

ISSN 2304-4691

Актуальная биотехнология

№ 3(14)

2015

ISSN 2304-4691

**Основан в 2012г.
г. Воронеж**

Актуальная биотехнология

№ 3 (14)

2015

Учредитель ООО «Биоактуаль»

Главный редактор

Д.б.н., профессор О.С. Корнеева

Редакционный совет

Д.б.н., профессор Ф.К. Алимова

Д.т.н., профессор В.В. Бирюков

Д.т.н., профессор Л.А. Иванова

Д.б.н., профессор Л.П. Лазурина

Д.б.н., профессор Е.Г. Новосёлова

Д.х.н., профессор Т.В. Овчинникова

Д.т.н., профессор А.Н. Остриков

Д.б.н., профессор В.Н. Попов

Д.т.н., Член-Корр. РАСХН Л.В. Римарева

Ответственный редактор

К.т.н. А.А. Дерканосова

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций:

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-62393 от 14 июля 2015 г.

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год: №1 – март, №2 – июнь, №3 – сентябрь, №4 – декабрь

Подписной индекс издания в агентстве "Роспечать" 58012

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

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

394036, Воронеж, пр. Революции, 19

тел./факс: (473) 255-37-16

E-mail: actbio@mail.ru

Сдано в набор 23.09.2015. Подписано в печать 30.09.2015.

Формат 60×84 1/8

Усл. печ. л. 5,4. Тираж 1500 экз. Заказ ____.-114с.

Цена - свободная.

Бланк подписки
Журнал «Актуальная биотехнология»

**Каталог «Издания органов научно-технической информации»
(Агентство «Роспечать»)**

Подписной индекс 58012 (полугодовой)

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год: №1 – март, №2 – июнь, №3 – сентябрь, №4 – декабрь

Ф. СП-1	АБОНЕМЕНТ на журнал		58012 (индекс издания)										
	Актуальная биотехнология (наименование издания)		Количество комплектов	1									
	На 2016 год по месяцам												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
			X			X							
Куда		(почтовый индекс) (адрес)											
Кому		(фамилия, инициалы)											
							ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА						
	ПВ		место		ли-тер		на журнал		58012 (индекс издания)				
	Актуальная биотехнология (наименование издания)												
	Стои-мость	подписки пере-адресовки						Количество комплектов		1			
	На 2016 год по месяцам												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
			X			X							
	Куда	(почтовый индекс) (адрес)											
	Кому		(фамилия, инициалы)										



Уважаемые коллеги!

Дорогие друзья!

Мы выражаем большую и искреннюю благодарность всем участникам ежегодной Всероссийской научно-практической конференции "Биотехнология: наука и практика" 2015 за совместный труд в организации и проведении этого мероприятия!

Желаем вам творческих успехов, больших научных достижений и побед!

До новых встреч!

С уважением, оргкомитет.

CONTENTS

ENVIRONMENT & RESOURCE SAVING

Beilina N.E., Lir L.V., Makarychev A.V., Sklonchak E.A. Methods of calculating the thickness of the bottoms of vertical vessels installed on the foundation

Beilina N.E., Lir L.V., Makarychev A.V., Sklonchak E.A. Examination of industrial safety of project documentation on modernization of the hazardous production facility - innovations in the regulatory framework

Beilina N.E., Lir L.V., Makarychev A.V., Sklonchak E.A. Optimization of work during the examination of industrial safety of technical devices and equipment repairs planned

Beilina N.E., Lir L.V., Makarychev A.V., Sklonchak E.A. Some features of the definition of the safe operation of cryogenic tanks

Beilina N.E., Lir L.V., Makarychev A.V., Sklonchak E.A. Assessment of expediency of the calculations of strength for the conditions of hydraulic test of vessels and equipment intended for operation at a pressure of 0.07 MPa (0.7 kgf/sq.cm) and below

PROCEEDINGS OF 3d ANNUAL INTERNATIONAL SCIENCE AND PRACTICE CONFERENCE «BIOTECHNOLOGY: SCIENCE & PRACTICE»

SECTION 1. BIOTECHNOLOGY & EDUCATION: MEETING OF EDUCATIONAL AND METHODOLOGICAL ASSOCIATION (BIOTECHNOLOGY SECTION)

Solomonov V.A., Bragina N.A., Biglov R.R. Designing teaching module for post-graduate educational programs

Sul'man M.G., Sul'man E.M., Demidenko G.N. Training of masters biotechnologists for industry and research organizations on the example of cooperation between Russian and European universities

Bragina N.A., Pshenichnikova A.B., Solomonov V.A., Shvets V.I. Design professional educational modules of master's and postgraduate's programs

Lazurina L.P., Lazarenko V.A., Kalytsii P.V. Innovative technologies in educational process

Zinina O.V., Rebezov M.B., Asenova B.K. Innovative technology for the processing of raw materials of animal origin (tutorial)

SECTION 2. BASIC ASPECTS OF MODERN OF BIOTECHNOLOGY

Ovchinnikova T.V. Peptide factors innate immune system

Antonova S.V., Voeikova T.A., Tyaglov B.V., Pushkov A.A., Lobanov K.V., Malakhova I.I., Krasikov V.D. Studying the distribution of the antibiotic tylosin between native culture liquid and butyl acetate in the presence of inorganic salts

Dolmashkina A.S., Balashova O.O., Goral'nikova E.A., Karpunina L.V. Isolation of agglutination proteins from the surface of lactic acid bacteria

СОДЕРЖАНИЕ

ЭКОЛОГИЯ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

8 Бейлина Н.Е., Лир Л.В., Макарычев А.В., Склончак Е.А. Методика расчета толщины днищ вертикальных сосудов, установленных на фундаменте

12 Бейлина Н.Е., Лир Л.В., Макарычев А.В., Склончак Е.А. Экспертиза промышленной безопасности проектной документации по техническому перевооружению опасного производственного объекта – нововведения в нормативную базу

15 Бейлина Н.Е., Лир Л.В., Макарычев А.В., Склончак Е.А. Оптимизация работ при проведении экспертизы промышленной безопасности технических устройств и плановых ремонтов оборудования

17 Бейлина Н.Е., Лир Л.В., Макарычев А.В., Склончак Е.А. Некоторые особенности определения срока безопасной эксплуатации криогенных резервуаров

20 Бейлина Н.Е., Лир Л.В., Макарычев А.В., Склончак Е.А. Обоснование целесообразности проведения расчетов на прочность для условий гидротестирования сосудов и аппаратов, предназначенных для работы под давлением 0,07 МПа (0,7 кгс/кв. см) и ниже

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

СЕКЦИЯ 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ И ОБРАЗОВАНИЕ: ЗАСЕДАНИЕ УМО (СЕКЦИИ БИОТЕХНОЛОГИИ)

22 Соломонов В.А., Брагина Н.А., Биглов Р.Р. Проектирование педагогического модуля для образовательных программ аспирантуры

23 Сульман М.Г., Сульман Э.М., Демиденко Г.Н. Подготовка магистров-биотехнологов для промышленности и научно-исследовательских организаций на примере сотрудничества российского и европейского университетов

24 Брагина Н.А., Пшеничникова А.Б., Соломонов В.А., Швеи В.И. Проектирование профессиональных образовательных модулей программ магистратуры и аспирантуры

25 Лазурин Л.П., Лазаренко В.А., Калущий П.В. Инновационные технологии в учебном процессе

27 Зинина О.В., Ребезов М.Б., Асенова Б.К. Инновационные технологии переработки сырья животного происхождения (учебное пособие)

СЕКЦИЯ 2. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

29 Овчинникова Т.В. Пептидные факторы системы врожденного иммунитета

30 Антонова С.В., Воейкова Т.А., Тяглов Б.В., Пушков А.А., Лобанов К.В., Малахова И.И., Красиков В.Д. Изучение распределения антибиотика тилозина между нативной культуральной жидкостью и бутилацетатом в присутствии неорганических солей

31 Долмашкина А.С., Балашова О.О., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В. Выделение агглютинирующих белков с поверхности молочнокислых бактерий

Liya's'kina E.V., Revin V.V., Nazarkina M.I., Bogatyreva A.O., Shchankin M.V. Biotechnology of bacterial exopolysaccharides

Stepanov A.V., Mayorov N.V., Nikiforov A.K. Improving the biotechnology scheme of oligonucleotide synthesis in the production of drugs for gene diagnosis of particularly dangerous infectious diseases

Kletsko L.I. The genetic stability of the *Aureobasidium pullulans* (D BY.) Arnaud and application producer strains in production

Meshcheryakova O.L., Goikalova O.Yu., Korneeva O.S. Selection of the optimal parameters of the immobilization of β -fructofuranosidase

Vozchikova S.V., Alferov S.V., Gerasimova O.A. Evaluation of the competition of oxygen and electron transport mediators as an electron acceptor in a biofuel cell functioning on the basis of the membrane fraction of bacteria *Gluconobacter oxydans*

Vinogradova O.N. Microbiological synthesis and properties of P(3HB/4HB) with high switching fraction 4HB

Novikova Yu.S., Anokhina E.P., Korneeva O.S. Optimization of enzymatic hydrolysis of fucoidan from brown algae

Kholyavka M.G., Koroleva V.A., Ol'shannikova S.S., Kayumov A.R., Sharafutdinov I.S., Baidamshina D.R., Artyukhov V.G. Development of the method of immobilization ficin on the matrix of chitosan to create innovative medicines

Shuvaeva G.P., Nebol'sin V.A., Sanin V.N., Golev I.M., Tsubenko A.V., Tokareva Ya.V. The bactericidal properties of carbon nanotubes

Fokina N.A., Uryadova G.T., Tyapkin A.Yu., Nurmametova S.Sh., Karpunina L.V. Exopolysaccharides *Streptococcus thermophilus*: the conditions of the isolation and properties

Nosova N.M., Alferov V.A., Asulyan L.D. Bioelectrocatalytic oxidation of glucose by cells *Gluconobacter oxydans* on glassy carbon electrode in the presence of electron transport mediators

Korneva O.S., Sviridova T.V., Shuvaeva G.P. Characteristics of the hydrolytic activity of the yeast *Kluyveromyces marxianus* Y-303

Zhelezнова S.N., Gevorgiz R.G., Bobko N.I., Lelekov A.S. The culture medium for the intensive culture of diatomic alga *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin - promising biotech facility

SECTION 3. BIOENGINEERING & BIOINFORMATICS. BIONANOTECHNOLOGIES

Bui Xuan Dong, Cao Xuan Huu, Nguyen Thi Hoang Yen Study of immobilization of lipase on magnetic nanoparticles Fe₃O₄ in the biodiesel production

Voeikova T.A., Krest'yanova I.N., Sakhibgaraeva L.F., Shebanova A.S., Ismagulova T.T., Yarotskii S.V. Biosynthesis of silver sulfide nanoparticles by microscopic fungi

Kondrat'ev M.S., Kabanov A.V. Supercomputer technologies in the development of thermostable mutant lipases

Nakvasina M.A., Artyukhov V.G. Nanotechnology: achievements, problems and prospects of development

Sizova I.A., Shalguev V.I., Grainer A., Khegemann P. Editing photoreceptor genes from microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* using zinc finger nucleases

31 Лияськина Е.В., Ревин В.В., Назаркина М.И., Богатырева А.О., Шчанкин М.В. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов

33 Степанов А.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К. Совершенствование биотехнологической схемы синтеза олигонуклеотидов при производстве препаратов для генной диагностики особо опасных инфекционных болезней

33 Клецко Л.И. Генетическая стабильность *Aureobasidium pullulans* (D BY.) Arnaud и применение штаммов-продуцентов в производстве

36 Мещерякова О.Л., Гойкалова О.Ю., Кorneeva О.С. Выбор оптимальных параметров иммобилизации β -фруктофуранозидазы

36 Возчикова С.В., Алферов С.В., Герасимова О.А. Оценка конкуренции кислорода и медиаторов электронного транспорта как акцепторов электронов в условиях функционирования биотопливного элемента на основе мембранной фракции бактерий *Gluconobacter oxydans*

38 Виноградова О.Н. Микробиологический синтез и свойства П(3ГБ/4ГБ) с высоким включением фракции 4ГБ

39 Новикова Ю.С., Анохина Е.П., Кorneeva О.С. Оптимизация ферментативного гидролиза фукоидана бурых водорослей

39 Холявка М.Г., Королева В.А., Ольшаникова С.С., Каюмов А.Р., Шарафутдинов И.С., Байдамшина Д.Р., Артюхов В.Г. Разработка методики иммобилизации фицина на матрице хитозана для создания инновационных лекарственных препаратов

41 Шuvaeva Г.П., Небольсин В.А., Санин В.Н., Голев И.М., Цубенко А.В., Токарева Я.В. Бактерицидные свойства углеродных нанотрубок

41 Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Тяпкин А.Ю., Нурмаметова С.Ш., Карпунина Л.В. Экзопполисахарид *Streptococcus thermophilus*: условия выделения и свойства

42 Носова Н.М., Алферов В.А., Асулян Л.Д. Биоэлектрокаталитическое окисления глюкозы клетками *Gluconobacter oxydans* на стеклоуглеродных электродах в присутствии медиаторов электронного транспорта

44 Кorneeva О.С., Свиридова Т.В., Шuvaeva Г.П. Характеристика гидролитической активности дрожжей *Kluyvermyces marxianus* Y-303

46 Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г., Бобко Н.И., Лелеков А.С. Питательная среда для интенсивной культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin – перспективного объекта биотехнологий

СЕКЦИЯ 3. БИОИНЖЕНЕРИЯ И БИОИНФОРМАТИКА. БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

48 Bui Xuan Dong, Cao Xuan Huu, Nguyen Thi Hoang Yen Study of immobilization of lipase on magnetic nanoparticles Fe₃O₄ in the biodiesel production

51 Воейкова Т.А., Крестьянова И.Н., Сахибгараева Л.Ф., Шебанова А.С., Исмагулова Т.Т., Яроцкий С.В. Биосинтез наночастиц сульфида серебра микроскопическими грибами

52 Кондратьев М.С., Кabanov A.B. Суперкомпьютерные технологии в разработке термостабильных мутантов липаз

53 Накvasina M.A., Артюхов В.Г. Бионанотехнологии: достижения, проблемы, перспективы развития

56 Сизова И.А., Шалгуев В.И., Грайнер А., Хегеманн П. Редактирование генов фоторецепторов у микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* с использованием цинк-пальцевых нуклеаз

Kondrat'ev M.S., Gritsenko A.S., Kabanov A.V., Khechinashvili N.N. Directed modification of enzymes destructors of oil: use of parallel computing

Rubakina V.A., Bogatyreva A.G., Petrova V.A., Lantushenko A.O. Investigation of the effects of the action of DNA-binding drugs on human buccal cells

Voeikova T.A., Shebanova A.S., Novikova L.M., Krest'yanova I.N., Emel'yanova L.K., Kaisheva A.V., Ivanov Yu.D., Zhuravleva O.A., Shaitan K.V., Debabov V.G. Bacterial synthesis of nanoparticles

Rogova O.V., Sidorova M.A. Analysis of the features of the secondary structure of short DNA fragments from the experimental values of proton chemical shifts

Tolkacheva A.A., Cherenkov D.A., Korneeva O.S. Screening hydrolase enzyme producers in the database of the National center for biotechnology information (NCBI)

SECTION 4. ENVIRONMENT & RESOURCE

Gredova N.B., Panfilov V.I. Biological technogenic factor of biotech industries

Alferov V.A., Arlyapov V.A., Asylyan L.D., Yudina N.Yu., Zaitsev N.K. Development and preparation of industrial production amperometric biosensor analyzer for rapid determination of biochemical oxygen demand

Afonina E.L., Ponamareva O.N., Kamanina O.A., Stroitelev V.V. BOD biosensor based on yeast *Debaryomyces hansenii* encapsulated in organosilicate matrix

Molchanov V.P., Sul'man M.G., Sul'man E.M. Resource-saving biocatalytic conversion of organic waste mixtures of animal and vegetable origin

Cherenkov D.A., Tolkacheva A.A., Korneeva O.S. The development of technological bases of bioremediation of soil and water contaminated with oil products

Kalyuzhin V.A., Kalyuzhina A.V., Zakirov R.N. Biodegradation and detoxification of polymer additives to drilling fluids

Gomboeva S.V., Prudova L.Yu., Falileeva O.Yu. Biotechnological methods of using the drug sperm DNA freshwater fish

Bezgachina T.V. Serological testing of vibriosis in the Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* on the coast of the North Caucasus

Lyong T.M., Nechaeva I.A., Ponamareva O.N., Petrikov K.V. Temperature effect on the ability of *Rhodococcus* included in the biological product "Microbac" to produce glycolipid biosurfactants

Mazhulina I.V., Shevtsov A.A., Tertychnaya T.N., Yakovleva S.F. Biotechnology of the inulinase preparation using energy savings

Shelepina N.V. Development of technologies for processing by-products of pea starch

Zaitseva A.S., Turovskaya A.D., Arlyapov V.A. Definition of analytical and metrological characteristics of mediator BOD biosensor based on activated sludge

Slaverosova E.V., Kulenko V.G., Shevchuk V.B., Fialkova E.A. Energy efficient method for producing low-lactose demineralized whey

Chechikova E.V., Evstafiev S.N. Products of converting carbohydrates of wheat straw

57 **Кондратьев М.С., Гриценко А.С., Кабанов А.В., Хечинашвили Н.Н.** Направленная модификация ферментов-деструкторов нефти: использование параллельных вычислений

58 **Рубакина В.А., Богатырева А.Г., Петрова В.А., Лантушенко А.О.** Исследование эффектов действия ДНК-связывающихся препаратов на клетки буккального эпителия человека

60 **Воейкова Т.А., Шебанова А.С., Новикова Л.М., Крестьянова И.Н., Емельянова Л.К., Кайшева А.В., Иванов Ю.Д., Журавлева О.А., Шайтан К.В., Дебабов В.Г.** Бактериальный синтез наночастиц

61 **Рогова О.В., Сидорова М.А.** Анализ особенностей вторичной структуры коротких фрагментов ДНК по экспериментальным значениям протонных химических сдвигов

63 **Толкачева А.А., Черенков Д.А., Корнеева О.С.** Скрининг продуцентов ферментов гидролаз в базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI)

СЕКЦИЯ 4. ЭКОЛОГИЯ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

64 **Градова Н.Б., Панфилов В.И.** Биологический техногенный фактор биотехнологических производств

65 **Алферов В.А., Арляпов В.А., Асулян Л.Д., Юдина Н.Ю., Зайцев Н.К.** Разработка и подготовка промышленного выпуска амперометрического биосенсорного анализатора для экспресс-определения биохимического потребления кислорода

66 **Афоница Е.Л., Понамарева О.Н., Каманина О.А., Строителив В.В.** БПК-биосенсор на основе инкапсулированных в органосиликатную матрицу дрожжей *Debaryomyces hansenii*

68 **Молчанов В.П., Сульман М.Г., Сульман Э.М.** Ресурсосберегающая биокаталитическая конверсия смесей органических отходов животного и растительного происхождения

69 **Черенков Д.А., Толкачева А.А., Корнеева О.С.** Разработка технологических основ биоремедиации почвы и воды, загрязненных нефтепродуктами

70 **Калюжин В.А., Калюжина А.В., Закиров Р.Н.** Биологическая деструкция и детоксикация полимерных присадок к буровым растворам

72 **Гомбоева С.В., Прудова Л.Ю., Фалилеева О.Ю.** Биотехнологические способы использования препарата ДНК из молок пресноводных рыб

73 **Безгачина Т.В.** Серологические исследования вибриоза у черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* на побережье Северного Кавказа

76 **Льонг Т.М., Нечаева И.А., Понамарева О.Н., Петриков К.В.** Влияние температуры на способность родококков, входящих в биопрепарат «Микробак», продуцировать гликолипидные биосурфактанты

78 **Мажулина И.В., Шевцов А.А., Тertychnaya Т.Н., Яковлева С.Ф.** Биотехнология получения ферментного препарата инулиназы с применением энергосбережения

79 **Шелепина Н.В.** Разработка технологий переработки побочных продуктов производства горохового крахмала

81 **Зайцева А.С., Туровская А.Д., Арляпов В.А.** Определение аналитических и метрологических характеристик медиаторного БПК-биосенсора на основе активного ила

82 **Славросова Е.В., Куленко В.Г., Шевчук В.Б., Фиалкова Е.А.** Энергоэффективный способ получения низколактозной деминерализованной молочной сыворотки

84 **Чечикова Е.В., Евстафьев С.Н.** Продукты превращения углеводов соломы пшеницы

SECTION 5. BIOTECHNOLOGY IN FOOD PRODUCTION AND IN AGRICULTURE

Albulov A.I., Frolova M.A., Grin' A.V. Biotechnology of deoxyribonucleic acid
Ivanova T.A., Kerechanina E.D., Pavlov N.D. Recovery of activated sludge
Sivolapov A.I., Blagodarova T.A., Sivolapov V.A. Biotechnology in silvicultural practice of fast-growing tree species

Frolova M.A., Albulov A.I., Samuilenko A.Ya., Frolov Yu.D. Industrial technology of production of trypsin
Pukhova N.M., Samuilenko A.Ya., Eremets V.I. The use of biotechnology achievements in the development of rabies vaccines
Kovaleva T.S., Yakovlev A.N., Agafonov G.V., Yakovleva S.F. Effect of the enzyme on the process of complex water-cooking of barley
Zipaev D.V., Kurmaeva T.S. The biomass of kefir grains as a way to enrich foods
Korneeva O.S., Goikalova O.Yu., Slozhenikina V.V. Biotransformation of sugar-containing feedstock in order to obtain isomaltulose
Chervyakova O.P., Karetkin B.A., Shakir I.V., Panfilov V.I. Evaluation of biopotential primary and secondary vegetative raw materials for obtaining the yeast feed additive enriched in carotenoids
Vasilevskaya E.R., Fedulova L.V. Animal raw materials as a source of natural regulators of immunity
Vinogradova O.N., Shumilova A.A. Construction and characterization of long-form pesticide drug based on natural poly-3-hydroxybutyrate

Sokolov A.Yu. Development of technology for the manufacture of the dissolved protein products for food purposes
Matvienko N.A., Yakovleva S.F., Motina E.A. Effect of pH on the process of hydrolysis and extraction of pectin from a pumpkin
Kovtunova A.S., Drevko Ya.B., Mendubaev D.V., Anikeev E.V., Larionova O.S., Faust E.A. Biotechnology of obtaining and the prospect of using alternative feed protein
Shuvaev P.V., Korneeva O.S., Tolkacheva A.A. Prospects of using minor sugars in production of lactic acid bacteria biomass
Rogov R.V., Gun'ko A.E., Samuilenko A.Ya., Albulov A.I., Frolova M.A. The use of protein hydrolyzate in treatment of dyspepsia of young cattle

