены соединения терпеноидной и флавоноидной природы, ко-

торые можно отнести к группам флавононов, флавоноолов, флавонов и халконов, что делает объект данного исследования отличной базой как для изучения химии этих веществ, так и возможности создания фармакологических препаратов на основе экстрактов бархатцев отклоненных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Reena Jain, Nadhi Katare, Vijay Kumara, Amit Kumar Samanta, Swati Goswami, C.K. Shrotri *In vitro* antibacterial potential of different extracts of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula* // Journal of Natural Sciences Research. 2012. Vol.2, №5. P. 84-91.

2. Войткевич С.А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии. Москва: Издательство «Пищевая промышленность», 1999. 284 с.

3. Гринкевич Н.И., Сафронович Л.Н. Химический анализ лекарственных растений. Москва: Издательство «Высшая школа», 1983. 175 с.

4. Краткая химическая энциклопедия / Главный редактор Кнунянц И.Л. Москва: Издательство «Советская энциклопедия», 1967. том 5. 590 с.

5. Папаяни О.И., Духанина И.В., Сергеева Е.О. Изучение химического состава и антимикробной активности сухого экстракта из цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т.14, №5(3). С. 742-744.

УДК 581.143.6; 582.475.2; 630*23

ОСОБЕННОСТИ ПРЕПОДАВАНИЯ BIOTEХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ В ВУЗЕ

А.В. Третьякова^{1,2}

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033 Россия, Иркутск, ул. Лермонтова, 132. (3952) 42–46–59, факс (3952) 51–07–54, Anastasiya_chepi@mail.ru

²Иркутский государственный университет,

664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1. Тел.: (3952) 24–18–55

В статье рассматриваются основные задачи учебной дисциплины «Биотехнология растений», включающей теоретическую и практическую части и пути их решения.

Ключевые слова: биотехнология растений, клеточная инженерия, культура тканей in vitro, генетическая инженерия.

Биотехнология растений объединяет два основных направления – клеточную и генетическую инженерию, является новой стадией в развитии селекции растений. С помощью этих технологий улучшение признаков может происходить на уровне отдельных генов или их комплексов [1].

Учебная дисциплина «Биотехнология растений», читаемая в Иркутском государственном университете, относится к обязательным дисциплинам вариативной части профессионального цикла учебного плана подготовки бакалавров по направлению «Биология» очной формы обучения. Курс предназначен для студентов 3 курса, специализирующихся по профилю «Биохимия». Дисциплина включает 18 часов лекционных и 36 часов практических занятий.

В ходе учебного процесса необходимым является изложение основных теоретических принципов и методов генетической и клеточной инженерии, конструирования новых форм растений. Теоретическая часть курса включает в себя ряд разделов. Важнейшим основным из них является изучение культуры клеток высших растений. В этом разделе должное внимание необходимо уделять процессам дедифференцировки клеток, каллусогенеза, вторичной дифференциации, морфогенеза, поскольку происходящие изменения в генетическом аппарате клеток являются основами соматической изменчивости клеточных культур.

Вторым важным разделом биотехнологии растений является изучение подходов для селекционного процесса. Здесь необходимо рассмотреть пути получения гаплоидных растений и их использование для селекции, методы получения мутантных растений in vitro и их изучение, а также соматическую гибридизацию растений и примеры ее использования.

Раздел, касающийся микрклонального размножения растений, имеет высокую практическую значимость. Теоретические вопросы, требующие рассмотрения, включают обзор факторов, влияющих на морфогенез *in vitro*, и процесс соматического эмбриогенеза. В условиях лаборатории биотехнологии растений есть возможность получения студентами практических навыков работы в этом направлении. На практических занятиях студенты приобретают навыки приготовления питательных сред, учатся подбирать их состав, выполнять расчеты, готовить сток-растворы витаминов, регуляторов роста, рабочие среды, а также посуду для автоклавирования. Во время выполнения практической работы рабочим местом студента является лабораторный ламинарный шкаф, что дает возможность научиться аккуратно работать в стерильных условиях, изолируя корешки проростков фасоли и помещая их на питательную среду для получения каллусов, или черенкуя растения томатов для микрклонального размножения. Обычно студенты работают с удовольствием и затем с интересом наблюдают за изменениями, происходящими с растительными эксплантами.