Korneeva O.S., Strel'nikova D.E., Miroshnichenko L.A. Prospects of using amaranth as a raw material for the functional orientation beverage
Mytnitskaya Yu.F., Zayakin V.V., Nam I.Ya. The use of viral genes of raspberries bushy stunt for obtaining virus resistant plants of remontant raspberries
Gun'ko A.E., Rogov R.V., Samuilenko A.Ya., Albulov A.I., Frolova M.A. The protein hydrolyzate from waste of fur farming
Cherkasova A.V., Bessonova L.P., Grebenshchikov A.V. Assessing the possibility of using dietary supplements "Tykveron" in the production of functional purpose cheese products
Charyeva S.B., Kamanin S.S., Arlyapov V.A., Alferov V.A. Development of modified printed electrodes based on glucose and expanded graphite to control glucose

СЕКЦИЯ 5. БИОТЕХНОЛОГИЯ В ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВАХ И В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

86 **Албулов А.И., Фролова М.А., Гринь А.В.** Биотехнология дезоксирибонуклеиновой кислоты
87 **Иванова Т.А., Керечанина Е.Д., Павлов Н.Д.** Рекуперация активного ила
89 **Сиволапов А.И., Благодарова Т.А., Сиволапов В.А.** Биотехнология в лесокультурной практике быстрорастущих древесных пород
90 **Фролова М.А., Албулов А.И., Самуйленко А.Я., Фролов Ю.Д.** Промышленная технология получения трипсина
91 **Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Еремец В.И.** Использование достижений биотехнологии в разработке антирабических вакцин
93 **Ковалева Т.С., Яковлев А.Н., Агафонов Г.В., Яковлева С.Ф.** Влияние ферментного комплекса на процесс водно-тепловой обработки ячменя
94 **Зипаев Д.В., Курмаева Т.С.** Биомасса кефирных грибков как способ обогащения продуктов питания
95 **Корнеева О.С., Гойкалова О.Ю., Сложеникина В.В.** Биотрансформация сахарозосодержащего сырья с целью получения изомальтулозы
96 **Червякова О.П., Кареткин Б.А., Шакир И.В., Панфилов В.И.** Оценка биопотенциала первичного и вторичного растительного сырья для получения дрожжевой кормовой добавки, обогащенной каротиноидами
97 **Василевская Е.Р., Федуллова Л.В.** Животное сырье как источник природных регуляторов иммунитета
99 **Виноградова О.Н., Шумилова А.А.** Конструирование и характеристика долговременных форм пестицидных препаратов на основе природного полимера поли-3-гидроксibuтирата
99 **Соколов А.Ю.** Разработка технологии изготовления растворенных белковых продуктов для пищевых целей
101 **Матвиенко Н.А., Яковлева С.Ф., Мотина Е.А.** Влияние рН среды на процессы гидролиза и экстрагирования пектиновых веществ из тыквы
102 **Ковтунова А.С., Древо Я.Б., Мендубаев Д.В., Аникеев Е.В., Ларионова О.С., Фауст Е.А.** Биотехнология получения и перспектива использования альтернативного кормового белка
102 **Шуваев П.В., Корнеева О.С., Толкачёва А.А.** Перспективы использования минорных сахаров в производстве биомассы молочнокислых бактерий
105 **Рогов Р.В., Гунько А.Е., Самуйленко А.Я., Албулов А.И., Фролова М.А.** Применение белкового гидролизата в комплексном лечении диспепсии молодняка крупного рогатого скота
107 **Корнеева О.С., Стрельникова Д.Е., Мирошниченко Л.А.** Перспективы использования амаранта в качестве сырья для приготовления напитков функциональной направленности
107 **Мытницкая Ю.Ф., Заякин В.В., Нам И.Я.** Использование генов вируса кустистой карликовости малины для получения вирусоустойчивых растений ремонтантной малины
108 **Гунько А.Е., Рогов Р.В., Самуйленко А.Я., Албулов А.И., Фролова М.А.** Белковый гидролизат из отходов пушного звероводства
109 **Черкасова А.В., Бессонова Л.П., Гребеншиков А.В.** Оценка возможности применения БАД «Тыкверон» при производстве творожных продуктов функционального назначения
111 **Чарьева С.Б., Каманин С.С., Арляпов В.А., Алферов В.А.** Разработка модифицированных печатных электродов на основе глюкозооксидазы и терморасширенного графита для контроля содержания глюкозы

УДК 62-1/-9

Эксперт Н.Е. Бейлина, эксперт Л.В. Лир,
эксперт А.В. Макарычев, эксперт Е.А. Склончак
ООО «Воронежский региональный экспертный центр»
E-mail: vrecvtn@mail.ru

Методика расчета толщины днищ вертикальных сосудов, установленных на фундаменте

В статье рассмотрена возможность определения отбраковочной толщины плоских днищ в процессе экспертизы промышленной безопасности вертикальных сосудов с рабочим давлением под налив, установленных на фундаменте, с помощью методики расчета узла сопряжения стенки цилиндрического сварного сосуда с днищем.

The article considers the possibility of determining burn-the thickness of flat bottoms in the process of examination of industrial safety of vertical vessels with operating pressure under loading, mounted on the base, using the calculation method of the node walls of a cylindrical vessel with a welded bottom.

Ключевые слова: вертикальные сосуды, отбраковочная толщина плоских днищ, фундамент.

В процессе проведения экспертизы промышленной безопасности вертикальных сосудов с рабочим давлением под налив, имеющих плоское днище установленное на фундаменте, возникает проблема определения расчетной толщины днища. Ввиду того, что давление гидростатического столба жидкости, воздействующее на плоское днище, с одной стороны, компенсируется реакцией фундамента с другой, расчет толщины плоских круглых днищ сосудов и аппаратов, работающих под внутренним избыточным давлением по формулам, предусмотренным нормами и методами расчета на прочность по ГОСТ 14249, ГОСТ Р 52857.2 не представляется возможным.

Поскольку в узле сопряжения обечайки и днища (зона уторного шва) возникает краевой эффект и кроме меридиональных и кольцевых усилий появляется еще изгиб оболочек от изгибающих моментов, поперечных сил и дополнительных меридиональных и кольцевых усилий, в качестве одного из возможных вариантов решения задачи определения расчетной толщины

днища рассмотрена возможность применения методики расчета уторного узла базирующемся на способе, разработанном М.К. Сафаряном и М.Н. Ручимским. [1, 2]. В основу расчета положено следующее соображение. Если нагрузка, действующая на стенку сосуда, осесимметрична, то изгиб стенки может быть выражен дифференциальным уравнением, аналогичным дифференциальному уравнению изгиба балки на упругом основании (в смысле гипотезы коэффициента постели).

Выясним на примере вертикального стального сосуда с плоским днищем, установленным на твердом основании при рабочем давлении налив, имеющим радиус днища $r = 1500$ мм, толщину днища $\delta = 16,0$ мм толщину обечайки $\delta = 16,0$ мм, высоту $H = 8000$ мм возможность применения данной теории.

а) при приведенных исходных данных для обечайки сосуда имеем:

коэффициент постели обечайки

$$k_{cm} = \frac{E}{r^2} \delta = \frac{2,1 \cdot 10^6 \cdot 1,6}{1,5 \cdot 10^6} \frac{кг}{см^3}; \quad (1)$$

цилиндрическая жесткость обечайки

$$D_{cm} = \frac{E\delta^3}{12(1-\mu^2)} = \frac{2,1 \cdot 10^6 \cdot 1,6^3}{12 \cdot 0,91} = 0,787692 \cdot 10^6 \text{ кгс/см}^3; \quad (2)$$

коэффициент деформации обечайки

$$m_{cm} = \sqrt[4]{\frac{k_{cm}}{4D_{cm}}} = \sqrt[4]{\frac{14,9}{4 \cdot 0,787692 \cdot 10^6}} = 0,047 \text{ 1/см}; \quad (3)$$

$$ml = mH = 0,047 \cdot 800 = 37,3 > 6$$

Следовательно, и по классификации проф. Тимошенко [3], и по классификации проф. Уманского [4], единичную полосу обечайки можно рассматривать как бесконечно длинную балку.

б) для днища имеем:

цилиндрическая жесткость днища

$$D_{\text{дн}} = \frac{E\delta^3}{12(1-\mu^2)} = \frac{2,1 \cdot 10^6 \cdot 1,6^3}{12 \cdot 0,91} = 0,787692 \cdot 10^6 \text{ кгс/см}^3 \quad (4)$$

Задаемся коэффициентом постели бетонного основания $k_{\text{дн}} = 800 \text{ кгс/см}^3$ [5]

Тогда коэффициент деформации днища

$$m_{\text{дн}} = \sqrt[4]{\frac{k_{\text{дн}}}{4D_{\text{дн}}}} = \sqrt[4]{\frac{800}{4 \cdot 0,787692 \cdot 10^6}} = 0,13 \text{ 1/см} \quad (5)$$

$$ml = mH = 0,13 \cdot 800 = 101 > 6 \quad (6)$$

Следовательно, единичную полосу днища также можно рассматривать как бесконечно длинную балку.

Под воздействием внешних нагрузок в нижнем узле сосуда возникают изгибающий

момент X_1 и поперечная сила X_2 , т. е. задача является дважды статически неопределимой.

Используя метод сил, определяется изгибающий момент и поперечная сила в узле.

Определение единичных перемещений стенки от $X_1=1$ и $X_2=1$:

$$\delta_{11}^{cm} = \frac{1}{m_{cm} D_{cm}}; \quad (7)$$

$$\delta_{12}^{cm} = \delta_{21}^{cm} = \frac{1}{2m_{cm}^2 D_{cm}} \quad (8)$$

$$\delta_{22}^{cm} = \frac{1}{2m_{cm}^3 D_{cm}} \quad (9)$$

Определение грузовых членов, зависящих от внешней нагрузки:

$$\Delta_{1p}^{cm} = \frac{\gamma}{k_{cm}} \quad (10)$$

$$\Delta_{1p}^{cm} = \frac{\gamma}{k_{cm}} H \quad (11)$$

где γ - удельный вес вещества в сосуде, $\frac{\text{кгс}}{\text{см}^3}$.

Определение перемещений днища:

$$\delta_{11}^{\partial n} = \frac{1}{m_{\partial n} D_{\partial n}} \cdot \frac{1 + \varphi_{m_{\partial n} c}^2 + 2\theta_{m_{\partial n} c}^2}{4} \quad (12)$$

$$\Delta_{1q0}^{\partial n} = \frac{q_0 m_{\partial n}}{2k_{\partial n}} \left(1 - \varphi_{m_{\partial n} c} \phi_{m_{\partial n} c} + 2\theta_{m_{\partial n} c} \zeta_{m_{\partial n} c} \right) \quad (13)$$

$$\Delta_{1q0}^{\partial n} = \frac{q_1}{2m_{\partial n}^2 D_{\partial n}} \theta_{m_{\partial n} c}^2 \quad (14)$$

Где q_1 - равномерно-распределенная погонная нагрузка, приходящаяся на 1 см периметра корпуса от собственного веса обечайки и днища верхнего; q_0 - гидростатическое давление; значения функций $\theta_{m_{\partial n} c}$, $\varphi_{m_{\partial n} c}$, $\phi_{m_{\partial n} c}$, $\zeta_{m_{\partial n} c}$ определяются при аргументе $m_{\partial n} c$ по таблице 1 [3].

$$\delta_{11} = \delta_{11}^{cm} + \delta_{11}^{\partial n} \quad (15)$$

$$\Delta_{1p} = \Delta_{1p}^{cm} + \Delta_{1q1}^{\partial n} + \Delta_{1q0}^{\partial n} \quad (16)$$

Подставляя значения полученных перемещений в систему канонических уравнений:

$$\left. \begin{aligned} (\delta_{11}^{cm} + \delta_{11}^{\partial n}) X_1 + \delta_{12}^{cm} X_2 + \Delta_{1p}^{cm} + \Delta_{1p}^{\partial n} &= 0 \\ \delta_{21}^{cm} X_1 + \delta_{22}^{cm} X_2 + \Delta_{2p}^{cm} &= 0 \end{aligned} \right\} \quad (17)$$

определяем значения X_1 и X_2 .

Для определения изгибных напряжений в днище находим действующий на него максимальный изгибающий момент:

$$M = \frac{X_1}{2} (1 + \varphi_{m_{\partial n} c}^2) - \frac{q_1}{4m_{\partial n}} (1 - \theta_{m_{\partial n} c} \zeta_{m_{\partial n} c} - \varphi_{m_{\partial n} c} \phi_{m_{\partial n} c}) - \frac{q_0}{2m_{\partial n}^2} \cdot \zeta_{m_{\partial n} c}^2 \quad (18)$$

$$\sigma_{\partial n} = \frac{6 \cdot M}{\delta^2} \quad (19)$$

откуда нетрудно определить расчетную толщину δ_p при допускаемом напряжении $[\sigma]$:

$$\delta_p = \sqrt{\frac{6M}{[\sigma]}} \quad (20)$$

Считаем весьма целесообразным применение вышеописанной методики для определения отбраковочной толщины плоских днищ сосудов, установленных на твердом основании при рабочем давлении налив и изготовленных из цветных металлов и сплавов, так как

требования Руководящих указаний по эксплуатации и ремонту сосудов и аппаратов, работающих под давлением ниже 0,07 МПа (0,7 кгс/см²) и вакуумом (РУА-93) [6] определяют требования к отбраковке только стальных сварных сосудов и аппаратов.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Сафарян М. К. Стальные резервуары для хранения нефтепродуктов. Исследование работы конструкций [Текст]. М.:ОНТИ, 1958, 220 с.
- 2 Сафарян М. К. Металлические резервуары и газгольдеры [Текст]. М.:Недра, 1987, 200 с.
- 3 Тимошенко С. П. Сопротивление материалов, т. II [Текст]. М.-Л.: Гостехиздат, 1946.
- 4 Уманский А. А. Специальный курс строительной механики, ч. I [Текст]. М.-Л.: ОНТИ, 1935.
- 5 Фесик С. П. Справочник по сопротивлению материалов [Текст]. Киев: Будівельник, 1982, 280 с.
- 6 Руководящие указания по эксплуатации и ремонту сосудов и аппаратов, работающих под давлением ниже 0,07 МПа (0,7 кгс/см²) и вакуумом (РУА-93) [Текст]. Волгоград: АООТ "ВНИКТИ нефтехимоборудование", 1994.

REFERENCE

- 1 Safarian M.K. Steel storage tanks. Research work structures. [Text]. M: ONTI, 1958, 220 p.
- 2 Safaryan M.K. Metal tanks and gas tanks. [Text]. M.: Nedra, 1987, 200 p.
- 3 Timoshenko S.P. Strength of Materials, vol. II [Text]. M.-L .: Gostekhizdat 1946.
- 4 Umansky A.A. Special course of structural mechanics, vol. I [Text]. M.-L.: ONTI, 1935.
- 5 Fesik S.P. Handbook of resistance of materials. [Text]. Kiev Budivelnik, 1982, 280 p.
- 6 Guidelines for the operation and maintenance of vessels and equipment working under pressure lower than 0.07 MPa (0.7 kgf / cm²) and vacuum (ROI-93). [Text]. Volgograd: JSC "VNIKTI neftehimoborudovanie", 1994.

УДК 66-5

Эксперт Н.Е. Бейлина, эксперт Л.В. Лир,
эксперт А. В. Макарычев, эксперт Е. А. Склончак
ООО «Воронежский региональный экспертный центр»
E-mail: vrecvrm@mail.ru

Экспертиза промышленной безопасности проектной документации по техническому перевооружению опасного производственного объекта – нововведения в нормативную базу

В статье рассмотрены проблемы, возникающие при проектировании технического перевооружения автоматизации работы котлов, установленных в котельных предприятий и котельных цехах ТЭЦ, а также при проведении экспертизы промышленной безопасности проектной документации по техническому перевооружению данных опасных производственных объектов.

The article considers the problems arising when designing a technical upgrade automation of the boilers in boiler plants and heating plants CHP plants, as well as during the examination of industrial safety of project documents technical upgrade data hazardous production facilities.

Ключевые слова: промышленная безопасность, техническая безопасность, трубопровод.

При проектировании технического перевооружения автоматизации работы котлов, установленных в котельных предприятий и котельных цехах ТЭЦ, а также при проведении экспертизы промышленной безопасности проектной документации по техническому перевооружению данных опасных производственных объектов (ОПО) возникают вопросы по обеспечению выполнения требований промышленной безопасности при устройстве подвода топлива - природного газа и резервного жидкого топлива к котлам и горелочным устройствам котлов [3-6].

В пунктах: 5.9.7, 5.9.8, 5.9.9, 5.9.10, 5.9.11, 7.31, 7.32, 7.33, 7.35, 7.36, 7.37, 7.38, 7.39, 7.40 ПБ 12-529-03 «Правила безопасности систем газораспределения и потребления» (не действуют, отменены Приказом Ростехнадзора от 15.11.2013 г.) были установлены условия, порядок, последовательность установки запорной, регулирующей арматуры и арматуры безопасности на газопроводе подачи газа к котлу и к горелкам.

Было установлено, что:

- горелки пусковой мощностью свыше 0,4 МВт должны оснащаться стационарной запальной горелкой, обеспечивающей факел у основной горелки в режиме розжига, а также наличие факела на всех режимах работы газоиспользующей установки;

- врезка газопровода к защитно-запальным устройствам (ЗЗУ) горелок для газоиспользующих установок должна быть выполнена до предохранительных запорных клапанов (ПЗК);

- на котлах, конструкцией которых предусмотрены растопочные горелки, защитно-запальные устройства (ЗЗУ), обеспечивающие наличие и контроль запального факела у горелки в режиме розжига и селективный контроль факела основной горелки во всех режимах работы котла, включая режим розжига, допускается устанавливать только на растопочных горелках;

- газопроводы газоиспользующих установок с горелками единичной тепловой мощностью свыше 0,35 до 1,2 МВт должны быть оборудованы по ходу газа двумя располагаемыми последовательно предохранительными запорными клапанами (ПЗК) и регулирующим устройством перед горелкой, а газопроводы газоиспользующих установок с горелками единичной тепловой мощностью свыше 1,2 МВт должны быть оборудованы по ходу газа двумя располагаемыми последовательно предохранительными запорными клапанами (ПЗК), автоматическим отключающим устройством, установленным между ними, связанным с атмосферой, обеспечивающим автоматическую проверку герметичности затворов предохранительных запорных клапанов (ПЗК) перед запуском (розжигом) и регулирующим устройством перед горелкой;

- на газоиспользующих установках, оборудованных группой горелок с контролируемым факелом, обеспечивающим розжиг остальных горелок (группы), допускается первый по ходу газа предохранительный запорный клапан (ПЗК) устанавливать общим;

- газоиспользующие установки должны оснащаться системой технологических защит, прекращающих подачу газа в случаях: погасания факела горелки; отклонения давления газа перед горелкой за пределы области устойчивой работы; понижения давления воздуха ниже допустимого (для двухпроводных горелок); уменьшения разрежения в топке (кроме топок, работающих под наддувом); прекращения подачи электроэнергии или исчезновения напряжения на устройствах дистанционного и автоматического управления и средствах измерения;

- на отводе газопровода к котлу внутри здания должна предусматриваться установка двух отключающих устройств, первое по ходу газа может выполняться с ручным приводом; второе с электроприводом должно быть задействовано в схему защиты котла;

- на газопроводе-отводе к котлу после отключающих устройств должны предусматриваться: фланцевое соединение для установки поворотной или листовой заглушки с приспособлением для разжима фланцев и токопроводящей перемычкой; штуцер для подключения продувочного агента; общекотловой ПЗК; врезка газопровода к ЗЗУ горелок (только для газовых котлов); регулирующие клапаны (основной, растопочный), при устройстве индивидуального регулирующего клапана перед каждой горелкой растопочный клапан не обязателен;

- на газопроводе перед каждой горелкой котла последовательно должны устанавливаться два ПЗК, при использовании в качестве запорной арматуры двух быстродействующих запорных клапанов и индивидуального регулирующего клапана перед каждой горелкой установка общекотлового предохранительного запорного клапана необязательна;

- допускается установка одного ПЗК и отключающего устройства с электроприводом (очередность определяется проектом) и трубопровода безопасности между ними при условии установки общекотлового предохранительного запорного клапана;

- и так далее, то есть отмененный документ содержал конкретные данные.

Вновь введенные документы: Федеральные нормы и правила в области промышленной безопасности «Правила безопасности сетей газораспределения и газопотребления», Технический регламент о безопасности сетей газораспределения и газопотребления и действующий

СНиП 42-01-2002 «Газораспределительные системы» подобных указаний не имеют, а п. 62 Федеральных норм и правил в области промышленной безопасности «Правила промышленной безопасности опасных производственных объектов, на которых используется оборудование, работающее под избыточным давлением» [1, 2] в редакции «Для обеспечения взрывопожаробезопасности при работе котлов, подвод топлива к горелкам, требования к запорной, регулирующей и отсечной (предохранительной) арматуре, перечень необходимых защит и блокировок, а также требования к приготовлению и подаче топлива определяются для каждого вида топлива требованиями проектной документации, руководства (инструкции) по эксплуатации котла и нормами пожарной безопасности» носит скорее декларативный характер и не содержит конкретных указаний, то есть требования к автоматизации котлов есть, а конкретно каким образом это выполнить не указано. При этом СО 34.23.501-2005 «Методические указания по эксплуатации мазутных хозяйств тепловых электростанций», устанавливающие требования к обеспечению промышленной безопасности и взрывопожаробезопасных условий при эксплуатации основных, резервных, растопочных и аварийных МХ, содержащих основные требования и технологическую последовательность выполнения основных операций при приеме, перекачке, хранении и подготовке к сжиганию топочных мазутов по ГОСТ 10585-99 в котельных установках ТЭС, промышленных и отопительных, а также и ГОСТ 27824-2000 «Горелки промышленные на жидком топливе. Общие технические требования» не включены в новый перечень национальных стандартов и сводов правил вступивший в силу с 1 июля 2015 г. Все выше перечисленное требует разъяснений и осложняет работу проектировщиков и экспертов.

ЛИТЕРАТУРА

1 Кантемиров И.Ф. Разработка методов диагностики объектов трубопроводного транспорта на основе тепловизионного контроля [Текст] / автореф. дисс. ... канд. тех. наук. Уфа, 2000.

2 Шевцов А.А., Дерканосова А.А., Коротаяева А.А., Тонких Н.В. и др. Применение мембранных технологий при очистке сточных вод [Текст] // Международный академический вестник. 2015. № 3 (9). С. 77-78.

3 Харисов Р.А., Кантемиров И.Ф. Оценка фактической степени напряженности элементов трубопроводных систем при эксплуатации [Текст] // Проблемы сбора, подготовки и транспорта нефти и нефтепродуктов. 2011. № 3. С. 84-90.

4 Гумеров А.Г., Харисов Р.А., Кантемиров И.Ф., Латыпов А.М. Общие закономерности формирования характеристик безопасности объектов нефтепроводного транспорта [Текст] // Проблемы сбора, подготовки и транспорта нефти и нефтепродуктов. 2011. № 3. С. 125-132.

5 Данилова С.В., Косяков А.Ю., Бейлина Н.Е., Анохин Р.В. Промышленная безопасность: теоретические аспекты [Текст] // Актуальная биотехнология. 2015. № 1 (12). С. 54-58.