Раздел биотехнологии, связанный с созданием трансгенных растений, является в основном теоретическим и включает рассмотрение основных методов трансформации растений, изучения экспрессии и генетической стабильности чужеродных генов, рассмотрение рисков, связанных с использованием генетически модифицированных растений.

Лутова Л.А. Биотехнология высших растений: Учебник. – Изд. 2-е. СПб.:Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2010. 240 с.

Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2004. 496 с.

Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. В.И. Негрука, с предисл. Р.Г Бутенко. М.: Агропромиздат, 1987. 301 с.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Перспективы микрклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез / И. Н. Третьякова [и др.] // Хвойные бореал. зоны. – 2012. – Т. 30, № 1–2. – С. 180–186.

2. Саляев Р. К. Получение каллусной культуры клеток кедра сибирского / Р. К. Саляев, Н. И. Рекославская // Лесоведение. – 2009. – №5. – С. 57–62.

3. Lelu-Walter M-A. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis / M-A. Lelu-Walter, M. Bernier-Cardou, K. Klimaszewska // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2008. – V. 92. – P.31–45.

4. Malabadi R. B. Genetic transformation of Conifers: Applications in and Impacts on commercial Forestry / R. B. Malabadi, K. Nataraja // Transgenic plant Journal. – 2007. Т. 1 (2). – P. 289–313.

УДК 577

**СОСТАВ ВЫСШИХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ МАКРОФИТОВ
РЕКИ АНГАРА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ
СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ**

К.А. Кириченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, kuzma@sifibr.irk.ru

*Изучен жирнокислотный состав двух видов высших водных растений *Myriophyllum spicatum*, *Elodea canadensis* из реки Ангара в нормальных условиях, а также под воздействием гипертермии 30° С и хлорида кадмия 100 мг/л. Были выявлены изменения в составе жирных кислот через 24 и 48 часов в ответ на воздействие исследованных факторов. Обнаружены различия в изменении состава жирных кислот в ответ на воздействие токсиканта и гипертермии у исследованных видов.*

*Ключевые слова: *Myriophyllum spicatum*, *Elodea canadensis*, высшие водные растения, байкальский регион, гипертермия, хлорид кадмия, жирные кислоты.*

**HIGH CARBONIC ACID COMPOSITION OF MACROPHYTES
FROM THE ANGARA RIVER AS AN INDICATOR OF
STRESS FACTORS**

K.A. Kirichenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, 664033, Lermontova st., 132, Russia, kuzma@sifibr.irk.ru

*The fatty acid composition of the two aquatic plant species *Myriophyllum spicatum* and *Elodea canadensis* from the Angara River have been studied both at normal conditions and under the influence of hyperthermia at 30 ° C as well as cadmium chloride 100 mg /l. Changes in fatty acid composition were found after 24 and 48 hours of induced factors. In response to toxicant and hyperthermia influence, differences in fatty acid compositions were detected in studied species.*

*Keywords: *Myriophyllum spicatum*, *Elodea canadensis*, high aquatic plants, the Baikal region, hyperthermia, cadmium chloride, fatty acids.*

Вода является важнейшим составным элементом всех живых организмов и биосферы в целом. Биологически полноценная вода образуется в экосистемах континентальных водоёмов. Базовым компонентом водных экосистем являются водные растения. Они являются первопродуцентами, поставляя вещество и энергию в экосистему водоёма, принимают участие в процессах обмена биогенных элементов, в самоочищении воды, способны накапливать и трансформировать органические и неорганические поллютанты. Водные растения используются при биомониторинге состояния водоёмов и в процессе фиторемедиации загрязнённых вод [3, 4, 7, 10].