6 Данилова С.В., Косяков А.Ю., Бейлина Н.Е., Анохин Р.В. Обеспечение промышленной безопасности при производстве каучука [Текст] // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2015. № 1 (63). С. 184-187.

REFERENCE

1 Cantemirov I.F. Development of methods for diagnosis of pipeline transportation facilities based on thermal control [Text] / Author. diss. ... PhD. Ufa, 2000.

2 Shevtsov A.A., Derkanosova A.A., Korotayeva A.A., Tonkikh N.V. et al. The use of membrane technology in wastewater treatment [Text] // International Academic Gazette. 2015. № 3 (9). P. 77-78.

3 Kharisov R.A., Cantemirov I.F. Assessment of the actual degree of tension elements in the operation of pipeline systems [Text] // Problems of gathering, treatment and transportation of oil and petroleum products. 2011. № 3. P. 84-90.

4 Gumerov A.G., Kharisov R.A., Cantemirov I.F., Latypov A.M. The general laws of formation of the security characteristics of oil transportation facilities [Text] // Problems of gathering, treatment and transportation of oil and petroleum products. 2011. № 3. P. 125-132.

5 Danilova S.V., Kosyakov A.Y., Beilina N.E., Anohin R.V. Industrial safety: theoretical aspects of the [Text] // Actual biotechnology. 2015. № 1 (12). P. 54-58.

6 Danilova S.V., Kosyakov A.Y., Beilina N.E., Anohin R.V. Providing industrial safety in the manufacture of rubber [Text] // Bulletin of VSUET. 2015. № 1 (63). P. 184-187.

УДК 66-5

Эксперт Н. Е. Бейлина, эксперт Л. В. Лир,
эксперт А. В. Макарычев, эксперт Е. А. Склончак
ООО «Воронежский региональный экспертный центр»
E-mail: vrecvrm@mail.ru

Оптимизация работ при проведении экспертизы промышленной безопасности технических устройств и плановых ремонтов оборудования

В статье рассмотрена оптимизация работ при проведении экспертизы промышленной безопасности технических устройств и плановых ремонтов оборудования.

The article discusses the optimization works at the Providence industrial safety expertise of technical devices and planned repairs of the equipment.

Ключевые слова: промышленная безопасность, плановый ремонт, оборудование.

Экспертиза промышленной безопасности (далее – ЭПБ) объектов в любой компании не является стандартным мероприятием. Любой объект имеет свои конструктивные особенности, ремонтную документацию, особенности эксплуатации и по каждому необходимо разработать программу проведения экспертизы промышленной безопасности технического устройства, с учетом индивидуальных особенностей.

Еще один необходимый момент – оборудование необходимо исключить из технологического процесса, произвести подготовительные мероприятия для проведения ЭПБ и обеспечить возможность безопасного доступа к нему дефектоскопистов и экспертов. На предприятиях химической промышленности такая возможность предоставляется лишь в ежегодный остановочный ремонт и плановый ремонт для основного вспомогательного оборудования.

Проведение ремонтных работ и ЭПБ должны быть полностью скоординированы. Необходимо уже на этапе составления графиков ремонтов основного и вспомогательного оборудования на следующий год закладывать время и трудозатраты для подготовки оборудования к ЭПБ.

Для этого на химическом предприятии необходимо:

составить графики ремонтов основного и вспомогательного оборудования;

согласовать графики ремонтов основного и вспомогательного оборудования с графиком работ по проведения ЭПБ основного и

вспомогательного оборудования, при этом необходимо обеспечить выполнение всех мероприятий по подготовке к ЭПБ в полном объеме не позднее сроков, указанных в графике работ по проведения ЭПБ.

Но это лишь первый этап: необходимо определить перечень работ и сроки их проведения. Далее работникам химического предприятия, ответственным за формирование графиков проведения ЭПБ и составление технических заданий по подготовке оборудования к ЭПБ требуется:

на основе графика проведения ЭПБ произвести сметные расчёты;

обеспечить формирование сметных расчётов на выполнение работ по ЭПБ;

оформить технические задания на выполнение работ в установленном порядке.

Исходя из перечня объектов и сроков проведения работ по ЭПБ, на основании смет определяется с их ориентировочной стоимостью, она и закладывается в бюджет следующего года.

Что всегда тормозит проведение работ и должно быть организовано заблаговременно. Конкурентные процедуры по выбору подрядчиков. Тема проведения тендерных закупок достаточно обширная, здесь необходимо только сказать, что процедура проводится в жестко регламентированных рамках и находится под неустанным контролем внутреннего аудита любой компании и очень долгая. В результате после проведения торгов договор до подписания проходит согласования и пересогласования, этот этап растягивается до нескольких месяцев,

и зачастую работы по ЭПБ начинаются раньше его подписания, что серьезно затрудняет как подготовку к ним, так и получение качественного результата.

По нашему опыту: во-первых, проведение тендерной процедуры должно быть рассмотрено с учетом временных проволочек в процессе подписания договоров.

Во-вторых, подписанный договор по результатам проведения тендерной процедуры, должен быть направлен в адрес Исполнителя не позднее, чем за 20 рабочих дней до начала выполнения работ (оказания услуг) по данному договору. Это крайняя, минимальная дата.

На объектах I, II классов опасности существующая система планово предупредительных ремонтов выполняется и проводится в назначенном в графиках периоде, а ежегодный остановочный ремонт, как правило, в середине года,

на непродолжительный период (1-2 недели). В данный период организация выводит оборудование из эксплуатации, готовит к ЭПБ и ремонту.

Как показала практика, в период ежегодного остановочного ремонта на предприятиях химической промышленности огромное количество времени уходит на подготовку мест технических устройств для проведения неразрушающего контроля (УЗТ, УЗД, ПВК, МК).

Наша экспертная организация организует свою работу таким образом: определяет совместно с Заказчиком места зачистки под контроль, до ежегодного остановочного ремонта, для всех технических устройств, указанных в графике ЭПБ. Данное мероприятие значительно ускоряет время подготовительных работ к ЭПБ во время ежегодного остановочного ремонта, в результате чего выигрывает и предприятие, и экспертная организация.

ЛИТЕРАТУРА

1 Постановление Госгортехнадзора РФ от 18 марта 2003 г. N 9 "Об утверждении Правил безопасности систем газораспределения и газопотребления". Система гарант [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://base.garant.ru/12130499/#ixzz3nyOEhxJd>.

2 Шевцов А.А., Дерканосова А.А., Коротаяева А.А., Тонких Н.В., Муравьев А.С. Применение мембранных технологий при очистке сточных вод [Текст] // Международный академический вестник. 2015. № 3 (9). С. 77-78.

3 Гумеров А.Г., Харисов Р.А., Кантемиров И.Ф., Латыпов А.М. Общие закономерности формирования характеристик безопасности объектов нефтепроводного транспорта [Текст] // Проблемы сбора, подготовки и транспорта нефти и нефтепродуктов. 2011. № 3. С. 125-132.

4 Данилова С.В., Косяков А.Ю., Бейлина Н.Е., Анохин Р.В. Промышленная безопасность: теоретические аспекты [Текст] // Актуальная биотехнология. 2015. № 1 (12). С. 54-58.

5 Данилова С.В., Косяков А.Ю., Бейлина Н.Е., Анохин Р.В. Обеспечение промышленной безопасности при производстве каучука [Текст] // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2015. № 1 (63). С. 184-187.

REFERENCE

1 Resolution of State Technical Supervision of the Russian Federation of 18 March 2003 No. 9 "On approval of safety Rules of systems of gas distribution and consumption". System Garant [Electronic resource]: <http://base.garant.ru/12130499/#ixzz3nyOEhxJd>.

2 Shevtsov A. A., Derkanosova A. A., Korotayeva A. A., Tonkikh N. V., Muraviev A. S. Application of membrane technology in wastewater treatment [Text] // International academic journal. 2015. No. 3 (9). P. 77-78.

3 Gumerov A.G., Kharisov R.A., Kantemirov I.F., Latypov A. M. General regularities of the formation of characteristics of safety of the oil transport [Text] // Problems of gathering, treatment and TRANS-port of oil and oil products. 2011. No. 3. P. 125-132.

4 Danilova S.V., Stocks, A., Beilin N.E., Anokhin, R.V. Industrial safety: theoretical aspects [Text] // Actual biotechnology. 2015. No. 1 (12). 54-58.

5 Danilova S. V., Stocks, A., Beilin N. E., Anokhin, R. V. Software industrial without risk, in the production of rubber [Text] // Bulletin of VSUET. 2015. No. 1 (63). P. 184-187

УДК 66-5

Эксперт Н. Е. Бейлина, эксперт Л. В. Лир,
эксперт А. В. Макарычев, эксперт Е. А. Склончак
ООО «Воронежский региональный экспертный центр»
E-mail: vrecvrm@mail.ru

Некоторые особенности определения срока безопасной эксплуатации криогенных резервуаров

В статье рассмотрены особенности прогнозирования остаточного ресурса криогенных резервуаров.

Article is concert to peculiarities of forecasting of a residual resource of the cryogenic tanks.

Ключевые слова: остаточный ресурс, криогенные резервуары, малоцикловая усталость.

В настоящее время большое количество криогенных резервуаров типа ГХК, ЦТК, ТРЖК с термоизоляционным кожухом уже отработали назначенный срок службы. Тем не менее техническое состояние этих изделий на настоящий момент позволяет эксплуатировать их по прямому назначению. Большинство предприятий, эксплуатирующие такого рода оборудование, заинтересованы в продлении срока их безопасной эксплуатации, ввиду достаточно высокой стоимости нового.

В связи с этим возникает необходимость проведения экспертизы промышленной безопасности (ЭПБ) криогенных резервуаров, так как стоимость работ в процессе поведения ЭПБ несравнимо меньше стоимости нового оборудования, поскольку при положительных результатах которой возможно продление срока безопасной эксплуатации технических устройств, отработавших назначенный срок службы.

В общем случае современная методология оценки и прогнозирования технического состояния изложена в Методических указаниях по проведению диагностирования технического состояния и определению остаточного срока службы сосудов и аппаратов РД 03-421-01 [1], которая носит комплексный характер и в общем случае предусматривает:

- а) анализ технической документации;
- б) наружный и внутренний осмотр, визуально-измерительный контроль сосуда;
- в) контроль соответствия системы автоматизации требованиям Правил устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением;

г) неразрушающий контроль качества сварных соединений, толщинометрию;

д) определение химического состава, металлографические исследования, оценку механических свойств основного металла и сварных соединений;

е) проведение коррозионных исследований;

ж) анализ результатов технического диагностирования и проведение расчетов на прочность;

з) анализ повреждений и параметров технического состояния сосуда и установление критериев предельного состояния;

и) проведение уточненных расчетов на прочность;

к) определение остаточного ресурса сосуда;

л) гидравлические (пневматические) испытания.

В случае установления по результатам работ соответствия объекта технического диагностирования требованиям нормативной документации в качестве показателей технического состояния для прогнозирования остаточного ресурса сосудов и аппаратов чаще всего используют измеренные величины возникших повреждений (глубины коррозии, величины эрозионного или механического износа, остаточной пластической деформации), данные об изменении физико-химических характеристик материалов. Рекомендуемые математические модели для прогнозирования остаточного ресурса сосудов:

а) линейная модель вида хорошо описывает кинетику разрушения металлов при общей коррозии и различных видах механического изнашивания;

б) степенная зависимость применяется при описании многих видов коррозии поверхностей металлов (как сплошной, так и локальной), а также при коррозии под напряжением и изнашивании;

в) логарифмическая зависимость хорошо описывает кинетику газовой и локальной коррозии;

г) экспоненциальная модель применяется при описании кинетики общей коррозии под напряжением.

На практике при оценке ресурса оборудования чаще всего применяется линейная модель.

Конструктивными особенностями резервуаров являются наличие вакуумно-порошковой или вакуумно-многослойной изоляции и отсутствие люков.

Ввиду конструктивных особенностей резервуара, проведение работ по п.п. б), г), д), е), и) применительно к внутреннему сосуду либо нецелесообразно, либо не представляется возможным.

Техническое диагностирование криогенных резервуаров, отработавших установленный изготовителем срок службы, регламентируется КВО 6817 И [2], и включает:

а) анализ технической документации на сосуд;

б) внешний осмотр изделия;

в) проверку вакуумной герметичности изоляционной полости и герметичности внутреннего сосуда;

г) пневматические испытания внутреннего сосуда на прочность и плотность с использованием акустико-эмиссионного контроля;

д) определение остаточного ресурса.

Криогенный резервуар это сосуд с термоизоляционным кожухом, работающий под циклическим давлением при температуре 77 К. Внутренний сосуд из нержавеющей стали при эксплуатации заполняют сжиженные криопродукты, что исключает коррозию металла. Защиту от внешних воздействий выполняет термоизоляционный кожух.

Поскольку при техническом диагностировании криогенных сосудов получение численных значений показателей технического состояния по коррозионно-эрозионному износу невозможно, в качестве параметров технического состояния для прогнозирования остаточного ресурса используют число циклов нагружения сосудов.

Для определения влияния малоциклового усталости внутреннего корпуса сосуда на остаточный ресурс проводится расчет допускаемого числа циклов нагружения при расчетной амплитуде по ГОСТ Р 52857.6-2007.

Обозначение символов и числовых коэффициентов:

σ_a	– Амплитуда напряжений, МПа
$[\sigma_a]$	– Допускаемая амплитуда напряжений, МПа
N	– Число циклов нагружения
$[N]$	– Допускаемое число циклов нагружения
C_t	– Поправочный коэффициент, учитывающий температуру
A	– Характеристика материала, МПа
n_N	– Коэффициент запаса прочности по числу циклов
N	– Число циклов нагружения
B	– Характеристика материала, МПа
n_σ	– Коэффициент запаса прочности по напряжениям
ξ	– Коэффициент, учитывающий тип сварного соединения

Допускаемая амплитуда напряжений определяется по формуле:

$$[\sigma_a] = C_t \frac{A}{\sqrt{n_N N}} + \frac{B}{n_\sigma}, \quad (1)$$

где $n_N = 10$, $n_\sigma = 2$ (для стальных сосудов), коэффициенты A , B , C_t определяются по таблице 3 ГОСТ Р 52857.6-2007.

Амплитуда напряжений определяется по формуле:

$$\sigma_a = \frac{K_\sigma}{2} \Delta \sigma \quad (2)$$

где
$$K_{\sigma} = \frac{P\xi}{\varphi} \quad (3)$$

коэффициент ξ определяется по таблице 1 ГОСТ Р 52857.6-2007,

$$\Delta\sigma = \frac{PD}{2S} + \frac{P}{2} \quad (4)$$

Допускаемое число циклов нагружения определяется по формуле:

$$[N] = \frac{1}{n_N} \left[\frac{A}{\left(\overline{\sigma_a} - \frac{B}{n_{\sigma}} \right)} C_t \right]^2 \quad (5)$$

где

$$\overline{\sigma_a} = \max \left\{ \sigma_a; \frac{B}{n_{\sigma}} \right\} \quad (6)$$

Осуществляется сравнение максимального числа циклов нагружения в процессе эксплуатации N с допускаемым числом циклов нагружения $[N]$, а также амплитуды напряжений, возникающих при эксплуатации сосуда с допускаемой амплитудой напряжений. Условие малоциклового прочностного будет выполняться, если будут удовлетворяться условия:

$$\begin{aligned} \sigma_a &\leq [\sigma_a] \\ N &\leq [N] \end{aligned} \quad (7)$$

Для прогнозирования остаточного ресурса определяется среднегодовое количество нагружений:

$$N_{\text{пср/год}} = \frac{N}{n} \quad (8)$$

где n - максимальное количество лет эксплуатации.

Определяется остаточный ресурс

$$\frac{[N] - N}{N_{\text{пср/год}}} \quad (9)$$

Следует отметить, что поверочный расчет на усталостную прочность по ГОСТ Р 52857.6-2007 необходимо выполнять при условии, если число циклов изменения давления и температурных напряжений при работе технического устройств в переменном режиме за весь срок эксплуатации превышает 1000 для технических устройств, изготовленных из аустенитных сталей.

ЛИТЕРАТУРА

1 Методические указания по проведению диагностирования технического состояния и определению остаточного срока службы сосудов и аппаратов (РД 03-421-01). [Текст]. М.: Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-технический центр по безопасности в промышленности Госгортехнадзора России», 2002. Сер. 03. Вып. 17.

2 Инструкция по диагностированию технического состояния криогенных резервуаров с термоизоляционным кожухом на основе вакуума, отработавших назначенный срок службы (20 лет) КВО 6817 И [Текст]. Омск: НТК Криогенная техника, 1998.

3 ГОСТ Р 52857.6-2007 Сосуды и аппараты. Нормы и методы расчета на прочность. Расчет на прочность при малоциклового нагружениях.

REFERENCE

1 Methodical instructions on carrying out of diagnosing of technical condition and determining of residual life of vessels and apparatuses (RD 03-421-01). [Text]. M.: Federal state unitary enterprise "Scientific-technical center for industrial safety Gosgortekhnadzor Russia", 2002. Ser. 03. Vol. 17.

2 instructions for diagnostics of the technical condition of cryogenic tanks with thermal insulation casing, on the basis of vacuum points, exhaust specified lifetime (20 years) AND 6817 QUO. [Text]. Omsk: STC Cryogenic technique, 1998.

3 State standard R 52857.6-2007 Vessels and apparatus. Norms and methods of strength calculation. Strength calculation under low-cycle loads.

УДК 66-5

Эксперт Н. Е. Бейлина, эксперт Л. В. Лир,
эксперт А. В. Макарычев, эксперт Е. А. Склончак
ООО «Воронежский региональный экспертный центр»
E-mail: vrecvrm@mail.ru

Обоснование целесообразности проведения расчетов на прочность для условий гидроиспытания сосудов и аппаратов, предназначенных для работы под давлением 0,07 МПа (0,7 кгс/кв. см) и ниже

В статье рассмотрена целесообразность проведения дополнительного расчета на прочность для условий гидроиспытания сосудов и аппаратов, предназначенных для работы под давлением 0,07 МПа (0,7 кгс/кв. см) и ниже.

The article concerns the expediency of holding extra strength analysis for hydraulic testing of vessels and apparatuses designed to operate under pressure 0.07 MPa (0.7 kgf/cm²) and below.

Ключевые слова: гидроиспытания, аппараты под давлением, сосуды под давлением

Практика проведения расчетов на прочность сосудов и аппаратов, предназначенных для работы под давлением 0,07 МПа (0,7 кгс/кв. см) и ниже в соответствии с требованиями действующих нормативных документов [1,2], имеет свои особенности.

Положения ГОСТ 14249-89, ГОСТ Р 52857.1-2007 требуют проведения дополнительного расчета на прочность для условий испытания если расчетное давление в условиях испытания будет больше, чем расчетное давление в рабочих условиях, умноженное на $1,35 \frac{[\sigma]_{20}}{[\sigma]}$,

$$[\sigma] = \min \left(\frac{R_e \text{ или } R_{p0,2}}{n_T} \right); \quad (1)$$

а для условий испытания:

$$[\sigma] = \frac{R_e^{20} \text{ или } R_{p0,2}^{20}}{n_T} \quad (2)$$

где n_T коэффициент запаса прочности, который для рабочих условий равен 1,5; для гидравлических испытаний равен 1,1;

R_e минимальное значение предела текучести при расчетной температуре, МПа (кгс/см²);

$R_{p0,2}$ минимальное значение условного предела текучести при расчетной температуре (напряжение, при котором остаточное удлинение составляет 0,2%), МПа (кгс/см²);

где $[\sigma]_{20}$ и $[\sigma]$ - допускаемые напряжения при температуре 20 °С и при рабочей температуре соответственно, которые принимаются по наименьшему значению материалов элементов (обечайки, днища, фланцы, патрубки, крепеж и др.), сосуда (аппарата), определяющих его прочность.

Поскольку допускаемые напряжения при расчете по предельным нагрузкам сосудов и аппаратов, работающих при статических однократных нагрузках, изготовленных из листового проката, для углеродистых и низколегированных сталей определяют, как правило, по формуле:

R_e^{20} минимальное значение предела текучести, при температуре 20°С, МПа (кгс/см²);

$R_{p0,2}^{20}$ минимальное значение условного предела текучести при температуре 20°С, МПа (кгс/см²)

можно сделать вывод о том, что допускаемые напряжения для гидравлических испытаний по величине значительно выше, чем допускаемые напряжения для рабочих условий.

Величина пробного давления P_{np} , МПа (кгс/см²), (т. е. давления гидроиспытаний) регламентирована Руководящими указаниями РУА-93, и при отсутствии указаний в паспорте сосуда или в технической документации проектной организации, определяется:

$$P_{np} = 1,25P \frac{[\sigma]_{20}}{[\sigma]}, \quad (3)$$

где P - расчетное давление, МПа (кгс/кгс/см²) но должна быть не менее 0,1 МПа (1 кгс/кгс/см²).

Целесообразность проведения дополнительного расчета на прочность для условий гидроиспытания, при расчетной в рабочих условиях температуре равной 20°C, представляется возможным определить из выражения:

$$P_{сст} + 1,25P \frac{[\sigma]_{20}}{[\sigma]} \geq 1,35P \frac{[\sigma]_{20}}{[\sigma]}, \quad (4)$$

ЛИТЕРАТУРА

- 1 ГОСТ 14249-89 Сосуды и аппараты. Нормы и методы расчета на прочность.
- 2 ГОСТ Р 52857.1-2007 Сосуды и аппараты. Нормы и методы расчета на прочность. Общие требования.
- 3 Руководящие указания по эксплуатации и ремонту сосудов и аппаратов, работающих под давлением ниже 0,07 МПа (0,7 кгс/кв. см) и вакуумом (РУА-93). Волгоград: ВНИКТИ НХО, 1994.

где $P_{сст}$ - давление гидростатического столба жидкости (учитывается в расчетном давлении для условий гидроиспытания если на элемент сосуда или аппарата действует гидростатическое давление, составляющее 5% и выше рабочего по ГОСТ 14249-89, и в любом случае по ГОСТ Р 52857.1-2007).

Поскольку по определению

$$P_{max} = 0,07 \text{ МПа (0,7 кгс/см}^2\text{)}, \quad (5)$$

$$\text{а } \frac{[\sigma]_{20}}{[\sigma]} = 1 : P_{сст} = 0,007 \text{ МПа (0,07 кгс/см}^2\text{)}$$

Нетрудно заметить, что при увеличении расчетной температуры в рабочих условиях соотношение $\frac{[\sigma]_{20}}{[\sigma]}$ будет увеличиваться, что

приведет к тому, что необходимость в проведении расчета на прочность для условий гидроиспытания отпадет.

REFERENCE

- 1 State standard 14249-89 Vessels and apparatuses. Norms and methods of strength calculation;
- 2 State standard R 52857.1-2007 Vessels and apparatus. Norms and methods of strength calculation. General requirements;
- 3 Guidelines for maintenance and repair of vessels and apparatuses, working under pressure below 0.07 MPa (0.7 kgf/sq cm) and vacuum (RUA-93). [Text]. Volgograd: VNIKTI NHO, 1994.