Выраженное воздействие факторов окружающей среды приводит к изменениям в липидном и жирнокислотном составе мембран растений. Большинство физиологических процессов прямо или опосредованно связаны с клеточными мембранами и их функциональным состоянием, соответственно функционирование многих процессов жизнедеятельности напрямую зависит от состава и химического строения липидов как основного структурного компонента мембран. Сравнительное изучение липидного и жирнокислотного состава организмов позволяет выявить нарушения ещё до проявления морфологических и популяционных изменений [10, 13, 15]. Исследования водных растений, особенностей их физиологических и биохимиче-

ских процессов позволят разработать методы оценки качества и очистки воды.

Целью исследования было изучить и сравнить относительный состав жирных кислот тканей наиболее массовых видов высших водных растений реки Ангара при воздействии повышенной температуры и хлорида кадмия.

Макрофиты: *Elodea canadensis* Michx. и *Myriophyllum spicatum* L. собирались в верхнем течении реки Ангара на левом берегу стандартными методами гидробиологии. После культивирования в лабораторных условиях растения экспериментальной группы помещали в раствор хлорида кадмия (100 мг/л) на 24 и 48 ч. В другом случае растения помещали в дистиллированную воду, нагретую до 30°C, и инкубировали 24 и 48 ч. Для анализа отбиралась усреднённая проба биомассы весом 1 г. Липиды экстрагировали смесью хлороформ:метанол (2:1). Анализ состава жирных кислот проводили в виде метиловых эфиров жирных кислот методом газожидкостной хроматографии с использованием хромато-масс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS Agilent Technologies (США). Относительное содержание жирных кислот определяли в весовых процентах от общего их содержания в исследуемом образце. Для оценки степени ненасыщенности жирных кислот рассчитывали индекс двойной связи (ИДС), как сумму произведений весовых процентов каждой ненасыщенной кислоты на число двойных связей в её молекуле, делённую на 100, согласно методу, предложенному Lyons с соавт. [19]. Статистическую значимость различий в контрольной и экспериментальной выборках оценивали с помощью *T*-критерия Манна-Уитни [8].

Жирнокислотный состав исследованных видов носит видоспецифичный характер. Анализируя состав жирных кислот исследованных видов, можно констатировать, что большинство из них содержит чётное число атомов углерода. Только среди насыщенных жирных кислот были отмечены молекулы с нечётным числом атомов – пентадекановая (C15:0), гептадекановая (C17:0), гениекозановая (C21:0). Суммарное содержание этих кислот составляло 0,35% у *M. spicatum*, 0,83% - у *E. canadensis*. Гениекозановая кислота была обнаружена только у *E. canadensis* (Таб. 1, 2).

В условиях гипертермии (30 °С) состав жирных кислот у исследованных видов менялся незначительно (Таб. 1, 2). У *E. canadensis* статистически значимо снизилось содержание только пальмитиновой (С16:0) и пальмитолеиновой (С16:1) кислот через 48 ч гипертермии. У *M. spicatum* уменьшилось содержание только пальмитолеиновой кислоты (С16:1). Содержание генайкозановой кислоты у *E. canadensis* (С21:0) уменьшается до следовых количеств. В течение 24 ч воздействия гипертермии количество насыщенных жирных кислот оставалось близким к контрольному, а через 48 ч наблюдалась тенденция к снижению их уровня у *M. spicatum* с 19,68 до 16,92% и у *E. canadensis* с 24,17 до 23,21%. Однако это не привело к статистически значимым изменениям индекса двойной связи. Содержание

Таблица 1. Состав жирных кислот (в весовых %) высших водных растений после экспозиции в условиях гипертермии (30 °С)

	<i>M. spicatum</i>			<i>E. canadensis</i>		
	контроль	30гр 24ч	30гр 48ч	контроль	30гр 24ч	30гр 48ч
С14:0	0,35±0,10	0,30±0,04	0,33±0,05	0,48±0,21	0,64±0,46	0,29±0,03
С15:0	0,10±0,03	0,12±0,05	0,10±0,02	0,16±0,04	0,16±0,07	0,12±0,03
С16:0	17,49±2,56	18,47±0,95	15,01±0,90 *	19,69±1,73	20,34±4,72	17,52±1,11
С17:0	0,24±0,10	0,33±0,08	0,23±0,02	0,57±0,08	0,52±0,10	0,63±0,12
С18:0	1,24±0,64	1,11±0,14	1,00±0,17	2,56±0,74	2,78±0,69	3,77±1,04 *
С20:0	0,17±0,05	0,17±0,05	0,13±0,03	0,35±0,09	0,20±0,09 *	0,38±0,08
С21:0	-	-	-	0,13±0,01	-	-
С22:0	0,23±0,07	0,24±0,05	0,22±0,03	0,35±0,16	0,18±0,14	0,48±0,20
∑ С16:1**	0,67±0,13	0,43±0,07 *	0,33±0,12 *	1,37±0,73	0,73±0,25	0,34±0,06 *
∑ С18:1***	2,26±0,96	3,50±0,87 *	2,60±0,80	1,66±0,67	1,17±0,39	1,07±0,09
С18:2(н-6)	26,71±5,01	31,78±3,18	28,60±3,15	18,62±2,57	19,90±1,53	19,12±2,06
С18:3(н-3)	50,52±6,92	43,27±4,80	51,27±4,76	54,18±3,95	53,42±5,22	56,26±1,18
С20:1(н-11)	0,27±0,09	0,31±0,26	0,17±0,06	-	-	-
ИДС	2,08±0,12	1,98±0,08	2,14±0,08	2,03±0,10	2,02±0,17	2,08±0,06
∑ нечёт	0,35±0,11	0,45±0,12	0,33±0,03	0,83±0,16	0,71±0,15	0,77±0,15
∑ НЖК	19,68±3,16	20,70±1,18	16,92±1,07	24,17±2,78	24,78±5,81	23,21±2,39
∑ С16	18,16±2,50	18,90±0,97	15,34±0,82 *	21,06±2,10	21,07±4,95	17,86±1,12 *

Приведена средняя арифметическая ± стандартное отклонение, n = 8 для контрольной и n = 6 для экспериментальной выборки; «-» кислота не обнаружена или присутствует в следовых количествах; * – статистически значимые отличия от контроля; ** – сумма изомеров пальмитолеиновой кислоты; *** – суммы цис-вакценовой и олеиновой кислоты; ИДС – индекс двойной связи; ∑ нечёт – сумма кислот с нечётным числом атомов; ∑ НЖК – сумма насыщенных жирных кислот; ∑ С16 – сумма кислот с 16-ю атомами углерода.

жирных кислот с нечётным числом атомов углерода практически не менялось. Значение индекса двойной связи оставалось на уровне близком к контрольному.

Экспозиция исследованных видов в растворе хлорида кадмия (100 мг/л) в течение 24 и 48 ч приводила к изменению в составе жирных кислот в тканях водных растений. При действии хлорида кадмия содержание жирных кислот у *M. spicatum* оставалось близким к контрольному, статистически значимое увеличение содержания выявлено только для миристиновой (C14:0) и пентадекановой (C15:0) кислот через 24 ч воздействия токсиканта. Перераспределение относительного содержания насыщенных, моно- и полиненасыщенных жирных кислот у *M. spicatum* не сказывалось на значении индекса двойной связи.

Экспозиция *E. canadensis* в течение 48 часов в растворе хлорида кадмия приводила к статистически значимому увеличению содержания суммы изомеров пальмитоолеиновой (C16:1) и суммы *цис*-вакценовой (C18:1n-7) и олеиновой (C18:1n-9) кислот. Статистически значимо уменьшалось содержание α -линоленовой кислоты (C18:3n-3) через 48 ч эксперимента. Изменения массовых долей жирных кислот *E. canadensis* приводило к снижению индекса двойной связи, однако данное изменение приобретало статистически значимый характер только после 48 ч воздействия хлорида кадмия.