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

Секция 1. Биотехнология и образование: заседание УМО (Секции биотехнологии)

УДК 378.048.2

ПРОЕКТИРОВАНИЕ ПЕДАГОГИЧЕСКОГО МОДУЛЯ ДЛЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ АСПИРАНТУРЫ

В.А. Соломонов, Н.А. Брагина, Р.Р. Биглов

*ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия.*

Введение трех уровней высшего образования в Российской Федерации и переход к формированию основных образовательных программ на основе компетентностного подхода привели к выделению педагогической деятельности в качестве одного из видов деятельности, к которой может вестись подготовка в техническом вузе. При этом в аспирантуре подготовка к педагогической деятельности является обязательным условием реализации основной образовательной программы. Рассмотрим вариант построения педагогического образовательного модуля в аспирантских программах, реализуемых в МИТХТ им. М.В. Ломоносова.

Объем учебного времени в зачетных единицах, выделяемого на формирование педагогической компетенции в соответствии с требованиями государственных образовательных стандартов (ФГОС ВО) устанавливается образовательной организацией самостоятельно. Вариант структуры педагогического модуля представлен в таблице 1. Общий объем педагогического модуля составляет 18 зачетных единиц (з.е.), что не превышает 10% от общего объема программ аспирантуры, и сравнимо с объемом учебного времени, необходимого для получения дополнительной квалификации при реализации программ переподготовки кадров.

Т а б л и ц а 1

Структура педагогического образовательного модуля

№ п/п	Наименование дисциплин и практик	Трудоемкость		Вид контроля
		з.е.	а.ч.	
1	Современные образовательные технологии	3	108	зачет
2	Дидактика высшей школы	3	108	зачет
	Теоретическая часть:	6	216	
3	Методическая практика	3	108	зачет
4	Учебно-ознакомительная практика	3	108	зачет
5	Учебная практика	6	216	зачет
	Практическая часть:	12	432	
	Итого:	18	648	
	Государственный экзамен	3	108	

Предлагается выделить методическую, учебно-ознакомительную и учебную практики. При этом методическая практика в обязательном порядке проводится после теоретической части модуля. В ходе учебно-ознакомительной практики обучающиеся знакомятся с методикой проектирования и проведения учебных занятий с использованием современных образовательных технологий, как правило, со студентами младших курсов. Учебная практика привязывается к реальному учебному процессу с учетом индивидуального учебного плана аспиранта. Учебная практика может разбиваться на части, как правило,

объемом не менее 3 з.е. Проведение учебной практики базируется на частных методиках конкретных выпускающих кафедр, поэтому допустимо проведение учебной практики параллельно с теоретическим обучением в профессиональных образовательных модулях и перенос учебной практики на старшие курсы (3 и 4 курсы) аспирантуры. Проведение практик завершается подготовкой отчетов и их защитой.

Для обеспечения готовности к преподавательской деятельности по основным образовательным программам высшей школы обучающиеся должны овладеть следующими видами педагогической деятельности:

- технологией проектирования учебного процесса на уровне отдельного учебного занятия, учебного модуля, основной образовательной программы;
- разработкой учебных и учебно-методических материалов;
- методикой проведения основных видов учебных занятий: лекций, семинаров, практических и лабораторных занятий в рамках учебной дисциплины (учебного модуля);
- традиционными и современными образовательными технологиями, в том числе интерактивными и дистанционными;
- средствами и приемами педагогической коммуникации;
- способами организации и контроля самостоятельной учебной работы;
- методами оценки качества освоения образовательной программы;
- оформлением отчетной документации о ходе учебного процесса, в том числе в электронном виде;
- анализом результатов педагогической деятельности.

Оценивание педагогической деятельности аспирантов осуществляется экспертами, роль которых могут исполнять: преподаватели, аспиранты (обучающиеся вместе с оцениваемым), студенты (которых аспирант учит). Результаты экспертизы отражаются в анкетах, разрабатываемых обучающей организацией. Основным документом, характеризующим педагогическую деятельность аспиранта, является индивидуальное портфолио, которое может вестись в электронном виде. В портфолио содержится и самооценка своей педагогической деятельности со стороны аспиранта. Глубина и уровень самооценки и самоанализа учитываются преподавателями при оценивании педагогической деятельности аспиранта. На основе портфолио может осуществляться подготовка аспиранта к сдаче итогового государственного экзамена.

УДК 378.14

ПОДГОТОВКА МАГИСТРОВ-БИОТЕХНОЛОГОВ ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ОРГАНИЗАЦИЙ НА ПРИМЕРЕ СОТРУДНИЧЕСТВА РОССИЙСКОГО И ЕВРОПЕЙСКОГО УНИВЕРСИТЕТОВ

М.Г. Сульман, Э.М. Сульман, Г.Н. Демиденко

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

Качество образования и уровень подготовки выпускников вузов любой ступени (от бакалавра до аспиранта) имеет определяющее значение для успешного развития современного государства. Одним из перспективных направлений сотрудничества России со странами Евросоюза, в частности странами Скандинавии, является гармонизация систем высшего образования в русле инициатив Европейского союза в сферах высшего образования и науки, в частности Болонской декларации и "Европейской зоны высшего образования". К европейским университетам, активно развивающим международное сотрудничество в последние десятилетия, относится Университет Або Академи (г. Турку), который обладает развитой базой для научно-исследовательской деятельности и занимает лидирующие позиции в Европе по образованию в области химической и биотехнологий, катализа, компьютерных наук, органической химии и полимеров, информационной и структурной биологии и естественных наук.

Основываясь на опыте многолетних партнерских отношений в научно-исследовательской деятельности, Тверской государственный технический университет на базе Института нано- и биотехнологий с 2008 г. совместно с Университетом Або Академи осуществляет международную образовательную программу в области подготовки магистров в области био- и химической инженерии.

ПРОЕКТИРОВАНИЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ МОДУЛЕЙ ПРОГРАММ МАГИСТРАТУРЫ И АСПИРАНТУРЫ

Н.А. Брагина, А.Б. Пшеничникова, В.А. Соломонов, В.И. Швец

*ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия*

Последнее поколение государственных образовательных стандартов высшего образования (ФГОС ВО) требует от разработчиков использования компетентностного подхода при проектировании и реализации основных образовательных программ (ООП). Результатом освоения ООП выступают компетенции выпускника, представляющие собой динамичную совокупность знаний, умений, навыков, способностей, ценностей, необходимых для эффективной профессиональной деятельности и личностного развития выпускников.

Для достижения планируемых результатов освоения ООП целесообразно их построение по модульному принципу. Под модулем понимается часть образовательной программы, имеющая определенную логическую завершенность по отношению к установленным целям и результатам обучения. Объем модуля рекомендуется выбирать кратным 3 зачетным единицам. Для каждого модуля задаются «входные требования» в виде набора необходимых для его освоения компетенций (или знаний и умений) и четко сформулированные планируемые результаты обучения. Модуль может состоять из отдельных учебных элементов: учебных дисциплин, практик, междисциплинарных видов учебной деятельности.

При проектировании профессиональных образовательных модулей в магистратуре вначале определяются основные и дополнительные виды деятельности, к которым будут готовиться магистранты. Затем на основе государственных (ФГОС ВО) и профессиональных стандартов формируется набор профессиональных компетенций. Обучающая организация с участием ключевых работодателей может добавить дополнительные профессиональные специализированные компетенции. Затем разрабатывается укрупненный учебный план, в котором, с учетом ограничений ФГОС ВО и исходя из сформированного перечня компетенций, проектируется набор образовательных модулей. Последние размещаются в учебном плане таким образом, чтобы обеспечить последовательное формирование компетенций. При этом зачетные единицы, выделенные для освоения профессиональной части ООП, распределяют по профессиональным образовательным модулям (объем модуля кратен 3 з.е.). Основываясь на укрупненном учебном плане, преподаватели выпускающих кафедр разрабатывают рабочие программы учебных дисциплин, практик и других элементов учебного процесса, составляющих отдельные модули. При разработке рабочих программ особое внимание следует обращать на подготовку фондов оценочных средств, позволяющих контролировать процесс формирования компетенций.

В отличие от магистратуры, в аспирантуре обучающиеся должны быть подготовлены к двум видам профессиональной деятельности: к научно-исследовательской деятельности в своей профессиональной области и к преподавательской деятельности по программам высшего образования. В ФГОС ВО аспирантуры определены универсальные компетенции, не зависящие от направления подготовки, и общепрофессиональные компетенции, учитывающие специфику направления подготовки. Профессиональные компетенции, связанные с профессиональной направленностью конкретной аспирантской программы, разрабатываются образовательной организацией самостоятельно.

Большая часть программы аспирантуры отводится на проведение научных исследований: так для четырехлетних программ обучения объемом 240 з.е. на проведение научных исследований отводится около 180 з.е., что составляет $\frac{3}{4}$ объема программы. Модули, связанные с проведением научных исследований, не являются полностью образовательными, так как они направлены, в первую очередь, на получение новых научных результатов в ходе самостоятельной научной работы аспирантов. Компонировка образовательных и научно-исследовательских модулей осуществляется при составлении индивидуального учебного плана аспиранта. При этом укрупненный учебный план является примерным. Разработка укрупненного учебного плана осуществляется на основе соответствующих образовательных и профессиональных стандартов, паспорта научной специальности, примерной и/или основной образовательной программы.

В рамках реализации федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» («Фарма 2020») с целью совершенствования системы подготовки специалистов для фармацевтической промышленности нами было осуществлено поэтапное проектирование профессиональных образовательных модулей ООП магистратуры и вариативной части аспирантуры с направленностью «Бионанотехнология» в соответствии с общим методическим алгоритмом, приведенном в работе [1]. Проектирование профессиональных компетенций выполняли, исходя из перечня задач профессиональной деятельности и трудовых функций в области разработки инновационных технологий и организации производства биофармацевтических препаратов, сформулированных на основе требований ключевых работодателей и соответствующих нормативных документов. Декомпозиция профессиональных компетенций на элементы (владения, умения и знания) служила основой для проектирования содержания и структуры модулей в целом и разработки рабочих программ и оценочных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Караваева Е.В. Рекомендуемый алгоритм проектирования программ высшего образования. // «Высшее образование в России». 2014. № 8-9. С. 5-15.

УДК 378.126

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В УЧЕБНОМ ПРОЦЕССЕ

Л.П. Лазурина, В.А. Лазаренко, П.В. Калуцкий

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск, Россия

В системе высшего профессионального образования России проходят реформы, направленные на повышение качества образования и приведение его в соответствие с общеевропейскими и мировыми стандартами.

Основой современного образования должны быть не столько учебные дисциплины, сколько способы мышления и деятельности студентов. Задачей высшего образовательного учреждения является не только выпуск специалистов, но и включение студентов в процесс студентов в разработку принципиально новых технологий, их адаптация к реальным условиям производства. При этом, в процессе обучения, важно развивать у студентов творческую активность, креативное мышление, умение оценивать, рационализировать, быстро адаптироваться к изменчивым потребностям рынка.

Поэтому в настоящее время все высшие учебные заведения находятся в постоянной конкурентной борьбе за потенциального студента. В этих условиях лучшие шансы на дальнейшую деятельность по подготовке специалистов, будут у тех вузов, которые гарантируют высокое качество образования, удовлетворяющее всех потребителей услуг этого учебного заведения. Главной задачей современной высшей школы является подготовка компетентного, гибкого, конкурентоспособного специалиста, являющего гармонически развитой личностью, органично вписанной в современное общество.

Возникающие в последнее время проблемы в системе высшего образования свидетельствуют о разрыве между изменившимися условиями жизни и образовательной системой, ее целями, видами, содержанием и технологиями обучения. В связи с этим традиционная технология обучения должна быть дополнена новыми технологиями, основанными на закономерности познавательной деятельности. В этом случае студент становится главной фигурой в учебном процессе, выступает как субъект обучения.

Инновационный процесс понимается как комплексная деятельность по созданию, освоению, использованию и распространению новшеств. Кроме того, инновации определяют новые методы, формы, средства, технологии, использующиеся в педагогической практике, ориентированные на личность студента, на развитие его способностей. Инновационное развитие позволит России стать конкурентным обществом. В условиях решения настоящих задач важнейшими качествами личности становятся инициативность, способность творчески мыслить и находить нестандартные решения, готовность обучаться в течение всей жизни. Все это успешно может быть сформировано в условиях инновационных

образовательных организациях, т.е. это учебное заведение, которые способны к саморазвитию и которые создают условия для полноценного развития всех своих участников.

Умение производить и внедрять инновации должно являться одним из главных достоинств специалиста, а поэтому в системе образования принцип «оптимальной адаптации» к применяющимся условиям должен заменить прежнюю модель «устойчивой специализации». Инновационное образование предполагает готовность действовать в новых условиях, исследование того, что случится или необходимо для общества.

Именно инновационные методы и технологии в преподавании смогут помочь преподавателю в решении поставленных задач.

Основные методические инновации также связаны с применением интерактивных форм и методов обучения, что является одним из важнейших направлений совершенствования подготовки студентов в современном вузе. При этом студенты легче вникают, понимают и запоминают материал, который они изучали посредством активного вовлечения их в учебный процесс.

Необходимо отметить, что с помощью интерактивного обучения можно решать одновременно несколько задач, направленных на развитие коммуникативных умений и навыков. Интерактивные методы позволяют установить эмоциональные контакты между студентами, развивают креативность, возможность нестандартно мыслить и уметь отстаивать свои интересы, формируют навыки работы в команде, обеспечивая высокую мотивацию в саморазвитии и самообучении, активную жизненную позицию и развитие творческого потенциала.

Преимущество инновационных методов сложно переоценить, так как они играют большую роль в формировании личностных качеств будущего специалиста.

С целью повышения мотивации обучения и его качества, улучшение к адаптации к новым условиям, большую роль может сыграть научная студенческая деятельность, так как в последнее время отмечается общая тенденция к снижению интереса к учебной и научной деятельности среди студентов. Выполнение научно-исследовательской работы студентов (НИИРС) в вузе позволяет реализовать их творческий потенциал в сфере науки.

Студенты овладевают научным методом познания для углубленного и творческого изучения учебного материала, изучают методологию научных исследований, обучаются методам и приемам самостоятельного решения научных задач.

Таким образом, все виды и формы традиционных и инновационных форм обучения направлены на активизацию творческого мышления студентов, применения научных методов в решении конкретных задач, что способствует повышению качества подготовки студентов. Привлечение студентов к научной деятельности повышает мотивацию к обучению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Струк Е.Н. Высшее образование в эпоху инноваций / Е.Н. Струк // *Фундаментальные исследования*. – 2005. - № 7. – с.61-62
2. Лаврентьев Г.В. Инновационные обучающие технологии в профессиональной подготовке специалистов / Г.В. Лаврентьев, Н.Б. Лаврентьева. – Барнаул: Издательство Алтайского гос.университета, 2002. – 155 с.
3. Лазурина Л.П. Формирование общих учебных умений и навыков студентов биотехнологического факультета или ключевой образовательной компетенции / Л. П. Лазурина, В.А. Лазаренко, А.И. Конопля, Н.С. Степашов // *Фундаментальные исследования* – 2007. - № 7.
4. Журбенко В.А., Саакян Э.С. Инновационные методы обучения в высшем образовании//*Инновации в образовании и медицине: материалы II Всероссийской научно-практической конференции*, - Махачкала, 2015. – с. 48-52.

УДК 663.03(075.8)+664.9(075.8)

**ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРЕРАБОТКИ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ (УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ)****О.В. Зинина¹, М.Б. Ребезов¹, Б.К. Асенова²**¹Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия²Государственный университет имени Шакарима, Семей, Казахстан

Решение стоящих перед пищевой промышленностью задач возможно только в русле инновационного развития [2, 4, 6].

Уникальная специфика пищевой промышленности состоит в том, что ряд выпускаемых ею продуктов имеет сжатые сроки пригодности к употреблению. Увеличение этого промежутка времени естественным образом стимулирует внедрение в производство самых последних разработок в области науки. Внедрение инноваций на всех стадиях жизненного цикла товаров является ключевым направлением повышения конкурентоспособности предприятий отечественной пищевой промышленности. Покупателей интересует не только качество продуктов питания, но и их питательные свойства, условия, в которых они произведены, транспортированы, осуществляется их хранение [3].

Повышение эффективности производства неизбежно связано с поиском и разработкой нового высокопроизводительного оборудования и новых технологий [1, 5]. Современные технологии и оборудование, ориентированные на получение высококачественной продукции, должны в полной мере отвечать требованиям энерго- и ресурсосбережения, экологической безопасности, быть конкурентоспособны как на внутреннем, так и внешнем рынке. Это возможно, если в их основе лежат прогрессивные инновационные идеи.

Аннотируемое учебное пособие «Инновационные технологии переработки сырья животного происхождения» разработано в соответствии с программами высшего профессионального образования.

Пособие состоит из введения, трех глав, приложения и библиографического списка. В первой части «Интенсификация технологических процессов» рассмотрено: физические (в т.ч. электрофизические) и биохимические способы интенсификации; Обработка пищевых продуктов радиационным излучением. Во второй части пособия «Инновационные технологические процессы, используемые при переработке сырья животного происхождения» изложены: экструзионная технология; биотехнологии; нанотехнологии; мембранные технологии; инновационные технологии производства авангардных мясопродуктов. В третьей главе рассматриваются вопросы рационального использования сырья животного происхождения.

Продуктовые инновации пищевой промышленности включают в себя разработку и производство экологически безопасных продуктов массового потребления; производство продуктов лечебно-профилактического назначения с учетом современных медико-биологических требований; разработку продукции для детей и особых групп населения.

Технологические инновации включают ресурсосберегающие технологии, совершенствование технологических процессов с целью сокращения времени производственного цикла, совершенствование тары, упаковки и способов перевозок.

В пособии рассмотрены технологические инновации, однако во многих случаях представленные инновационные технологии тесно связаны с получением в итоге продуктов функциональной направленности.

Таким образом, можно выделить основные направления в области инновационных технологий переработки продукции животного происхождения:

1) Разработка ресурсосберегающих технологий:

- рациональное использование вторичного и малоценного сырья (сыворотка, пахта, обезжиренное молоко, отходы первичной переработки скота, коллагенсодержащее сырье, субпродукты 2 категории и т.д.);
- технологии, позволяющие экономить энергетические ресурсы (например, ферментная обработка вторичного мясного сырья, СВЧ-обработка, обработка сырья ультразвуковыми волнами и т.д.).

2) разработка технологий, позволяющих повысить выход продукта, улучшить его качество (мембранные технологии, применение электрофизических методов обработки сырья и т.д.);

- 3) разработка высокоавтоматизированных и роботизированных линий по переработке сырья, нового современного оборудования;
- 4) применение современных пищевых добавок, способствующих улучшению качества продукта, повышающих его выход;
- 5) применение современных упаковочных материалов и технологий по сохранению качественных показателей продукта в течение длительного времени.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Антипова, Л.В. Использование вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности/ Л.В. Антипова, И.А. Глотова. – СПб: ГИОРД, 2006. – 384 с.
2. Богатова, О.В. Научные основы производства молока и молочных продуктов/ О.В. Богатова, Н.Н. Максимюк, С.В. Манылов, М.Б. Ребезов. – Оренбург: Изд-во ОГУ, 2008. – 99 с.
3. Губер Н.Б., Ребезов М.Б., Асенова Б.К. Перспективные способы разработки мясных биопродуктов. Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2014. Т. 2. № 1. С. 72–79.
4. Зинина, О.В. Биотехнологическая обработка мясного сырья: монография / О.В. Зинина, М.Б. Ребезов, А.А. Соловьева; ЮУрГУ. В.Новгород: Новгородский технопарк, 2013. 272.
5. Корж, А.П. Инновационные технологии производства авангардных мясопродуктов/ Мясные технологии. – № 7. – 2014. – С.6–8.
6. Фейнер, Г. Мясные продукты. Научные основы технологии, практические рекомендации/ Г. Фейнер. – СПб.: Профессия, 2010. – 720 с.

Секция 2. Фундаментальные аспекты современной биотехнологии

УДК 577.112; 571.27; 573.6.086.83

ПЕПТИДНЫЕ ФАКТОРЫ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Т.В. Овчинникова

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

В процессе эволюции многоклеточные организмы, от растений до человека, выработали многочисленные механизмы защиты от инфекции. Врождённый иммунитет – наиболее эволюционно ранняя форма иммунного ответа из всех защитных механизмов. В отличие от адаптивного (приобретенного) иммунитета, основанного на распознавании структурных особенностей конкретных инфекционных агентов (антигенных детерминант или эпитопов), врождённый иммунитет специализируется на детекции так называемых патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, присущих большим группам микроорганизмов. Врожденный и приобретенный блоки иммунной системы тесно взаимодействуют друг с другом. Так, адаптивный иммунный ответ невозможен без участия системы врождённого иммунитета.

В иммунных реакциях системы врождённой защиты принимают участие система комплемента, суперсемейство скавенджер-рецепторов, пентраксины, лектины, сурфактантные белки, ферменты (лизосим, лизосомные гидролазы), крупные антимикробные белки (лактоферрин, катепсин G), цитокины (интерфероны, интерлейкины, хемокины), липидные медиаторы (простагландины, лейкотриены), активные формы кислорода и другие молекулярные факторы [1]. Наряду с перечисленными соединениями особую роль в защите организма от инфекции играют эндогенные антимикробные пептиды (АМП), продуцируемые позвоночными и беспозвоночными животными, растениями, грибами и бактериями.

АМП выполняют как прямую эффекторную (антибиотическую, цитотоксическую), так и регуляторную (иммуномодулирующую) функции. Эффекторная функция АМП объясняется, как правило, их мембранотропными свойствами. Избирательность действия АМП может быть обусловлена различиями в липидном составе и трансмембранном потенциале мембран организма-хозяина и клеток-мишеней. Установлено специфичное взаимодействие некоторых пептидов с компонентами клеточных мембран патогенов. Некоторые АМП способны проникать через мембрану и воздействовать на внутриклеточные мишени. Наряду с антибиотической активностью АМП проявляют другие биологические свойства, в том числе стимулируют хемотаксис нейтрофилов, макрофагов, дендритных клеток и дегрануляцию тучных клеток; влияют на индукцию синтеза цитокинов, выброс хемокинов и гистамина; участвуют в регуляции регенерации тканей и ранозаживлении; увеличивают проницаемость сосудов и стимулируют ангиогенез; связывают и нейтрализуют липополисахарид и другие токсины; ингибируют АКТГ-опосредованный стероидогенез и МСГ-индуцированный синтез альдостерона в надпочечниках. Исследование механизмов действия природных АМП показывает их роль в качестве эндогенных иммуномодуляторов и открывает путь к пониманию закономерностей функционирования системы врожденного иммунитета.

Комплексные исследования, проводимые в Учебно-научном центре ИБХ РАН, направлены на изучение механизмов антибиотического, противоопухолевого и иммуномодулирующего действия природных АМП и их аналогов. Объектами изучения являются АМП растительного и животного происхождения. Особое внимание уделяется рассмотрению особенностей строения, биосинтеза и биологических функций АМП, пространственная структура которых представляет собой β -шпильку. Представители данного семейства АМП относятся к числу наиболее активных молекул животного происхождения с антибиотическими свойствами [2]. В частности, в Учебно-научном центре ИБХ РАН детально изучаются структурно-функциональные характеристики представителей семейства β -шпильчатых АМП ареницинов – катионных пептидов, выделенные из целомочитов морского кольчатого червя *Arenicola marina* [3]. Молекулы ареницинов состоят из 21 аминокислотного остатка и стабилизируются

одной дисульфидной связью, образующей 18-членный макроцикл. Ареницины обладают выраженной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, патогенных грибов и дрожжей даже в условиях высокой ионной силы. Целью проводимых исследований является создание прототипов новых лекарственных средств на основе ареницинов и других АМП, а также биотехнологической платформы для их получения. АМП рассматриваются в качестве альтернативы конвенциональным антибиотикам, к которым быстро формируется резистентность возбудителей инфекционных заболеваний. Структурно-функциональное изучение АМП создает предпосылки для разработки и биотехнологического получения нетоксичных аналогов этих соединений с целью создания на их основе лекарственных средств нового поколения для практического применения в медицине и ветеринарии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

ЛИТЕРАТУРА

1. В.Н.Кокряков. Очерки о врожденном иммунитете. Санкт-Петербург, «Наука», 2006, 262 с.
2. P.V.Panteleev, I.A.Bolosov, S.V.Balandin, T.V.Ovchinnikova. Structure and biological functions of β -hairpin antimicrobial peptides. Acta Naturae, 2015, v.7, No.1(24), p.37-47.
3. T.V.Ovchinnikova, G.M.Aleshina, S.V.Balandin, A.D.Krasnosdembetskaya, M.L.Markelov, E.I.Frolova, Y.F.Leonova, A.A.Tagayev, E.G.Krasnodembsky, V.N.Kokryakov. FEBS Lett., 2004, v.577, No.1-2, p.209–214.

УДК 545.43

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКА ТИЛОЗИНА МЕЖДУ НАТИВНОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТЬЮ И БУТИЛАЦЕТАТОМ В ПРИСУТСТВИИ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ.

**С.В. Антонова¹, Т.А. Воейкова¹, Б. В. Тяглов¹, А.А. Пушков¹,
К.В. Лобанов¹, И.И. Малахова², В.Д. Красиков²**

¹ ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва, Россия

² НТЦ «Ленхром», Санкт-Петербург, Россия

Было изучено влияние добавок хлорида и сульфата натрия, а также сульфата аммония на эффективность процесса экстракции тилозина из нативной культуральной жидкости (КЖ), содержащей 5,0-6,0 г/л антибиотика (продуктивность промышленного штамма *Str. fradiae*).

Концентрация солей варьировалась от 0,5 до 10,0% при соотношении объемов нативная КЖ (рН=8,0) : бутилацетат = 2:1. Установлено, что оптимальная концентрация сульфата (I) и хлорида (II) натрия является 5,0%, при этом $K_{pI}=11,7$ и $K_{pII}=11,5$. Однако, учитывая большую доступность и меньшую стоимость хлорида натрия, предпочтение было отдано именно этой соли.

Количественное определение содержания ионов натрия в растворе осуществляли с помощью потенциометрии, количественное содержание антибиотика в растворе определяли с помощью хромато-денситометрии на ТСХ - пластинках «Сорбфил» (НТЦ «Ленхром»).

УДК 579.22

**ВЫДЕЛЕНИЕ АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ БЕЛКОВ
С ПОВЕРХНОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ****А.С. Долмашкина, О.О. Балашова, Е.А. Горельникова, Л.В. Карпунина***ФГБОУ ВПО "Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова",
Саратов, Россия*

Лектины – это белки, способные обратимо и специфично связываться с углеводными фрагментами гликоконъюгатов. Лектины находят широкое применение в различных отраслях биологии, ветеринарии, медицины. В связи с этим особое внимание уделяется функциональной роли лектинов. Среди лектинов бактериального происхождения наименее изученными являются лектины молочнокислых бактерий.

Целью работы явилось выделение агглютинирующих белков из *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Культура *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* была получена из сухого порошка лиофилизированной бактериальной закваски болгарских палочек, используемых в России для производства йогуртов (Государственное унитарное предприятие производственно - экспериментальный завод РАСН, г. Москва). Лактобациллы выращивали при 37 °С на синтетической среде А. Welman [1] в течение 3-х суток. Используя метод [2], применяемый нами ранее, с поверхности клеток *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* были выделены агглютинирующие белки. Очистку белков проводили на колонке с помощью метода гелефильтрации, используя носитель Toyopearl HW-55. Белки элюировали 0,3М глициновым буфером (рН=3,0). Выход белковых фракций регистрировали на приборе Uvicord SII (LKB).

Таким образом, в процессе исследований нами были выделены два белка, обладающие гемагглютинирующей активностью и проявляющие антимикробную активность в отношении *Escherichia coli* 01 и *Lactococcus lactis* B-1662.

ЛИТЕРАТУРА

1. Welman, A.D. Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* / A.D. Welman, I. S. Maddox, R. H. Archer // J. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 95. – P. 1200 – 1206.
2. Карпунина, Л.В. Роль агглютинирующих белков азотфиксирующих бацилл и ризобий в жизнедеятельности бактерий и при взаимодействии с растениями : дис...док. биол. наук / Л.В. Карпунина. – Саратов, 2002. – 315с.

УДК 577.114

БИОТЕХНОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ**Е. В. Лияськина, В. В. Ревин, М.И. Назаркина, А.О. Богатырева, М.В. Щанкин***ФГБОУ ВПО "Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва", Саранск, Россия*

В настоящее время производство бактериальных экзополисахаридов (ЭПС) является одной из перспективных областей биотехнологии. Широкое применение нашли такие микробные полисахариды, как ксантан, гиалуроновая кислота, альгинат, леван, декстран, бактериальная целлюлоза и др. Они используются в медицине, фармацевтической, пищевой, химической и текстильной промышленности, в гидрометаллургии, технике, при добыче нефти и в ряде других областей народного хозяйства [7, 9]. В пищевой промышленности бактериальные ЭПС используются в первую очередь как стабилизаторы и загустители

различных продуктов. В фармацевтической промышленности они применяются для изготовления заменителей плазмы крови, различных лекарственных форм. Многие бактериальные ЭПС обладают лечебным и профилактическим действием: повышают устойчивость организма к бактериальным и вирусным инфекциям, обладают противоопухолевой активностью, способствуют заживлению ран и регенерации тканей. Они имеют большой потенциал использования в медицине как биоматериал для тканевой инженерии, создания раневых покрытий и трансдермальных терапевтических систем. Бактериальные ЭПС являются перспективным источником получения различных биокомпозиционных материалов.

В последние десятилетия описано огромное количество бактериальных ЭПС. Изучены их строение, структура, биосинтез и свойства [7, 8]. Значительный прогресс достигнут в обнаружении новых полисахаридов промышленного назначения.

На кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии Мордовского государственного университета в течение длительного времени проводятся исследования в области бактериальных ЭПС. Работы осуществляются совместно с ОАО «Биохимик», изготавливающим около 40% отечественного рынка декстрановых препаратов (полиглюкин и реополиглюкин). В коллекции микроорганизмов кафедры биотехнологии находятся 9 штаммов – продуцентов ЭПС - ксантана, декстрана, альгината, левана и бактериальной целлюлозы.

Целью работы было получение высокопродуктивных штаммов продуцентов ЭПС.

В результате селекции на основе естественной изменчивости и индуцированного мутагенеза получены высокопродуктивные штаммы бактерий *Xanthomonas campestris*, образующие ксантан в количестве 25 – 26 г/л, *Leuconostoc mesenteroides*, образующие декстран в количестве 40-50 г/л, *Gluconacetobacter sucrofermentans*, образующие бактериальную целлюлозу в количестве 6 – 7 г/л [3].

Подобраны оптимальные условия культивирования продуцентов: состав питательных сред, возраст и количество посевного материала, температура и значения pH среды, обеспечивающие максимальное накопление полисахаридов [1, 2, 4-6]. Изучены их физико-химические свойства.

Работа выполнена при финансовой поддержке министерства образования и науки Российской Федерации в рамках базовой части госзадания, проект 2913 «Исследование условий получения новых продуктов и материалов из бактериальной целлюлозы».

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Богатырева А.О. Изучение влияния органических кислот на образование бактериальной целлюлозы / А. О. Богатырева, Е. В. Лияськина, В. В. Ревин // Инновационная наука и современное общество. Сборник статей Международной научно-практической конференции. Уфа: Аэтерна. 2014. С. 19-21.
- 2 Котина Е.А., Пестов Н.А. Определение оптимальных условий биосинтеза бактериальной целлюлозы // Инновационная наука и современное общество. Сборник статей Международной научно-практической конференции. Уфа: Аэтерна. 2014. С. 24-26.
- 3 Ревин В. В., Лияськина Е.В Штамм *Gluconacetobacter sucrofermentans* – продуцент бактериальной целлюлозы. Патент РФ № 2523606. 12.03.2013.
- 4 Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назаркина М.И. Способ получения бактериальной целлюлозы. Патент РФ № 2536973. 6.12.2013.
- 5 Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назаркина М.И., Богатырева А.О., Щанкин М.В. Получение бактериальной целлюлозы на отходах пищевой промышленности // Актуальная биотехнология. 2014. № 3(10). С. 112-113.
- 6 Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Изучение влияния состава среды на физико-механические свойства бактериальной целлюлозы // Инновационная наука и современное общество. Сборник статей Международной научно-практической конференции. Уфа: Аэтерна. 2014. С. 33-35.
- 7 Lee K. Y., Buldum G., Mantalaris A. [et al.] More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites // Macromolecular bioscience. 2014. Vol.14. P. 10 – 32.
- 8 Rajwade J.M., Paknikar K.M., Kumbhar J.V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 99(6). P. 2491-511.
- 9 Schmid J., Sieber V., Rehm B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies // Front Microbiol. 2015. Vol. 6. P. 496.

УДК 616

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ СИНТЕЗА
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ
ДИАГНОСТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ***А.В. Степанов, Н.В. Майоров, А.К. Никифоров**ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия*

Своевременное обеспечение препаратами для генной диагностики опасных патогенов ПЦР-лабораторий ЦГСЭН является мощным и действенным фактором в деле обеспечения биологической безопасности РФ. РосНИПЧИ «Микроб», являясь центром по генной диагностике особо опасных инфекций, производит препараты для их индикации. Важнейшими компонентами таких наборов являются олигонуклеотидные праймеры. С 2003 года успешно внедрена в практику производства биотехнологическая схема их синтеза.

Каждый этап синтеза и используемые в нем растворы оказывают существенное влияние на количество и качество получаемых олигонуклеотидов. Поэтому нами постоянно проводятся исследования, направленные на повышение эффективности биотехнологической схемы синтеза, включающие подбор и оптимизацию состава реагентов.

Целью настоящей работы было изучение влияния состава растворов для деблокирования, активатора, окислителя на количественный выход олигонуклеотидов.

В результате проведенных исследований усовершенствована биотехнологическая схема синтеза, установлены оптимальные соотношения ингредиентов в используемых растворах и их концентрации, позволившие существенно увеличить количественный выход олигонуклеотидов и, соответственно, снизить затраты на изготовление препаратов для генной диагностики особо опасных инфекционных болезней.

УДК 579.66

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ *AUREOBASIDIUM PULLULANS* (D. BY), ARNAUD
И ПРИМЕНЕНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ***Л.И. Клецко**Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия*

Вопрос о стабильности всегда возникает, когда речь идет о культурах-продуцентах биологически активных веществ, используемых в производстве. Генетическая стабильность, или устойчивость, микроорганизмов заключается в их способности воспроизводить исходные вещества в ряде генераций.

Стабильные штаммы и другие внутривидовые варианты грибов, в отличие от нестабильных культур, реже изменяются по культурально-морфологическим, физиологическим, биосинтетическим и другим свойствам. При оптимальных условиях стабильные варианты сохраняют свои качества в течение длительного времени, а степень их изменчивости, или генетической стабильности, зависит от генотипа культуры и условий среды обитания.

Некоторые виды рода *Pullularia* сохранялись в течение двух лет в анаэробных условиях и в течение 17 лет в лиофилизированном состоянии практически без изменения своих свойств при 100% выживаемости.

В отличие от свежевыделенных штаммов, более стабильными являются музейные штаммы, сохраняющиеся в оптимальных условиях. Существование стабильных культур при выращивании и

хранении в неблагоприятных условиях непродолжительно. При высушивании клеток, например, снижается общее содержание нуклеиновых кислот, разрушается некоторое количество преимущественно высокомолекулярной РНК. Дегидратация микробных клеток нарушает процессы репликации ДНК, может привести к ее конформационным изменениям. Повреждение генетического аппарата, в свою очередь, может вызывать мутационные изменения.

Степень стабильности и степень популяционной изменчивости генетически детерминирована. Нестабильность грибов в значительной мере обусловлена хромосомными aberrациями. Более часто встречается класс вариантов, возникающих вследствие делеций в каком-либо из дуплицированных сегментов. Другой класс нестабильных вариантов образуется за счет тандемных дупликаций. У таких вариантов происходят как делеции во вновь образующихся дупликациях, так и транспозиция этих дупликаций в нередуплицированные районы генов. При такой нестабильности, получившей название митотического несоответствия, ядра могут не соответствовать друг другу по генотипу. Митотическое несоответствие связано с нарушением репликации ДНК. Хотя явление митотического несоответствия и осложняет получение стабильных промышленных штаммов, оно может быть использовано для создания последних при условии дупликации хромосомного сегмента, содержащего желательные структурные и регуляторные гены.

Процессы митотической сегрегации и кроссинговера также играют большую роль в изменчивости и стабилизации штаммов.

Следует обратить внимание и на адаптивную изменчивость грибов в экстремальных условиях. Что касается генетических механизмов адаптации, то предполагается, что последние происходят не путем изменения в структурных локусах, а посредством изменчивости регуляторных генов. Изменчивость в превращении гетерокарионов (неодинаковая интенсивность размножения ядер различных генотипов, их перегруппировка и др.) также представляет собой один из основных механизмов адаптации грибов.

Таким образом, использование в микробиологической промышленности не проверенных на генетическую стабильность культур грибов осложняет их поддержание и хранение, что является одной из причин дефектных ферментаций. Следовательно, для обоснования методов селекции и поддерживающего отбора необходимо изучение закономерностей и механизмов устойчивости и спонтанной изменчивости.

Объектами нашего исследования были культура *Aureobasidium pullulans* (D. BY), Arnaud, штамм 8 и его четыре спонтанных варианта – продуценты оригинального экзоглюкана аубазидана, обладающего многими полезными свойствами.

A. pullulans 8 является гетерогенной диморфной культурой. Популяционный состав при расसेве продуцента на чашках Петри с сусло-агаром через 6 суток культивирования при $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ был представлен несколькими типами колоний, отличающихся друг от друга по размеру, цвету, способности к формированию воздушного мицелия: I морфологический тип, «светлобежевый»; II - «бежевый»; III - «черный»; IV - «белый»; V - «коричневый». В популяции штамма 8 колонии I морфологического типа встречались с частотой 62,25% и представляли собой основной морфологический тип. Колонии II-V типов можно рассматривать как морфологически измененные варианты, так как частота их появления значительно ниже (1,10 – 21,64) %.

Для определения границ морфологической варибельности культуру *A. pullulans* 8 рассеивали на трех средах: сусло-агаре, агаре Сабуро и среде Лоддер и Кребер ван Ридж с добавлением 1,0% сульфата аммония. Популяционный состав продуцента зависел от состава питательной среды.

Популяции вариантов *A. pullulans* штамма 8 также были гетерогенны и, в зависимости от состава питательной среды, состояли из нескольких типов колоний. При рассеивании на сусло-агаре основным являлся вариант, определяющий название соответствующего морфологического типа.

Естественная популяция штамма 8 характеризовалась высокой варибельностью по биосинтезу аубазидана, коэффициент изменчивости равен 37,8%. Популяции исследуемых вариантов *A. pullulans* 8 также обнаруживали значительный размах спонтанной изменчивости активности накопления аубазидана.

Отмечена высокая, в сравнении с другими вариантами, стабильность культур «белого» варианта по морфолого-культуральным признакам при рассевах на средах различного состава, а также доминирование его клеток в процессе ферментаций ассоциации культур «белого» и «черного» вариантов на среде Чапека-Докса. Наше внимание привлекла также большая адаптационная способность, проявляв-

шаяся при изменении состава ферментационной среды, и стабильность при сохранении на разных средах. Мы предположили существование некоторых отличий в генетическом аппарате у «белого» и остальных исследуемых вариантов и провели сравнение генотипов с помощью полимеразной цепной реакции с универсальным праймером 45 (УП ПЦР). При этом не было обнаружено различий между образцами ДНК исследуемых вариантов, что подчеркивает видовое сходство последних.

Принимая во внимание тот факт, что в данном случае не было возможности получить достаточную информацию о качественном составе «общей» ДНК каждой из культур, в частности, о наличии (или отсутствии) двухмикронной ДНК-плазмиды, локализованной в нуклеоплазме, мы сделали это косвенным путем.

Предположив вероятность присутствия двунитевой ДНК у клеток «белого» варианта, была сделана попытка элиминировать плазмиду с помощью часто применяющегося для этой цели красителя акридинового оранжевого (АО), взятого в немутагенной для *A. pullulans* 8 концентрации – 200 мкг/мл.

Об эффективности обработки клеток АО судили по изменению морфолого-культуральных характеристик вариантов при рассевах обработанных АО культур на сусло-агаре и по изменению их способности к синтезу экзогликана.

В результате исследования установлено, что обработка культур «белого» варианта АО привела к практически полному исчезновению клеток, формирующих колонии «белого» типа: при расसेве на сусло-агаре доля последних в популяции «белого» варианта составляла 0,73% по отношению к общему числу просмотренных колоний. Напомним, что соответствующая величина до обработки культур АО для «белого» варианта равнялась 87,50%.

В целом же обработка культур АО привела к такому изменению соотношений клеток разных типов в популяции исследуемых вариантов, при котором доля клеток, формирующих колонии «бежевого» типа, оказалась максимальной, то есть к стабилизации *A. pullulans* по морфолого-культуральным признакам.

По результатам тестирования обработанных АО культур по признаку полисахаридообразования следует предположить, что синтез экзогликана у всех культур, за исключением «белого» варианта увеличен. Так, синтез полисахарида у обработанных АО «коричневого», «черного» и «бежевого» вариантов увеличился на 40%, 50% и 70% соответственно в сравнении с необработанными АО культурами, а у «белого» варианта, наоборот, снизился до 79,16% по отношению к контролю.

Сохранение культур в течение 15 месяцев на сусло-агаре с добавлением АО при температуре +(4-5) °C не повлияло на эффект стабилизации *A. pullulans* 8 по морфологическим признакам: доля клеток, формирующих при рассевах на сусло-агаре колонии «бежевого» типа, составляла 80,41% для «черного», 74,45% для «бежевого», 93,32% для «белого» вариантов. При этом отмечалось некоторое снижение числа колоний карликового низкопродуктивного «коричневого» типа: от 18,54% до 12,37% для «черного» варианта; от 10,48% до 3,52% для «бежевого» и от 8,44% до 1,38% для «белого».

Вместе с тем, способность к синтезу экзогликана уменьшилась у всех культур, за исключением «белого» варианта.

Следует отметить, что увеличение количества «нативного» полисахарида, образуемого обработанными АО продуцентами, происходит за счет повышения синтеза экзогликана, а не вследствие прироста биомассы. Например, доля гликана для не подвергшегося обработке АО «черного» варианта равна 55,57% по отношению к «нативному» продукту, а для обработанного АО – 71,67%. То есть, в результате воздействия АО на продуцент выход экзополисахарида увеличился на 22,47%.

Результаты проведенных исследований не могут дать однозначного ответа на наличие существования плазмидной ДНК у «белого» варианта *A. pullulans* шт.8, однако, такая возможность не исключается. Следует предположить, что данная культура содержит плазмиду, гены которой экспрессируются фенотипически и обеспечивают устойчивость клетки к неблагоприятным воздействиям внешней среды.

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ β -ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ

О.Л. Мещерякова, О.Ю. Гойкалова, О.С. Корнеева

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

Актуальной задачей современной биотехнологии является разработка высокоэффективных препаратов иммобилизованных ферментов, которые имеют ряд преимуществ перед свободными (нативными) ферментами: более высокую стабильность, возможность создания непрерывных и полунепрерывных автоматизированных процессов, способность к длительному функционированию полиферментных систем без экзогенных кофакторов и многократное их применение.

Иммобилизация β -фруктофуранозидазы является весьма оправданной с целью получения гетерогенного биокатализатора, способного работать в непрерывном режиме в нескольких реакционных циклах. В связи с этим исследованы параметры иммобилизации β -фруктофуранозидазы на волокнистом ионообменнике ФИБАН А-6.

Исследование влияния исходного значения pH среды на процесс иммобилизации β -фруктофуранозидазы, показало, что pH оказывает воздействие не только на стабильность ионообменника, а также на эффективность иммобилизации. Наибольшая эффективность процесса иммобилизации наблюдалась при значении pH 4,0. Влияние температуры на процесс иммобилизации β -фруктофуранозидазы было исследовано в диапазоне значений от 15 до 40 °С. Установлено, что температура 22 °С является оптимальной для процесса иммобилизации. β -фруктофуранозидазу иммобилизовали адсорбционным способом путем погружения сорбента в водные растворы фермента различных концентраций (0,1-1,0 мг/см³). Исследование зависимости сорбции от времени контакта с носителем показало, что самые высокие значения сорбции наблюдались через 40 мин. В среднем 1 г сорбента содержал 0,7 мг иммобилизованной β -фруктофуранозидазы, выход иммобилизованного фермента составил 68-71 %

Исследована термостабильность иммобилизованной β -фруктофуранозидазы, установлено, что фермент проявляет максимальную активность при pH 4,0 и температуре 70 °С. Установлено, что иммобилизованная β -фруктофуранозидаза сохраняла до 70 % активности по сравнению со свободным ферментом.