Значительная часть физиологически важных процессов (дыхание, фотосинтез, активный транспорт и др.) ассоциирована с клеточными мембранами и зависит от их функционального состояния. Для выполнения своих функций клеточные мембраны должны иметь жидко-кристаллическую структуру и обладать определённой степенью текучести и вязкости. Текучесть и вязкость мембран, прежде всего, зависит от соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, а также от степени ненасыщенности последних. Флуктуации условий окружающей среды вызывают изменения в структуре компонентов, а также функциональной активности мембран, что отражается на протекании всех физиологических процессов в клетке [13, 15, 17, 23]. У исследованных видов выявлены различия в составе жирных кислот в условиях воздействия гипертермии и хлорида кадмия. Характер произошедших изменений зависел от типа воздействия и вида водных растений.

Таблица 2. Состав жирных кислот (в весовых %) высших водных растений после экспозиции в растворе хлорида кадмия (100 мг/л)

	<i>M. spicatum</i>			<i>E. canadensis</i>		
	контроль	CdCl ₂ 24 ч	CdCl ₂ 48 ч	контроль	CdCl ₂ 24 ч	CdCl ₂ 48 ч
C14:0	0,35±0,10	0,50±0,10 *	0,41±0,09	0,48±0,21	0,63±0,11	0,77±0,07
C15:0	0,10±0,03	0,18±0,04 *	0,19±0,10 *	0,16±0,04	0,34±0,08 *	0,56±0,06 *
C16:0	17,49±2,56	18,81±2,34	17,50±1,96	19,69±1,73	22,35±2,49 *	25,16±0,71 *
C17:0	0,24±0,10	0,18±0,04	0,26±0,10	0,57±0,08	0,83±0,18 *	0,98±0,11 *
C18:0	1,24±0,64	1,52±0,42	1,41±0,32	2,56±0,74	3,98±0,63 *	5,25±0,34 *
C20:0	0,17±0,05	0,16±0,07	0,21±0,10	0,35±0,09	0,49±0,10 *	0,78±0,06 *
C21:0	-	-	-	0,13±0,01	0,17±0,05	-
C22:0	0,23±0,07	0,24±0,06	0,31±0,06	0,35±0,16	0,48±0,16	0,95±0,15 *
∑ C16:1**	0,67±0,13	0,83±0,19	0,56±0,21	1,37±0,73	1,83±0,51	2,59±0,29 *
∑ C18:1***	2,26±0,96	2,95±1,10	2,14±0,53	1,66±0,67	2,68±0,85 *	3,21±0,53 *
C18:2 (n-6)	26,71±5,01	23,75±1,29	25,06±2,41	18,62±2,56	19,03±0,72 *	16,84±0,51 *
C18:3 (n-3)	50,52±6,92	50,61±4,72	51,63±4,26	54,18±3,95	47,17±4,02 *	42,78±1,15 *
C20:1 (n-11)	0,25±0,09	0,14±0,06	0,15±0,07	-	-	-
ИДС	2,08±0,12	2,03±0,12	2,08±0,09	2,03±0,10	1,84±0,12 *	1,68±0,02 *
∑ нечёт	0,33±0,11	0,36±0,07	0,45±0,19	0,83±0,16	1,34±0,27 *	1,55±0,14
∑ НЖК	19,68±3,16	21,56±2,97	20,24±2,67	24,17±2,78	29,28±3,19 *	34,45±0,81 *
∑ C16	18,16±2,50	19,64±2,43	18,06±2,00	21,06±2,10	24,67±3,03 *	28,70±0,77 *

Приведена средняя арифметическая ± стандартное отклонение, n = 8 для контрольной и n = 6 для экспериментальной выборки; «-» кислота не обнаружена или присутствует в следовых количествах; * – статистически значимые отличия от контроля; ** – сумма изомеров пальмитолеиновой кислоты; *** – суммы цис-вакценовой и олеиновой кислоты; ИДС – индекс двойной связи; ∑ нечёт – сумма кислот с нечётным числом атомов; ∑ НЖК – сумма насыщенных жирных кислот; ∑ C16 – сумма кислот с 16-ю атомами углерода.