УДК 544.076.2:577.31

ОЦЕНКА КОНКУРЕНЦИИ КИСЛОРОДА И МЕДИАТОРОВ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА КАК АКЦЕПТОРОВ ЭЛЕКТРОНОВ В УСЛОВИЯХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА НА ОСНОВЕ МЕМБРАННОЙ ФРАКЦИИ БАКТЕРИЙ *GLUCONOBACTER OXYDANS*

С.В. Возчикова, С.В. Алферов, О.А. Герасимова

ФГБОУ ВПО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

Биотопливный элемент (БТЭ) – это биотехнологическое устройство, способное генерировать электроэнергию за счет окисления органических субстратов в присутствии ферментов или целых клеток микроорганизмов, которые выступают в качестве биокатализатора. Микроорганизмы способны окислять широкий спектр соединений, что делает микробные топливные элементы весьма эффективным средством не только для производства электрической энергии, но и защиты окружающей среды от загрязняющих веществ. Уксуснокислые бактерии *Gluconobacter*, обладающие особой метаболической системой, используются в пищевой промышленности и биотехнологии при получении биологически активных соединений. Эти бактерии нашли применение и при разработке БТЭ, биотопливом в которых могут служить отходы виноделия и других бродильных производств [1]. Однако энергетические параметры микробных топливных элементов ниже, чем у БТЭ на основе ферментов. Применение мембранной фракции

бактерий *G. oxydans*, которые содержат широкий набор мембранных дегидрогеназ, сопряженных с компонентами дыхательной цепи бактерий, является альтернативой индивидуальным ферментам и целым клеткам микроорганизмов и может обеспечить преимущества обоих типов биокатализаторов в БТЭ. Имобилизация биоматериала на поверхности анода позволяет многократно использовать применяемый биокатализатор, что увеличивает долговременную стабильность БТЭ, а также способствует более быстрому и эффективному переносу электронов на электрод. Для аэробных бактерий *G. oxydans*, кислород является естественным конечным акцептором электронов, поэтому в присутствии искусственного акцептора электронов в анодном пространстве может наблюдаться конкуренция между ними [2]. Согласно ранее проведенным исследованиям конкуренции за электроны между этими акцепторами в условиях работы БТЭ на основе целых клеток уксуснокислых бактерий не наблюдается [3]. В этой работе исследовали конкуренцию между кислородом и искусственными акцепторами электронов в при использовании мембранной фракции бактерий *G. oxydans* в качестве биокатализатора в анодном отделении БТЭ.

Скорости восстановления кислорода мембранной фракцией бактерий *G. oxydans* определяли в системе: фоновый электролит, глюкоза, биокатализатор в суспендированном виде или иммобилизованный непосредственно на электрод в присутствии и отсутствии медиаторов электронного транспорта - 2,6-дихлофенолиндофенол, феназинметасульфат и гексацианоферрат калия (таблица 1).

Т а б л и ц а 1

Скорости восстановления кислорода в БТЭ на основе мембранной фракции *G. oxydans*

Тип биокатализатора	Скорость восстановления кислорода, нормированная на единицу биокатализатора, мкмоль/с·г
Суспензия мембранной фракции (в присутствии медиатора)	2,1±0,3
Суспензия мембранной фракции (в отсутствии медиатора)	2,10±0,02
Иммобилизованная на аноде мембранная фракция бактерий (в присутствии медиатора)	0,024±0,002
Иммобилизованная на аноде мембранная фракция бактерий (в отсутствии медиатора)	0,022±0,001

Скорость восстановления кислорода в БТЭ суспензией мембранной фракции *G. oxydans* в 10 раз превышает значения, полученные для БТЭ на основе иммобилизованной мембранной фракции. Это объясняется тем, что окисление субстрата свободносуспендированным биокатализатором происходит во всем объеме анодной ячейки, в то время как иммобилизованный способен окислять субстрат и потреблять кислород только в приэлектродном пространстве. Независимо от типа биокатализатора скорость восстановления кислорода в БТЭ в случаях присутствия и отсутствия медиатора электронного транспорта практически не отличаются. Это свидетельствует о том, что, в рассматриваемой системе отсутствует конкуренция между кислородом и медиатором электронного транспорта при акцепции электронов с восстановительных сайтов биокатализатора.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (грант № 13-03-97514).

ЛИТЕРАТУРА

1. Понаморева О.Н. «Биосенсоры и биотопливные элементы на основе целых клеток микроорганизмов и выделенных из них ферментов. Обзор.» / Понаморева О.Н. // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки – 2009 - №1 – С. 138-157.
2. Gupta A. «*Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications» / Gupta A. [et al.] // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology – 2001 - №3 – Р. 445–456.
3. Алферов С.В. «Оценка конкуренции кислорода и медиатора электронного транспорта в условиях работы микробного топливного элемента на основе бактерий *Gluconobacter oxydans*» / Алферов С.В., Минайчева П.Р., Нгуен В.Т., Алферов В.А. // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки – 2013 - №3 – С. 235-243.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ И СВОЙСТВА П(ЗГБ/4ГБ) С ВЫСОКИМ ВКЛЮЧЕНИЕМ ФРАКЦИИ 4ГБ

О.Н. Виноградова

ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия

Природные полиэфиры – полигидроксиалканоаты (ПГА) – синтезируют прокариотические микроорганизмы в ходе сложного биосинтетического процесса. Наибольший интерес среди известных ПГА вызывают сополимерные образцы. Связано это с тем, что в зависимости от состава и соотношения мономеров в ПГА их базовые физико-химические свойства изменяются в широких пределах [1]. Прежде всего, это относится к степени кристалличности, температурным показателям и удлинению при разрыве – параметрам, которые определяют условия переработки полимеров и характеристики получаемых изделий.

Природный штамм бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 культивировали в гетеротрофных условиях, где в качестве основного углеродного субстрата использовали масляную кислоту, а в качестве субстрата-предшественника для синтеза мономера 4-гидроксibuтирата (4ГБ) – γ -бутиролактон. Варьируя концентрацию и время добавок получили П(ЗГБ/4ГБ) с включением 4ГБ от 3 до 75 мол.% (таблица 1). С применением современных методов анализа в сравнительном аспекте исследованы физико-химические (молекулярная масса, степень кристалличности, температуры плавления и термической дегградации), физико-механические (модуль Юнга, напряжение при разрыве, удлинение при разрыве) свойства сополимерных ПГА с различным соотношением мономеров.

Т а б л и ц а 1

Состав, физико-химические и механические свойства П(ЗГБ/4ГБ)

Состав ПГА, мол. %		T _{пл} , °C	T _{дегр} , °C	C _х , %	M _в , кДа	ПД	E, МПа	σ , МПа	ϵ , %
ЗГБ	4ГБ								
100	0	178	295	76	920	2,52	2071,2	16,7	2,5
63,7	36,3	169	287	21	435	3,37	13,3	1,7	43,5
51,7	48,3	168	289	17	525	3,50	14,6	1,3	38,5
46,5	53,5	170	290	36	732	4,28	94,8	4,9	41,5
25,0	75,0	166	275	30	704	4,71	7,9	49,4	299,0

T_{пл} – температура плавления, T_{дегр} – температура термической дегградации, C_х – степень кристалличности, M_в – средневесовая молекулярная масса, ПД – полидисперсность, E – модуль Юнга, σ – напряжение при разрыве, ϵ – удлинение при разрыве

Таким образом, установлено, что сополимерные ПГА в сравнении с ПЗГБ имеют значительно более низкую степень кристалличности и более низкие значения температуры плавления и термической дегградации. Пленки, исследованных сополимерных ПГА, имеют более высокие показатели прочности и эластичности по сравнению с ПЗГБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Laycock B., Halley P., Pratt S., Werker A., Lant P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates // Prog. Polym. Sci. 2013. Vol. 38. P. 536.583.

УДК 577.151

**ОПТИМИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ФУКОИДАНА
БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ****Ю.С. Новикова, Е.П. Анохина, О.С. Корнеева***ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия*

Актуальным в настоящее время является разработка биотехнологии «минорного» сахара – фукозы. Фукоза является незаменимым углеводным компонентом иммуноглобулинов и выполняет важные функции во многих биологических процессах позвоночных, в том числе репродуктивных [1]. К тому же фукоза и ее полимеры обладают пребиотическим действием [2].

Фукоза встречается в природе в составе фукоиданов – полисахаридов бурых водорослей, которые являются наиболее доступным и недорогим растительным сырьем. Наилучшим источником фукоидана являются водоросли *Fucus vesiculosus* [3].

Для ферментативного получения фукозы проведена оптимизация гидролиза фукоидана бурых водорослей под действием иммобилизованной α -L-фукозидазы [4].

В результате исследований установлены оптимальные условия гидролиза фукоидана водорослей *Fucus vesiculosus*: дозировка фермента 6 ед/г, температура 50 °С, pH 7,0, время гидролиза 5 ч. При таких условиях степень гидролиза фукоидана достигает 83-85%, что является хорошим показателем и показывает перспективность ферментативного гидролиза для получения фукозы из растительного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1 Intra J., Cenni F., Perotti M.-E. An α -L-fucosidase potentially involved in fertilization is present on drosophila spermatozoa surface // Molecular reproduction and development. 2006. V. 73. P. 1149–1158.

2. Исследование бифидогенной активности фукозы и ее полимеров / Санина Т.В. [и др.] // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 1. С. 141-143.

3 Новикова Ю.С., Анохина Е.П., Корнеева О.С. Выбор источника фукоидана и оптимизация его ферментативного гидролиза // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. - 2015. - № 2. – С. 224-228.

4. Мещерякова О.Л., Новикова Ю.С., Анохина Е.П., Корнеева О.С. Получение и характеристика биокатализаторов на основе иммобилизованных гликозидаз // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. - 2014. - №4. – С. 206-212.

УДК 615.35:615.468.7

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФИЦИНА НА МАТРИЦЕ ХИТОЗАНА
ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ****М.Г. Холявка¹, В.А. Королева¹, С.С. Ольшанникова¹, А.Р. Каюмов²,
И.С. Шарафутдинов², Д.Р. Байдашина², В.Г. Артюхов¹**¹*Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия*²*Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, Россия*

В области получения лекарственных препаратов, в состав которых входит хитозан и его производные, к настоящему времени в мировой и российской литературе накоплен значительный материал [1]. Хитозаны являются сополимерами 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкозамина и 2-ацетамидо-2-дезоксид-β-D-глюкозамина. Молекулы хитозанов содержат гидроксильные и аминогруппы, их полимерная матрица позволяет иммобилизовать ферменты, как внутри сетки, так и на ее поверхности [2, 3]. Производные хитозанов характеризуются нетоксичностью, биоразлагаемостью, биосовместимостью и слабой иммуногенностью.

Фицин (КФ 3.4.22.3) – протеолитический фермент, выделенный из латекса растений рода *Ficus*. Энзим относится к сульфгидрильным протеиназам, имеет довольно широкую субстратную специфичность и гидролизует казеин с большей скоростью, чем папаин и трипсин.

Цель исследования состояла в разработке методики получения гетерогенного биокатализатора медицинского назначения на основе фицина, иммобилизованного на матрице хитозана.

Анализ содержания белка в гетерогенных препаратах показал, что наибольшее количество фицина (в мг на г носителя) при его концентрации в иммобилизационной среде 1 мг/мл сорбируется на кислоторастворимом высокомолекулярном хитозане при использовании фосфатного буфера с pH 8,0, трис-глицинового буфера с pH 8,3, боратного буфера с добавлением KCL с pH 9,0 и глицинового буфера в диапазоне pH 8,6-10,5. Общая активность (в ед на мл раствора) гетерогенных препаратов оказалась выше при использовании следующих буферов: глициновый 8,6 и трис-глициновый 7,5-8,3. Максимальную удельную активность (в ед/мг белка, порядка 70 % активности свободного фицина) показал препарат, иммобилизованный при pH 8,6 в глициновом буфере; таким образом, мы считаем, что этот буфер при данном значении pH наиболее перспективен для адсорбции фицина на матрице кислоторастворимого высокомолекулярного хитозана.

При сорбции на матрице среднемолекулярного хитозана максимальное содержание белка в гетерогенном препарате при концентрации фицина в иммобилизационной среде 1 мг/мл наблюдается при использовании фосфатного (pH 6,0) и глицинового (pH 8,6-10,5) буферов. Общая активность (в ед на мл раствора) и удельная активность (в ед/мг белка) гетерогенных препаратов оказалась выше при использовании следующих буферных систем: глициновый буфер с pH 8,6-10,5, ацетатный буфер с pH 5,8, боратный буфер с добавлением KCL с pH 9,0. По сочетанию степени сорбции и проценту сохранения каталитической активности оптимальным оказалось применение в качестве иммобилизационной среды глицинового буфера в диапазоне pH 8,6-10,5.

Обязательным этапом разработки новых медицинских препаратов является проверка их мутагенного и цитотоксического действия. Мы протестировали генотоксичность фицина, предполагаемых носителей для иммобилизации, а также иммобилизованного фицина. Концентрация фермента составила 10 мкг/мл, что соответствует превышению планируемой фармацевтической концентрации в 10 раз. Концентрация хитозанов, а также хитозанов с иммобилизованным на них фицином составила 75 мг/мл, что соответствует планируемой фармацевтической концентрации. Установлено, что сам фермент, хитозаны и энзим, иммобилизованный на хитозанах, не продемонстрировали мутагенного действия в тесте Эймса. Также мы оценивали ДНК-повреждающую активность препаратов в SOS-хромостесте с использованием штамма *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, несущего ген β -галактозидазы под контролем промотора *umi*-оперона. В данном тесте внесение ни одного из тестируемых образцов не приводило к повышению активности β -галактозидазы, следовательно, данные препараты не обладают генотоксичностью.

Тестируемые соединения не приводили к снижению активности митохондриальной дегидрогеназы по окислению MTS. Из этого следует то, что все они являются не токсичными и могут быть использованы в качестве ранозаживляющих препаратов.

Далее мы изучили влияние фицина, хитозанов и иммобилизованного фермента на морфологию клеток MCF7. Клетки исследовали путем фазово-контрастной микроскопии на 2 сутки инкубации с тестируемыми препаратами. В качестве контроля использовали азид натрия – высокотоксичное вещество. В случае всех исследованных образцов не выявлено трансформации морфологии клеток, что можно трактовать как отсутствие их токсичности против клеток.

Таким образом, нами была подобрана методика иммобилизации фицина на матрице кислоторастворимых среднемолекулярного и высокомолекулярного хитозанов, позволяющая сохранить до 70 % первоначальной каталитической активности фермента, проведена оценка гено- и цитотоксичности получаемых ферментных комплексов, которая свидетельствует о возможности их применения в фармацевтической промышленности и медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сливкин Д.А., Лапенко В.Л., Сафонова О.А., Суслина С.Н., Беленова А.С. // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011. № 2. С. 214-232.
2. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Беленова А.С. // Фундаментальные исследования. 2013. № 11-3. С. 484-487.
3. Логинова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. // Биофармацевтический журнал. 2015. Т.7, №2. С. 13-16.

УДК 579.63

БАКТЕРИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК**Г.П. Шубаева, В.А. Небольсин, В.Н. Санин, И.М. Голев, А.В. Цубенко, Я.В. Токарева***ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия*

В настоящее время активно проводятся исследования возможностей применения углеродных наноматериалов в биологии и медицине. Известно, что углеродные нанотрубки могут легко поглощаться клетками и поэтому могут выступать в роли переносчиков различных атомов и молекул, необходимых для лечения и диагностики заболеваний. Интенсивно исследуются не только терапевтические и диагностические применения нанотрубок, а также их токсичность и возможные вызываемые ими патологии. Однако углеродные нанотрубки до настоящего момента еще находятся на ранней стадии медицинский разработки, эффективность и ограничения в их применении еще предстоит тщательно изучить. Возможная токсичность этих материалов очень активно обсуждается.

Нами были проведены исследования бактерицидных свойств многослойных нанотрубок, которые представляли собой наноразмерные нитевидные образования поликристаллического графита цилиндрической формы с внутренним каналом. Диаметр углеродных нанотрубок составлял $8 \div 150$ нм, канала $4 \div 8$ нм, их длина от 2 мкм до 2 мм.

Цель данной работы состояла в том, чтобы изучить влияние углеродных нанотрубок на жизнеспособность микроорганизмов различных таксономических групп.

Объектами исследования были чистые культуры дрожжей, мицелиальных грибов и бактерий, полученные из музея чистых культур кафедры биохимии и биотехнологии ВГУИТ: *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium canescens*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. В эксперименте использовали смывы стерильной водой с пробирок с чистыми культурами, выращенными на агаризованных средах (сусло-агар и мясопептонный агар). Суспензии клеток микроорганизмов смешивали с углеродными нанотрубками таким образом, чтобы в 1 см^3 водной суспензии присутствовал 1 млрд. клеток или спор и 0,2 мг частиц, и выдерживали при комнатной температуре. По истечении 72 часов определяли число жизнеспособных клеток. Для этого в стерильные чашки Петри, соблюдая правила асептики, вносили $0,1 \text{ см}^3$, $0,2 \text{ см}^3$, $0,5 \text{ см}^3$ и $1,0 \text{ см}^3$ суспензии и приливали по $20\text{--}25 \text{ см}^3$ расплавленного и охлажденного до $45\text{--}46^\circ\text{C}$ мясопептонного агара. После застывания питательной среды посеvy помещали в термостат, и инкубировали 48 ч при $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Результат рассчитывали как среднее арифметическое по четырём чашкам, выражая числом колонииобразующих единиц (кое) в 1 см^3 исследуемой пробы.

По результатам работы установлено, что после экспозиции в течение 72 ч количество жизнеспособных клеток бактерий рода *Bacillus* уменьшилась на 79%, *Escherichia* - на 62%, грибов рода *Penicillium* - на 47%, дрожжей *Saccharomyces* - на 40 %. В среднем снижение числа жизнеспособных прокариотических клеток составило 70,5 %, а эукариотических - 43, 5 %.

УДК 579.24: 577.114.083

**ЭКЗОПОЛИСАХАРИД *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*:
УСЛОВИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И СВОЙСТВА****Н.А. Фокина, Г.Т. Урядова, А.Ю. Тяпкин, С.Ш. Нурмаметова, Л.В. Карпунина***ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова»,
Саратов, Россия*

Микробные экзополисахариды получили широкое применение во многих отраслях деятельности человека [1]. Преимущество бактериальных ЭПС в относительной простоте получения вне зависимости от климатических условий, времен года и других факторов. Потребность в бактериальных ЭПС постоянно возрастает, поэтому изыскание и изучение новых источников ЭПС среди бактерий являются приоритетным направлением микробиологии и биотехнологии.

Изучали экзополисахарид, выделенный из культуры *Streptococcus thermophilus*, полученной из лифилизированной бактериальной закваски термофильного стрептококка (ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», г. Москва). Предварительно было установлено, что для максимального продуцирования ЭПС этой культуры наилучшим источником углерода являлась сахароза, а не глюкоза и лактоза. Поэтому наращивание биомассы проводили на среде А. Welman [2] с сахарозой в течение 24 часов при температуре 38 °С на шейкере –инкубаторе при 180 об/мин. Экзополisahарид выделяли по методу J. Cerning [3] в нашей модификации. Молекулярную массу определяли методом гель-фильтрации [4], которая составила 20000 Да. Кинематическая вязкость 10 % водного раствора экзополисахарида была 1,23 мм²/с. Низкое содержание белка ЭПС *S. thermophilus* (0.003 %), которое определяли по методу М. Bradford [5] свидетельствует о хроматографической чистоте полученного биополимера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Xanthan gum: production, recovery and properties / F. Garcia-Ochoa [et al.] // Biotechnology Advance. – 2000. – V. 18. – P. 549 – 579.
2. Welman, A.D. Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* / A.D. Welman, I. S. Maddox, R. H. Archer // J. Appl. Microbiol. – 2003. – V. 95. – P. 1200 – 1206.
3. Cerning, J. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* / J. Cerning, C. Bouillanne, M.J. Desmazeaud // Biotechnol. Lett. – 1988. – Vol. 10. – P. 255 – 260.
4. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: Наука. – 1985. – 536с.
5. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – V.72, №1. – P. 248 – 254.

УДК 544.65

БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ КЛЕТКАМИ *GLUCONOBACTER OXYDANS* НА СТЕКЛОУГЛЕРОДНЫХ ЭЛЕКТРОДАХ В ПРИСУТСТВИИ МЕДИАТОРОВ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА

Н.М. Носова, В.А. Алферов, Л.Д. Асулян

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» «Естественнонаучный институт», Тула, Россия

Микробные топливные элементы (МТЭ) представляют собой устройства, которые используют микроорганизмы как катализаторы для генерации электричества. Исследование механизма процессов, протекающих на биоанодах, использованных в МТЭ, представляется актуальной задачей, поскольку это может служить фундаментальной основой при создании МТЭ медиаторного типа. В качестве одного из методов исследования данных систем является вольтамперометрия. Целью настоящей работы являлось определение механизма биоэлектрокаталитического окисления глюкозы в присутствии медиаторов переноса электронов.

Циклические вольтамперные зависимости (ЦВА) регистрировали в трёхэлектродной ячейке, содержащей фосфатный буфер, медиаторы переноса электронов (2,6 – дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ) и метиленовый синий (МС)), глюкозу; индикаторный электрод – биоанод; электрод сравнения – хлорсеребряный; вспомогательный – платиновый. Биоанод получали иммобилизацией бактерий *Gluconobacter oxydans* в химически модифицированный N-винилпирролидоном поливиниловый спирт на подготовленный стеклоуглеродный интеркалированный электрод [1]. Электрохимически активными веществами являлись ДХФИФ и МС различной концентрации, ЦВА получены для разных скоростей развёртки потенциала.

Схему и механизм биоэлектрокаталитического окисления глюкозы в присутствии медиаторов электронного транспорта можно представить следующим образом:

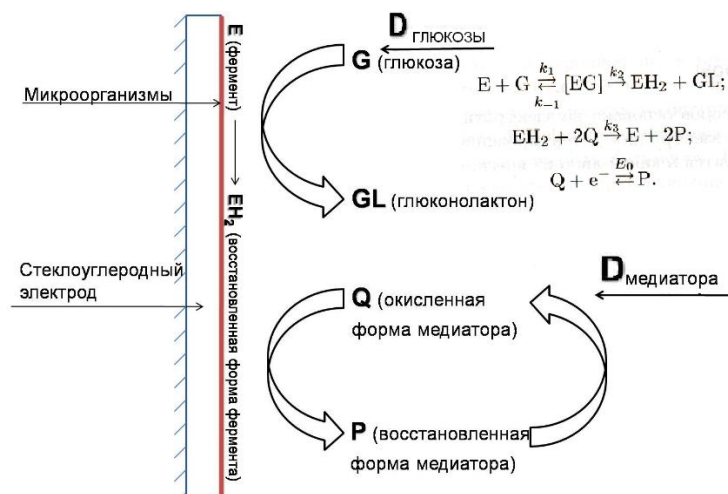


Рисунок 1 - Схема и механизм биоэлектрокаталитического окисления глюкозы на биоаноде с иммобилизованными бактериями *Gluconobacter oxydans*, в присутствии медиаторов переноса электронов.

В ситуации, когда начальная концентрация медиатора низка, а глюкозы высока, кинетическое уравнение биоэлектрокаталитического окисления глюкозы в присутствии медиаторов сводится к псевдопервому порядку. Первая часть уравнения описывает диффузию по закону Фика, а вторая – ферментативную реакцию, соответствующую кинетике Михаэлиса-Ментен [2].

$$\frac{\delta [Q]}{\delta t} = D \left(\frac{\delta^2 [Q]}{\delta x^2} \right) - 2k_3 C_E^0 [Q] \quad (1)$$

C_E^0 - начальная концентрация фермента.

В качестве проверки предложенного механизма биоэлектрокаталитического окисления глюкозы в присутствии медиаторов использовали выражение:

$$\frac{i^l}{i_p^0} = \sqrt{\frac{10 \cdot \kappa_3 \cdot C_E^0}{\nu}} \quad (2)$$

где i^l - предельный ток, генерируемый в системе биоанод – медиатор в присутствии глюкозы, i_p^0 – предельный ток, регистрируемый на ЦВА в системе биоанод – медиатор в отсутствии глюкозы, ν – скорость развёртки потенциала.

Согласно этому уравнению, отношение токов от скорости развёртки потенциала в степени $-1/2$ является прямолинейной зависимостью. Полученные данные, обработанные в соответствующих координатах, представлены на рисунке 2.

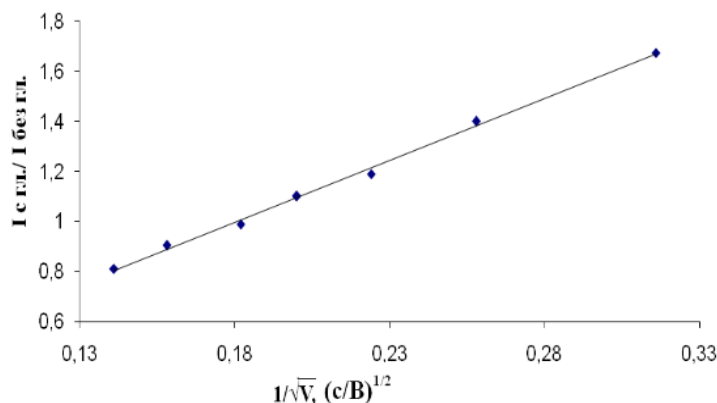


Рисунок 2 - Зависимость i^l/i_p^0 от $1/\sqrt{\nu}$

Таким образом, методом циклической вольтамперометрии доказан предложенный механизм биоэлектрокаталитического окисления глюкозы при участии медиаторов электронного переноса ДХФИФ и МС на биоаноде, в котором целые клетки бактерий иммобилизовали на стеклоуглеродном электроде с помощью поливинилового спирта, модифицированного N – винилпирролидоном.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-03-97514)

ЛИТЕРАТУРА

1. С. В.Алфёров, и др. Биоанод для микробного топливного элемента на основе бактерий *Glucanobacter oxydans*, иммобилизованных в полимерную матрицу, Прикладная биохимия и микробиология, 2014, том 50, № 6, с. 570–577
2. Ф. Миомандр, С. Садки, П. Одебер, Р. Меалле–Рено. Электрохимия, М.: Техносфера, 2008. – 360с.

УДК 577.150

ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVERMYCES MARXIANUS* Y-303

О.С. Корнеева, Т.В. Свиридова, Г.П. Шуваева

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

Гликозидазы, осуществляющие гидролиз олиго- и полисахаридов, находят широкое применение в биотехнологии. Обладая строгой специфичностью действия, они дают возможность получать из сельскохозяйственного сырья продукты с заданными свойствами и высокой биологической ценностью.

В качестве продуцентов гликозидаз используются микроорганизмы различных таксономических групп [1]. Наибольший интерес представляют дрожжи, способные синтезировать высокоактивные гидролитические ферменты, обладающие способностью эффективно гидролизовать олиго- и полисахариды. Нами установлено, что дрожжи *Kluyveromyces marxianus* Y-303 синтезируют β -фруктозидазу, обладающую высокой инвертазной и инулиназной активностью.

В работе представлены результаты исследования по получению высокоочищенного препарата β -фруктозидазы из дрожжей *K. marxianus*, изучению его физико-химических свойств и субстратной специфичности действия.

Дрожжи *K. marxianus* Y-303 выращивали в глубинных условиях на жидкой питательной среде следующего состава, %: пептон – 1,0; дигидрофосфат аммония – 0,8; фруктоза – 2; вода водопроводная; исходная величина pH питательной среды – 6,5; температура 25 °С, продолжительность выращивания – 48 ч. Глубинное культивирование осуществляли в качалочных колбах объемом 500 см³, содержащих по 150 см³ питательной среды. Биомассу клеток отделяли центрифугированием при 4000-4500g в течение 15-20 мин и несколько раз промывали физиологическим раствором и подвергали автолизу при температуре 40 °С в течение 60 ч.

β -Фруктозидазу осаждали 96 % этиловым спиртом при содержании его в смеси 67 % и величине pH автолизата 5,0. Выход фермента по активности составил 95 %. Для получения высокоочищенного препарата использовали следующие стадии очистки: диализ против 20 мМ Трис-HCl-буфера pH 7,4, ионообменную хроматографию на DEAE-сефадексе, гель-хроматографию на TSK-DEAE-5PW и гель-фильтрацию Sephacryl S-200 ("Pharmacia", Швеция), используя набор молекулярно-весовых стандартов. В результате 5 этапов очистки был получен гомогенный препарат со степенью очистки 144,9 раза и выходом по активности 75 %. Удельная активность фермента составила 2720 ед/мг. Методами Ds-Na-ПААГ-электрофореза и гель-фильтрации с использованием набора молекулярно-весовых стандартов установлено, что фермент является димером с молекулярной массой 260 кДа. Среди аминокислот, содержащихся в препарате преобладающими являются аспарагиновая и глютаминовая, что не отличается от известных дрожжевых инвертаз [2].

Изучение физико-химических свойств очищенного препарата β -фруктозидазы показало, что максимальную инвертазную активность 10032 ед/мг фермент проявлял при температуре 50 °С и величине pH 4,0,

инулиназную 1100 ед/мг – при 55 °С и pH 5,0. Наибольшую стабильность фермент проявлял при величине pH 4,0 и температурах 30–40 °С. В процессе кислотной и термической инактивации отношение инулиназной активности (I) фермента к инвертазной (S) не всегда является постоянной величиной.

Субстратную специфичность действия β -фруктозидазы исследовали при температуре 40 °С, в качестве субстратов использовали сахарозу, раффинозу, стахиозу, инулин, леван («SIGMA»). Значения констант Михаэлиса (K_m) и максимальных скоростей гидролиза различных субстратов под действием β -фруктозидазы были определены экспериментально с помощью метода двойных обратных единиц по Лайнуиверу-Берку из графика в координатах $1/S$ и $1/V$. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что β -фруктозидаза *K. marxianus* способна расщеплять как β -2,1, так и β -2,6-фруктозидные связи в олиго- и полисахаридах.

Т а б л и ц а 1

Значения кинетических параметров β -фруктофуранозидазы
K. marxianus Y-303 при гидролизе различных олигофруктозидов

Субстрат	Концентрация субстрата, mM	K_m , mM	V_m , mM/мин на 1 мг белка
Сахароза	0–40	40	142840
Раффиноза	0–30	83,3	100000
Инулин	0–4,0	100	50000
Стахиоза	0–27	28,6	50000
Леван	0–6 мг/см ³	25 мг/см ³	3333

Следует отметить активность β -фруктозидазы *K. marxianus* по отношению к левану, так как многие инулиназы не гидролизуют данный полисахарид [1]. Способность гидролизовать любой субстрат с β -фруктозидной связью не является очевидной особенностью каждой β -фруктозидазы. Известны, например, инвертазы, не способные гидролизовать инулин, и инулиназы, не действующие на сахарозу [3,4].

Из литературы известно, что инулиназой считается фермент, имеющий коэффициент I/S больше 10^{-2} , а инвертазой – меньше 10^{-4} [5]. Наибольшее сродство выделенный нами фермент проявлял по отношению к инулину: K_m к инулину составляла 14,7 mM, а к сахарозе – 29,2 mM, отношение I/S – 0,03. Wang J.H с соавторами [6] изучали инулиназу дрожжей рода *Kluyvermyces*, имеющую K_m по инулину и сахарозе 13,3 и 62,6 mM соответственно, отношение I/S – 0,04.

Анализ литературных данных показал [1–8], что для истинных инулиназ K_m к инулину в основном меньше 1 mM, K_m известных инвертаз по сахарозе варьирует от 2 до 67 mM. Для β -фруктозидазы *K. marxianus* Y-303 величина K_m по сахарозе сопоставима с литературными данными, к инулину – превышает известные [5–8]. Кроме того, данный фермент имеет высокую молекулярную массу, характерную для инвертаз [2].

Чтобы отличить инулиназу от инвертазы используют другой критерий – отношение констант k_{cat}/K_m : если деление значения k_{cat}/K_m при гидролизе ферментом инулина на значение k_{cat}/K_m при расщеплении сахарозы дает число меньше 1, то фермент считается инвертазой, если больше 1 – инулиназой [5]. Для β -фруктозидазы *K. marxianus* Y-303 данное значение меньше единицы и равно 0,14. Таким образом, выделенная нами дрожжевая β -фруктозидаза относится к инвертазам (К.Ф. 3.2.1.26) с низкой специфичность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jedrzejczak-Krzepkowska M.1., Kalinowska H., Bielecki S. *Postepy Biochem.*, 2011, vol. 57, no 4, pp. 401–410.
2. Linde D1, Macias I, Fernández-Arrojo L, Plou FJ, Jiménez A, Fernández-Lobato M. *Appl Environ Microbiol.*, 2009, Feb; vol. 75, no 4, pp. 1065–1073.
3. Goosen C.1., Yuan X.L., van Munster J.M., Ram A.F., van der Maarel M.J., Dijkhuizen L. *Eukaryot Cell.*, 2007, vol. 6, no 4, pp. 674–681.
4. Schorr-Galindo S, Ghommidh C, Guiraud J.P., *Curr. Microbiol.*, 2000, vol. 41, pp. 89–95.
5. Артюхов В.Г., Холявка М.Г., Ковалева Т.А. *Вестник биотехнологии и физико-химический биологии имени Ю.А. Овчинникова*, 2013, Т. 2, с. 67–77.
6. Wang, J.H., Liu, Y.Y., Yao, B., Wang, Y.R. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2000, vol. 1, pp. 60–64.
7. Singh, P., Gill, P.K. *Food Technol. Biotechnol.*, 2006, vol. 2, pp. 151–162.
8. Kulminskaya A., Arand M., Eneyskaya E., Shabalin K., Korneeva O., Neustroev K. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 2003, vol. 1650, pp. 1582–1591.

**ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ИНТЕНСИВНОЙ КУЛЬТУРЫ ДИАТОМОВОЙ
ВОДОРΟΣЛИ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN –
ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБЪЕКТА БИОТЕХНОЛОГИЙ**

С.Н. Железнова, Р.Г. Геворгиз, Н.И. Бобко, А.С. Лелеков

ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

Диатомовые водоросли являются перспективным источником биологически активных веществ, таких как полиненасыщенные жирные кислоты, полисахариды, витамины, каротиноиды и др. Среди многих видов диатомовых водорослей особый интерес в последнее время представляет *C. closterium*, поскольку обладает рядом уникальных свойств: содержание фукоксантина достигает 78 % от общего количества каротиноидов (Peng et al., 2011), что в пересчете на сухую массу составляет 1,7 %; содержание жирных кислот достигает 40 %, из них от общего содержания жирных кислот 22 % полиненасыщенные жирные кислоты (Dunstan et al., 1994).

Для культивирования *C. closterium* традиционно используют питательную среду F (Guillard et al., 1963, Affan, 2009, Brouwer et al., 2002). Питательная среда F является обедненной по многим биогенным элементам, поэтому максимальная плотность культуры *C. closterium* достигает $7,2 \pm 0,02 \cdot 10^4$ клеток на 1 мл (Affan, 2009), что по нашим данным примерно составляет 0,1 – 0,2 г/л. Поэтому использование питательной среды F не дает возможности получать и исследовать плотные культуры *C. closterium* в лабораторных условиях. В литературе практически отсутствуют сведения о потребностях *C. closterium* в таких биогенных элементах как азот, фосфор и др. Также в литературе не встречаются питательные среды для интенсивной культуры *C. closterium*.

Цель работы – на основе экспериментально определенных величин потребности в азоте, в фосфоре и кремнии разработать новую питательную среду для *C. closterium* и исследовать продукционные характеристики в плотной накопительной культуре.

В работе использовали диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium* (EhrenbERG) Reimann et Lewin из коллекции культур микроводорослей Л. А. Ланской (ИнБЮМ, г. Севастополь).

Культуру *C. closterium* выращивали при постоянной температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$, в режиме накопительного культивирования в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объемом 2 л, слоем 5 см, при круглосуточном освещении лампами ЛБ-40 (средняя освещенность рабочей поверхности – 13,25 клк). В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (0,5 л воздуха на 1 л культуры) посредством компрессорной установки. Эксперименты проводили при pH = 8 – 9 (Pedersen, 2003).

Плотность культуры определяли прямым взвешиванием сырой биомассы *C. closterium* в полипропиленовых пробирках на аналитических весах (CAUY-120 с абсолютной погрешностью 1 мг) после осаждения клеток центрифугированием (3000 об/мин в течение 2-х минут). Для пересчета полученных данных на сухую массу использовали экспериментальный коэффициент связи между сухой и сырой биомассой ($k = 0,1$). Для определения сухой массы водорослей навески высушивали до постоянного веса в течение 24 ч при 105°C (Сиренко и др., 1975).

Долю азота и фосфора в биомассе *C. closterium* определяли посредством стандартных гидрохимических методов (Методы ..., 1988) после сжигания биомассы в муфельной печи ($550 \pm 25^\circ\text{C}$). Массовую долю железа определяли методом, описанном в работе (Шарль, 1965). Для определения доли кремния в биомассе использовали метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии.

Для выявления величин потребностей *C. closterium* в азоте, фосфоре и кремнии при накопительном культивировании был проведен химический анализ биомассы (см. табл. 1). Затем, учитывая соотношение долей азота, фосфора и кремния в биомассе *C. closterium* была составлена питательная среда (RS), которая использовалась для экспериментальной оценки потребностей *C. closterium* в азоте, фосфоре и кремнии. Для этой цели, последовательно лимитируя рост плотности культуры (Liebig, 1847), исследуемыми биогенными элементами при учёте начальной концентрации в питательной среде и инокуляте, а также величины максимальной плотности накопительной культуры в стационарной фазе роста были рассчитаны величины потребности *C. closterium* для единицы биомассы.

Химический состав диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*

Макро элементы	Содержание в биомассе, г·кг ⁻¹	Микро элементы	Содержание в биомассе, мг·кг ⁻¹
Кремний	38,20±0,01	Кобальт	11,00±1,11
Азот	64±0,10	Марганец	75,00±2,75
Фосфор	16,6±0,10	Цинк	75,0±6,20
Железо	45±0,02	Медь	30,00±1,98

На основе анализа проведённых экспериментов мы пришли к выводу о том, что для кремния и фосфора истинная и наблюдаемая потребности совпадают.

По результатам экспериментов для азота истинная и наблюдаемые потребности не совпадали, поскольку для биосинтеза единицы биомассы наблюдалось некоторое избыточное потребление азота. Величина потерь азота в накопительной культуре *C. closterium* в разных экспериментах не оставалась постоянной, в среднем, как и у других видов водорослей (Дробецкая, 2005), потери составляли 10%.

В культуральной среде азот может находиться в органической форме вследствие биосинтеза экзопродуктов (Staats et al., 1999) или в неорганической в результате деятельности сопутствующей микрофлоры (Дробецкая, 2005, Лелеков, 2009). По нашим в культуральной среде в стационарной фазе роста *C. closterium* органический азот составляет 64% от валового. Такая же ситуация наблюдается и при культивировании других видов микроводорослей (Дробецкая, 2005).

В отличие от кремния и фосфора в культуре *C. closterium* азот, по-видимому, является невозвратным субстратом, либо время его повторного вовлечения в биосинтетические пути велико. Это утверждение основано на том, что при лимитировании роста *C. closterium* азотом продолжительность стационарной фазы роста мала, наблюдается агглютинация клеток (рисунок 1).

В таблице 2 приведён состав питательной среды RS в расчёте на максимальную плотность 1 г сухой биомассы *C. closterium*. В наших экспериментах при пропорциональном увеличении концентраций биогенных элементов в питательной среде плотность культуры достигала 5 г/л. Пример накопительной кривой роста на концентрированной питательной среде (5RS) представлен на рисунке 1.

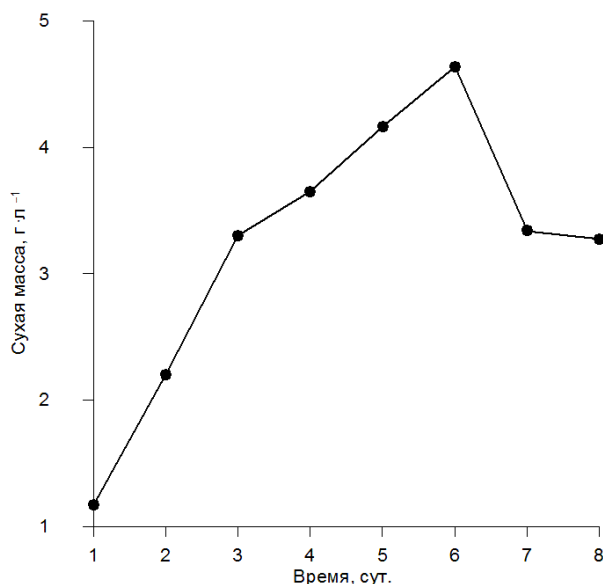


Рисунок 1 - Динамика плотности культуры *C. closterium* при пятикратном увеличении концентрации биогенных элементов питательной среды RS. Максимальная плотность культуры 4,6 г/л. Максимальная продуктивность 1 г/(л × сут).

Состав питательной среды RS.

Компонент	Навеска, г·л ⁻¹
1. NaNO ₃	0,388
2. NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	0,041
3. Na ₂ SiO ₃ × 9H ₂ O	0,386
4. Na ₂ EDTA	0,872
5. FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,005
6. CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0002
7. ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,00044
8. CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,0002
9. MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,00036
10. NaMoO ₄ × H ₂ O	0,00012

Анализ накопительной кривой роста, представленной на рисунке 1 показал, что максимальная продуктивность культуры *C. closterium* наблюдалась в первые трое суток эксперимента и составляла 1 г·л⁻¹·сут⁻¹. Затем продуктивность снижалась до 0,45 г·л⁻¹·сут⁻¹ вследствие светового лимитирования роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дробецкая И.В. Влияние условий минерального питания на рост и химический состав *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl.: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 2005. – 28 с.
2. Лелеков А.С. Моделирование роста и биосинтеза морских микроводорослей в квазинепрерывной культуре: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 2009. – 26 с.
3. Метод IP 470/03. Определение алюминия, кремния, ванадия, никеля, железа, кальция, цинка и натрия в остаточных топливах озолением, сплавлением и атомно-абсорбционной спектроскопией // Сборник методик IP. – 2003 г. – 2003. – С. 12.
4. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов - М.: ВНИРО, 1988. - 119 с.
5. Шарло Г. Методы аналитической химии. Полный анализ неорганической химии // Пер. с франц. под ред. проф. Лурье Ю.Ю. – М.: Химия, 1965. – 350 с.
6. Affan A., Neo S.-J., Jeon Y.-J., Lee J.-B. Optimal growth conditions and antioxidative activities of *Cylindrotheca closterium* // J. Phycol. - 2009. - Vol. 45. - P. 1405-1415.
7. Bertrand M. Carotenoid biosynthesis in diatoms // Photosynth. Res. – 2010. – Vol. 106. - P. 89–102.
8. Brouwer J.F.C., Stal L.J. Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) // J. Phycol. – 2002. – Vol. 38. - P. 464 – 472.
9. Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M. et al. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae) // Phytochemistry. - 1994. - Vol. 35. - P. 155-161.
10. Gullard R., Ryther J. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* Cleve // Can. J. Microbiol. - 1963. - Vol. 8. - P. 22.
11. Kingston M.B. Growth and motility of the diatom *Cylindrotheca closterium*: implications for commercial applications // J. North/ Carolina Academy Sci. - 2009. - Vol. 125. - P. 138-142.
12. Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., Wang J.-H. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health // Mar. Drugs. - 2011. - Vol. 9.- P. 1806-1828.
13. Serrazanetti G.P., Folicaldi A., Guerrini F., Monti G., Pistocchi Staats N., de Winder B., Stal L.J., Mur L.R. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum* // Eur. J. Phycol. – 1999. - Vol. 34. - P. 161 – 169.

Секция 3. Биоинженерия и биоинформатика. Бионанотехнологии

УДК 66.047

STDY OF IMMOBILIZATION OF LIPASE ON MAGNETIC NANOPARTICLES Fe_3O_4 IN THE BIODIESEL PRODUCTION

Bui Xuan Dong¹, Cao Xuan Huu², Nguyen Thi Hoang Yen²

¹*Danang university of science and technology,*

²*The University of Danang, Danang city, Vietnam*

1. Introduction

Surimi is a form of protein product that is made from fresh fish by removing head, intestine, washing and separating mechanically eatable pulp parts out of the skin and bones. After the pulp is ground, it is washed, purified, separated water and lipid, mixed with other food ingredients and processed into simulation products [1]. Currently, Danang (Vietnam) has many plants that process surimi products to meet domestic and export demand. In the manufacturing process, lipid must be completely separated from surimi because technically requirement. The lipid that is discarded will go into the wastewater treatment system of the plant and is quickly hydrolyzed and is rancid; as a result, it is unable to be used as food for human or feed for animal.

A promising direction is to utilize lipid in surimi wastewater to produce biodiesel. In this study, the authors aim at identifying quality norm of lipid in surimi wastewater, and producing immobile enzyme lipase that uses Fe_3O_4 nano-particles used to perform transesterification in the process of biodiesel manufacturing from aforementioned lipid materials.

2. Materials and methods

Lipid materials are sampled at BacDau limited liability company (Danang city) and stored at a temperature of 5°C ($t=5^\circ\text{C}$) to serve related experiments.

Chitosan, Fe_3O_4 nanoparticles are manufactured at the Laboratory of Biotechnology - Danang university of science and technology: Chitosan is produced from dried shrimp shells that are ground by chemical methods [2]; Fe_3O_4 nanoparticles are prepared from $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ salt solution with appropriate concentration and $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+} = 2:1$ rate equals 2/1 ($\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+} = 2:1$). The solution is stirred for 600 rev / min for 30 minutes at room temperature. Drop 1M NaOH solution slowly until pH=10, then stop. Reaction continues to be carried out at a temperature of 80°C for 30 minutes [3]. After that, centrifuge the solution at a temperature of 25°C ($t=25^\circ\text{C}$) with the speed of 3000 rev / min for 15 minutes, remove liquid part and collect residue. The residue is quickly dried at a temperature of 80°C and kept in a vacuum environment.

The " Fe_3O_4 -chitosan" is synthesized by dissolving 0.5 g of chitosan in 50 ml of 0.2 M acetic acid, stirring mixture vigorously for 30 minutes at room temperature. Then adding 3g Fe_3O_4 into solution mixture, continuing to stir for 1 hour. The Fe_3O_4 -chitosan that is collected is strong magnetic and freeze-dried [3].

Lipase enzyme is immobile on magnetic " Fe_3O_4 -chitosan" microparticles. The process is done through aldehyde (glutaraldehyde) bridge. Lipase enzyme that has amine group ($-\text{NH}_2$) can create crosslinking with one end of aldehyde of glutaraldehyde and the remaining aldehyde will link with the amine group ($-\text{NH}_2$) of " Fe_3O_4 -chitosan" microparticles.