Температура является одним из самых важных абиотических факторов. Растения как пойкилотермные организмы в процессе эволюции выработали различные механизмы адаптации к изменениям температурных условий окружающей среды [2, 10, 11, 22]. Выявлено, что температура 30 °С не приводила к значительным изменениям в составе жирных кислот у исследованных видов. Вероятно, воздействия температуры данной интенсивности недостаточно, чтобы значительно повлиять на активность десатураз. Возможно, это связано с тем, что в пределах температур 20 – 35 °С не происходит существенного фазового перехода и изменения молекулярной подвижности мембранных липидов [13].

Кадмий относится к группе тяжёлых металлов, обладает значительной токсичностью, подвижностью, проницаемостью и кумулятивностью [12, 14]. Значительное влияние кадмий оказывает на организмы, обитающие в водоёмах с низкой минерализацией или пониженными значениями pH. Показано, что тяжёлые металлы, в том числе кадмий, снижают рост растений, негативно сказываются на их развитии, нарушают процессы транспорта ассимилятов и минерального питания, влияют на водный и гормональный обмен, снижают активность фотосинтеза и дыхания [5, 6, 12]. Вероятно, выявленные изменения состава жирных кислот у исследованных видов связаны с воздействием кадмия на процессы жизнедеятельности и метаболизм липидов, в частности.

Одним из механизмов токсического действия тяжелых металлов и, в частности кадмия, является их соединение с SH-группами белков и инициация перекисного и свободнорадикального окисления. Под воздействием тяжёлых металлов нарушаются функции мембран, показателем их трансформации служат изменения в составе жирных кислот [1, 5, 6, 9, 15]. Можно предположить, что действие токсиканта на метаболизм липидов каждого вида имеет свои особенности. Мембраны *E. canadensis*, вероятно, подвергаются более глубоким модификациям по сравнению с *M. spicatum*, т.к. у данного вида происходит достоверное снижение содержания линоленовой кислоты (C18:3 ω 3). Снижение доли этой кислоты может быть обусловлено активацией перекисного окисления липидов, снижением активности дыхания или совместным влиянием обоих факторов. У данного вида также достоверно увеличивается содержание пентадекановой (C15:0), стеариновой (C18:0) и арахиновой (C20:0) кислот, уменьшается показатель индекса двойной связи. Стоит также отметить, что у данного вида значимо увеличивается содержание жирных кислот с нечётным числом углеродных атомов. Синтез этих кислот идёт через пропионил-кофермент А. Вероятно, метаболизм жирных кислот у *E. canadensis* претерпевает значительные изменения, которые сказываются даже на синтезе жирных кислот через пропионил-КоА [18]. В то же время жирнокислотный состав *M. spicatum* остаётся более стабильным, и, вероятно, метаболизм липидов в меньшей степени подвержен влиянию хлорида кадмия. Из-

вестно, что данный вид рекомендован для фиторемедиации от загрязнения тяжёлыми металлами, в том числе кадмием [12].

Таким образом, можно констатировать, что под воздействием раствора хлорида кадмия в течение 24 и 48 часов состав жирных кислот у исследованных видов растений меняется по-разному. Менее выражены эти изменения у *M. spicatum*. В целом, состав жирных кислот *M. spicatum* оказался более стабильным к воздействию токсиканта. Выявленные особенности свидетельствуют в пользу существования отличий в метаболизме жирных кислот у *E. canadensis* от *M. spicatum*. *E. canadensis* эволюционировала в Северной Америке, является заносным для Евразии видом и обладает ярко выраженной инвазионностью. За короткий исторический период широко распространилась, вытеснив во многих водоёмах местную растительность [16]. Возможно, что этот вид так успешно расселился за счёт специфических особенностей обмена веществ.

Характерный профиль жирных кислот суммарных липидов и различия в показателе индекса двойной связи можно, вероятно, объяснить особенностями метаболизма данных кислот у каждого из исследованных видов. Межвидовые различия в данном случае проявлялись не только на морфологическом уровне, но и в специфике обмена жирных кислот. Знания специфики метаболизма водных растений позволят более широко использовать их для эколого-биохимического мониторинга состояния водоёмов. В связи с этим выявленные биохимические отличия стоит учитывать при разработке методов оценки качества и очистки загрязнённой воды.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации / В.П. Холодова, К.С. Волков, Вл.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 6. – С. 848-858.

2. Афанасьева Н.Б. Введение в экологию растений: учебное пособие / Н.Б. Афанасьева, Н.А. Березина. – М.: Издательство Московского университета, 2011. – 800 с.

3. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студентов высших учеб-

ных заведений / под ред. О.П. Мелиховой. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 288 с.

4. Бреховских В.Ф. Биота в процессах массопереноса в водных объектах / В.Ф. Бреховских, В.Д. Казьмирук, Г.Н. Вишневская. – М.: Наука, 2008. – 315 с.

5. Влияние кадмия на состав жирных кислот липидов в побегах карельской берёзы *in vitro* / Т.Ю. Кузнецова [и др.] // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 731-737.

6. Гармаш Е.В. Влияние кадмия на рост и дыхание ячменя при двух температурных режимах выращивания / Е.В. Гармаш, Т.К. Головки // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 3. – С. 382-387.

7. Бакаева Е.Н. Гидробионты в оценке качества вод суши / Е.Н. Бакаева, А.Н. Никаноров. – М.: Наука, 2006. – 239 с.

8. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

9. Изменение состава липидов у пресноводного растения *Hydrilla verticillata* при накоплении и удалении из тканей ионов тяжелых металлов / В.Н. Нестеров, О.А. Розенцвет, С.В. Мурзаева // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 5. – С. 97-106.

10. Ипатова В.И. Адаптация водных растений к стрессовым абиотическим факторам среды / В.И. Ипатова – М.: «Графикон-принт», 2005. – с. 224.

11. Карпец Ю.В. Ответ растений на гипертермию: молекулярно-клеточные аспекты / Ю.В. Карпец, Ю.Е. Колупаев // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия биология. – 2009. – Вып. 1, – № 16. – С. 19-38.

12. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях / Г.И. Квеситадзе [и др.]. – М.: Наука, 2005. – 199 с.

13. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 163–198.

14. Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология: теоретические и прикладные аспекты / Т.И. Моисеенко. – М.: Наука, 2009. – 400 с.

15. Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям / Т.В. Чиркова // Соросовский Образовательный Журнал. – 1997. – № 9. – С. 12-17.

16. Barrat-Segretain M-H. Experiments on growth interactions between two invasive macrophyte species / M-H. Barrat-Segretain, A. Elger // *Journal of Vegetation Science*. – 2004. – V. 15, I. 1. – P. 109–14.
17. Eeman M., Deleu M. From biological membranes to biomimetic model membranes / M. Eeman, M. Deleu // *Biotechnol Agron Soc Environ*. – 2010. – V. 14, I. 4. – P. 719-736.
18. Gunstone F.D. Fatty acid and lipid chemistry / F.D. Gunstone. – London: Blackie Academic and Professional; – 1996. – 252 p.
19. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plant / J.M. Lyons, T.A. Wheaton, H.K. Pratt // *Plant Physiology*. – 1964. – V. 39. – P. 262–268.
22. Sham A. Bioinformatics based comparative analysis of omega-3 fatty acids in desert plants and their role in stress resistance and tolerance / A. Sham, M.A.M. Aly // *International Journal of Plant Research*. – 2012. – V. 2, I. 3. – P. 80-89.
23. Singh S.C. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria / S.C. Singh, R.P. Sinha, D.-P. Häder // *Acta Protozool*. – 2002. – V. 41. – P. 297-308.

Научное издание

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Материалы
Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием

(Иркутск, 25–27 июня 2015 г.)

Тезисы докладов печатаются в авторской редакции
Оформление обложки Вершинина Светлана Эдуардовна