Determinating the ability to bind of lipase to Fe_3O_4 -chitosan" particle by measuring concentration of remaining protein (free lipase enzyme) in the reaction mixture by Bradford method after splitting " Fe_3O_4 -chitosan-lipase" enzyme.

3. Conclusions

3.1. Results of monitoring lipid quality collected from the surimi wastewater

The indicators which are used for evaluating lipid quality include acid value, saponification indicator, esterification indicator, iodine number and they are determined by titration method [4]. Results are presented in Table 1.

The data in Table 1 shows that acid value and saponification indicator are high, comparing them with the reference in SanPin 2.3.2.1087.01 [5], we can see that lipid collected from surimi wastewater is not suitable for use as food for human or feed for animal. In contrast, acid value and Iodine number are high that may facilitate the implementation of transesterification in biodiesel production.

Table 1

Indicators of lipid quality collected from the surimi wastewater

Indicators	Result	Unit
Acid value (A_x)	12,53	mgKOH/g
Saponification indicator (xP)	21,04	mgKOH/g
Esterification indicator (E_s)	8,51	mgKOH/g
Iodin number (I_v)	30,32	gI ₂ /100g

3.2. Results of Fe_3O_4 particles manufacture and surveys of its magnetic properties.

After Fe_3O_4 is manufactured, it is diffractive X-ray in XRD-D5005-Bruker (Germany) diffraction equipment at the Institute materials sciences academy of science-and technology Vietnam (Vietnam), using X-ray wavelength from K- α radiation of Cu is: $\lambda_{Cu}=1,54056 \text{ \AA}$ (see Figure 1). Results of Figure 1 show that the diffraction peaks that correspond to the surfaces (440), (333), (422), (400), (220), (311) are separated clearly. From that result, it is concluded that the main composition of analysis sample is Fe_3O_4 .

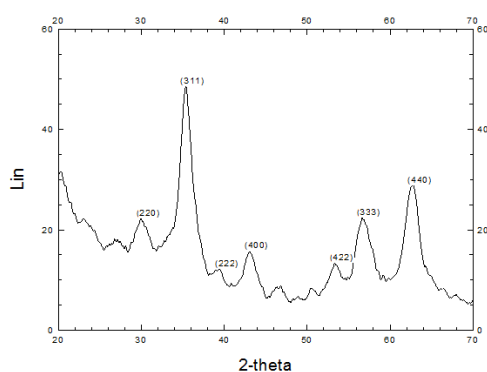


Figure 1 - X-ray diffraction of Fe_3O_4

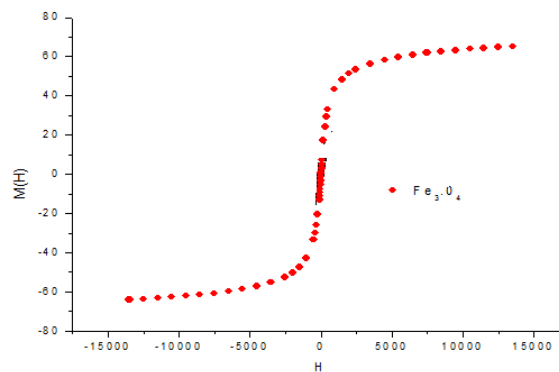


Figure 2 - Magnetic curve of Fe_3O_4

To determine magnetism of Fe_3O_4 nanoparticles, the authors has used vibrating magnetometer -VSM. Measurement results are presented in Figure 2. that The Fe_3O_4 sample has $MH = 65 \text{ (emu/g)}$, $H_c = 4.12 \text{ (oe)}$. The results show that Fe_3O_4 particles have super-paramagnetic properties. After Fe_3O_4 nanoparticles are covered with chitosan (chitosan- Fe_3O_4) with $M(H) = 40.8 \text{ (emu)}$, $H_c = 1.3 \text{ (oe)}$, they are also super-paramagnetic properties. The survey has important significant when collecting enzyme for reuse after enzymatic reactions based on paramagnetic properties.

3.3. Results of lipase enzyme attachment on " Fe_3O_4 -chitosan".

Ability to attach enzyme lipase on " Fe_3O_4 -chitosan" particle are indirectly evaluated through the concentration difference of protein (enzyme) in the reaction mixture of enzyme attachment before and after reaction between " Fe_3O_4 -chitosan" and lipase through glutaraldehyde linking bridge for 3 hours at a temperature of 35°C and $pH = 5$. Protein content is determined by Bradford method based on color reaction with Coomassie Brilliant Blue G-250. The results show that the ability to attach enzyme lipase on " Fe_3O_4 -chitosan" particle is 72.5- 80.2% in comparison with the original free enzyme.

The catalysis activity of " Fe_3O_4 -chitosan-lipase" immobile enzyme is determined by the improvement Ota-Yamuda method [6]. The results showed that the activity of " Fe_3O_4 -chitosan-lipase" enzyme reduce by 25-30% in comparison with the initial free enzyme lipase activity which has experimented on olive oil substrate, the determined value is 80-83 units / mg enzyme.

4. Results and discussion

In this study the authors have successfully made Fe_3O_4 -chitosan-lipase bycreating horizontalcovalent bonds, immobile enzyme that operates about 80-83 units / mg enzyme. The authors will conduct the next investigation into catalysis of immobile enzyme lipase on the lipid substrate collected from lipid surimi wastewater, and strive to produce biodiesel.

REFERENCES

1. TCVN 7265: 2009: CAC RCP 52 2003 Rev 4 2008 (Vietnam standard)
2. Немцев С.В. Материалы III Всесоюз. конф. «Совершенствование производства хитина и хитозана из панцирьсодержащих отходов криля и пути их использования». М.: ВНИРО, 1992, с. 7-15.

3. Pham Xuan Nui, Nguyen Ngoc Son, Le Thi Cuc. Synthesis and characterization of lipase enzyme immobilized on magnetic nanoparticles for application in the trans-esterification of soybean oil to biodiesel. PETROVI-ETNAM Journal, Vol. 11/2013, p. 37-42
4. TCVN 6127:1996 (ISO 660: 1983). Animal and vegetable fats and oils - Determination of acid value and of acidity (Vietnam standard)
5. СанПиН 2.3.2.1078-01: Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы/ гигиенические требования безопасности пищевой ценности пищевых продуктов (УДК 614.4(470)(083.131.)
6. Демьянцева Е.Ю., Копнина Р.А. Ферментативный катализ в ЦБП: учебно - методическое пособие/СПбГТУРП. СПб., 2014. – 47 с.

УДК 579.66

БИОСИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ СУЛЬФИДА СЕРЕБРА МИКРОСКОПИЧЕСКИМИ ГРИБАМИ

Т.А. Воейкова¹, И.Н. Крестьянова¹, Л.Ф. Сахибгараева¹,
А.С. Шебанова², Т.Т. Исмагулова², С.В. Яроцкий¹

¹ФГУП «ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

В настоящее время активно проводятся исследования, направленные на изучение процессов получения наночастиц металлов и их солей методом биосинтеза с использованием микроорганизмов. Биологический метод получения наночастиц осуществляется при нормальной температуре, давлении и без использования токсичных веществ, что выгодно отличает биотехнологические методы от физико-химических способов получения наночастиц. Объектами исследований по биосинтезу наночастиц являются бактерии, грибы и микроводоросли, так как они обладают природной способностью восстанавливать и окислять ряд различных субстратов и легко культивируются в промышленных масштабах. Микроскопические грибы являются хорошими кандидатами на применение их в реакциях биосинтеза наночастиц. Это объясняется их высокой природной устойчивостью к солям тяжелых металлов и возможностью выдерживать значительные концентрации солей без снижения жизнеспособности клеток.

В настоящей работе проанализирована представительная коллекция микроскопических грибов, продуцентов ксиланглюканаза, по способности к образованию наночастиц сульфида серебра (Ag_2S) методом микробиологического синтеза. Интерес к получению наночастиц Ag_2S связан с его полупроводниковыми свойствами, химической стабильностью и низкой токсичностью по отношению к живым организмам. Ag_2S широко используется в оптоэлектронных устройствах, особенно в форме нанокристаллов и квантовых точек. Перспективно применение Ag_2S как квантовых точек в медицине для визуализации сосудов и тканей.

Штаммы были предоставлены Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (ВКПМ). На способность к образованию наночастиц исследованы следующие представители микроскопических грибов: *Acremonium murorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium sambucinum*, *Sporotrichum thermophile*, *Thielavia terrestris* 144, *Thielavia terrestris* 244, *Trichoderma longibrachiatum*. Образование наночастиц Ag_2S в миллимолярном растворе солей азотнокислого серебра (AgNO_3) и тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) происходило в присутствии вышеуказанных штаммов. Показано, что все исследуемые штаммы с различной эффективностью образуют наночастицы Ag_2S в двухкомпонентной системе солей. Размеры наночастиц варьируют от 5 до 20 нм. Форма наночастиц, в основном, сферическая. Наночастицы стабильны в водных суспензиях в течение нескольких месяцев. Установлено, что эффективность образования наночастиц зависит от состава жидких питательных сред, используемых для выращивания мицелиальной биомассы штаммов. Состав сред должен обеспечивать интенсивный рост мицелия, при этом уровень синтеза ксиланглюканаза на данных средах может значительно снижаться. Подобраны оптимальные составы сред для культивирования штаммов, обеспечивающие эффективный синтез наночастиц. Для ряда термофильных штаммов показана зависимость эффективности образования наночастиц от температуры инкубации мицелия в реакционном растворе солей. Показано, что наиболее эффективно образование наночастиц Ag_2S происходит при использовании штаммов *Fusarium avenaceum*, *Fusarium sambucinum*, *Sporotrichum thermophile*.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-00220) и Программы Президиума РАН (№ 24).

СУПЕРКОМПЬЮТЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ МУТАНТОВ ЛИПАЗ

М.С. Кондратьев, А.В. Кабанов

ООО «Биодизайн», Московская область, Пушкино, Россия

В процессе хозяйственной деятельности человека, а также в ходе реализации производственных циклов на предприятиях многих отраслей промышленности постоянно образуются различные формы загрязнителей липидной природы (жиры, масла - в том числе отработанные), которые чрезвычайно трудно поддаются естественному разложению. Между тем, многие живые системы обладают биокатализаторами (ферментами-липазами), которые отвечают за эффективное расщепление жиров. Ферментативный лизис имеет несомненные преимущества по сравнению с химическим разложением; такие технологии могут находить применение в целом ряде отраслей – химической (производство стиральных порошков), текстильной, пищевой, а также в медицине. Однако массовому внедрению липаз мешает их высокая стоимость и «капризность» ферментов в условиях повышенных температур, которые сопровождают многие технологические процессы. Именно поэтому внедрение биоинженерных, модифицированных ферментов, лишенных многих недостатков своих природных аналогов, открывает путь к повышению эффективности расщепления жиров и удаления отходов на производствах, а также к существенной экономии средств (например, при сокращении расходов на охлаждение оборудования, где за счет повышения температуры происходит ускорение процесса расщепления жиров). В настоящее время проблема глубокого изучения свойств нативных и иммобилизованных препаратов липолитических ферментов и разработка научно-обоснованных подходов к их применению является актуальной в теоретическом и практическом отношении.

В нашей работе при помощи современных методов высокопроизводительных вычислений изучены стабильность и конформационная динамика бактериального фермента-липазы LipA, его мутантов, а также близкого гомолога, фермента CLE, субстратом которого являются пластмассы на основе полимолочной кислоты. Методика увеличения термостабильности малых глобулярных белков, на которой основывается данное исследование, была разработана в нашей лаборатории [Khechinashvili et al.] и активно развивается на мощностях основанного нами малого предприятия. В 2010-15 гг. достоверность методики была улучшена при помощи наиболее современных методов вычислительной химии, основанных на распределенных вычислениях по технологии CUDA [Kondratyev et al.]. В результате анализа результатов молекулярной динамики нативных липаз и их мутантов нами определены аминокислотные остатки, точечные замены которых могут заметно повысить термостабильность изучаемых ферментов, не ухудшив при этом их активность. Сейчас метод реализован в виде программного продукта и активно калибруется – для направленного мутагенеза практически любого малого глобулярного белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kondratyev M., Kabanov A., Samchenko A., Komarov V., Khechinashvili N. «Computer-Aided Pathway to Increasing the Thermostability of Small Proteins». J. Biomol. Struct. & Dyn. 28 (6). 1021-1023. (2011).
2. Кондратьев М.С., Кабанов А.В., Комаров В.М., Хечинашвили Н.Н., Самченко А.А. «Опыт моделирования структурно-динамических особенностей малых белков с помощью настольных суперкомпьютеров». Биофизика. Т.56 (6). 1045-1052 (2011).
3. Кондратьев М.С., Теплухин А.В. «Высокопроизводительные вычисления в биоинженерии». В книге «Суперкомпьютерные технологии в науке, образовании и промышленности». М: Изд-во МГУ. Стр.194-198. (2010).
4. Khechinashvili N.N., Kabanov A.V., Kondratyev M.S., Polozov R.V. The entropic nature of protein thermal stabilization // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2014. — Vol. 32, — № 9. — P. 1396-1405.
5. Кондратьев М.С., Кабанов А.В., Самченко А.А., Комаров В.М., Хечинашвили Н.Н. Использование высокопроизводительных вычислений в задачах повышения термостабильности антиоксидантных ферментов // ВЕСТНИК МГТУ СТАНКИН — г. Москва, — 2014. — С. 106-110.

БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ: ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

В настоящее время прогресс в развитии науки, техники, здравоохранения, экологии и других сфер человеческой деятельности не представляется возможным без внедрения в них нанотехнологических разработок.

Нанотехнологии — технологии, направленные на создание и использование нанообъектов и наносистем с заданными свойствами и характеристиками, размеры компонентов которых не превышают 100 нм. Бионанотехнологии (нанобиотехнологии, биомедицинские технологии) — междисциплинарная область естественных наук, которая изучает принципы создания и механизмы функционирования биологических наноразмерных систем с целью применения в биотехнологии, медицине, промышленности, а также воздействие наноматериалов и наноструктур на биологические объекты и процессы. Сферой применения нанотехнологий в практической медицине является наномедицина. Наномедицина занимается разработкой методов диагностики, контроля, адресной доставки лекарств, восстановления и реконструкции систем организма человека с использованием наноструктур и наноустройств.

Наиболее важными направлениями бионанотехнологии и наномедицины являются создание новых наноразмерных лекарственных средств и разработка систем адресной доставки лекарств, методов молекулярной визуализации на основе наночастиц, систем диагностики *in vitro* и *in vivo*, нанотехнологических методов терапевтического и хирургического назначения, тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Нанотехнологии в настоящее время в основном представлены наночастицами и наноматериалами, содержащими наночастицы. Наночастицы определяются как объекты или устройства, размеры которых, по крайней мере, в двух измерениях лежат на наномасштабе (как правило, менее 10 нм), и которые обнаруживают новые свойства, физические, химические или биологические, либо изменяют свойства макроматериалов вследствие своего размера. Свойства вещества на наномасштабе отличаются от свойств макроматериалов вследствие проявления квантовых эффектов и огромных значений соотношения площади поверхности частиц к единице объема материала.

В основе создания современных терапевтических и диагностических средств лежит использование наночастиц, на основе которых создаются «мультифункциональные системы», включающие лекарственные вещества, средства визуализации очагов патологии и компоненты, обеспечивающие эффективную доставку наночастиц в клетки — и ткани — мишени. Наиболее важные свойства наночастиц для их биомедицинского применения: малые размеры (1—100 нм), высокая удельная поверхность, наличие большого числа функциональных групп на поверхности, избыточная свободная поверхностная энергия, высокие величины напряженности электростатического поля у поверхности.

Использование наночастиц в качестве платформ для создания терапевтических и диагностических средств позволяет направлять доставку лекарственного вещества в очаги патологии, подбирать оптимальную дозу препарата, пролонгировать его действие, применять нерастворимые в воде препараты, препараты с низкой биодоступностью, нестабильные и токсичные соединения.

В настоящее время основными направлениями исследований, связанных с разработкой лечебно-диагностических средств на основе наночастиц и их медицинским применением, является создание препаратов для диагностики и терапии вирусных и онкологических заболеваний человека.

Активная доставка или адресация терапевтических и диагностических средств на основе наночастиц к клеткам — и тканям — мишеням обеспечивается путем присоединения к наночастицам «молекулярного адреса» (лиганда), связывающегося со специфическими рецепторами целевых клеток (активное нацеливание), либо путем использования модифицированных наночастиц, чувствительных к действию химических и физических факторов — pH, температуре, свету, ультразвуку, магнитному полю (внешнее нацеливание).

Под термином «функционализация наночастиц» понимают присоединение к ним лекарственных соединений, средств визуализации очагов патологии, агентов, препятствующих опсонизации наночастиц и их элиминации компонентами крови (биосовместимых гидрофильных полимеров), лигандов,

взаимодействующих с рецепторами клеток—мишеней (антител, пептидов, аптамеров, углеводных остатков, олигонуклеотидов, витаминов).

Основные типы наночастиц, использующихся для биомедицинского применения: липосомы, вирусные наночастицы, собственно наночастицы (наносферы и нанокapsулы), дендримеры, наночастицы на основе неорганических веществ, углеродные наночастицы.

Липосомы— однослойные или многослойные везикулы (пузырьки) с внутренней полостью, ограниченные двуслойной липидной мембраной. Созданы pH-чувствительные, термочувствительные, светочувствительные липосомы, эхолипосомы, магнитолипосомы, освобождающие капсулированные лекарственные препараты и биологически активные вещества в условиях изменения уровня pH, температуры, действия УФ- и видимого света, ультразвука, магнитного поля. Иммунолипосомы получают путем конъюгации липосом с моноклональными антителами или их фрагментами для обеспечения адресной доставки к клеткам—мишеням.

Вирусные наночастицы — белковые структуры, сформированные на основе вирусных капсидов. Вирусные наночастицы могут быть представлены непосредственно вирусными наночастицами, содержащими молекулы нуклеиновой кислоты и способными к инфицированию, и вирусоподобными частицами, представляющими собой вирусный капсид и не способными к инфицированию. Вирусные наночастицы имеют одинаковые размеры, способны к самосборке в гомо— и гетерологичных системах, стабильны, устойчивы к действию физико-химических факторов, могут быть «функционализированы» путем генетических и химических модификаций внешней и внутренней поверхностей вирусного капсида, поверхностей субъединиц капсида в области их контактов.

Собственно, наночастицы — твердые коллоидные частицы диаметром менее 1 мкм, которые имеют вид наносфер или нанокapsул, образованные природными и синтетическими полимерами, липидами, белками, неорганическими соединениями.

Дендримеры — наночастицы с контролируемыми размерами от 1,1 нм, представляющие собой синтетические полимеры со строго регулируемым расходящимися в стороны от центрального ядра ветвями мономерных субъединиц.

Неорганические наночастицы используются в диагностике для визуализации и маркирования патологических очагов в организме. Квантовые точки — неорганические полупроводниковые наночастицы, флуоресцирующие в широком диапазоне длин волн в зависимости от размеров частицы. Широкое применение получили наночастицы на основе оксидов железа, обладающие суперпарамагнитными свойствами и использующиеся для диагностики и терапии опухолей. Золотые наночастицы применяются для диагностики, лучевой терапии, химиотерапии, гипертермии, фотодинамической терапии опухолей. Наночастицы серебра, оказывающие бактерицидное, фунгицидное, противовирусное действие, используются в медицине в виде покрытий имплантируемых устройств, дезинфицирующих фильтров.

Фуллерены — каркасные углеродные структуры, молекула которых имеет вид замкнутой системы атомов, образованных сочетанием пятичленных и шестичленных циклов. Углеродные нанотрубки — каркасные цилиндрические однослойные (одностенные) или многослойные (многостенные) углеродные структуры, имеющие вид полых замкнутых оболочек, диаметром от одного до нескольких десятков нанометров и длиной от одного микрометра до нескольких миллиметров. На основе фуллеренов разрабатываются средства для рентгенодиагностики и магнитно-резонансной томографии, терапии опухолевых заболеваний. Углеродные нанотрубки, обладающие высокой механической прочностью, гибкостью, биосовместимостью, способностью обеспечивать направленный рост и стимуляцию клеток, перспективны в тканевой инженерии в качестве каркасного материала и создания биодеградируемых имплантов при регенерации тканей.

Для выяснения механизмов лечебно-диагностического действия наносомальных медицинских средств необходимо исследовать процессы поступления, распределения, выведения наночастиц в организме, особенности их взаимодействий с биомолекулами и клеточными структурами.

Наночастицы в основном поступают в организм через кожу, дыхательную систему, желудочно-кишечный тракт. Распределение наночастиц в организме зависит от их гидродинамического размера, поверхностного заряда, типа материала, из которого они изготовлены.

В биологической среде на поверхности наночастиц может образоваться «корона», состоящая из биомакромолекул, преимущественно белков, которая влияет на физические свойства, взаимодействие с клетками—мишенями и биологические эффекты наночастиц.

Наночастицы могут проникать в клетки в основном по механизму эндоцитоза, путем диффузии,

через дефекты в плазматической мембране. Механизмы проникновения наночастиц в клетки зависят от свойств наночастиц (заряда, размера, формы, способности к агрегации), особенностей клеток (наличия специализированных структур, обеспечивающих тот или иной тип захвата частиц), микроокружения наночастиц (наличия компонентов, модифицирующих поверхность наночастиц).

Наночастицы способны инициировать повреждения плазматических и внутриклеточных мембран, пролиферацию клеток, нарушения клеточного цикла, цитоскелета клеток, структурно-функциональных свойств белков и нуклеиновых кислот, изменения интенсивности метаболических процессов, функционирования сигнал-трансдукторных систем клетки, уровня экспрессии генов, запускать апоптотический и некротический типы гибели клеток. В основе токсических эффектов действия наночастиц на клетки лежат генерация свободных радикалов, растворение и высвобождение токсичных ионов вещества наночастицы.

Наночастицы способны аккумулироваться в окружающей среде и пищевых цепях, изменять процессы жизнедеятельности различных организмов.

Эти обстоятельства обуславливают необходимость проведения комплексных исследований, направленных на выявление механизмов действия наночастиц на биологические объекты различного уровня организации, их биодоступности и биобезопасности, оценки возможных экологических и биологических рисков для каждого типа наночастиц.

Биомедицинское использование наночастиц невозможно без решения целого ряда проблем, связанных со стандартизацией медицинских препаратов на основе наночастиц, их токсичностью, эффективностью доставки к клеткам-мишеням, сопоставимостью экспериментальных данных, полученных в условиях *in vitro* (в том числе на клеточных линиях), на уровень целого организма.

Итак, не вызывает сомнений тот факт, что наночастицы являются перспективной основой создания современных диагностических и терапевтических препаратов для лечения социально значимых патологий человека. Однако в настоящее время это интенсивно развивающееся направление бионанотехнологических разработок находится в основном на этапе исследования биологических свойств различных типов наночастиц и механизмов их модифицирующего действия на клетки и их компоненты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зайцев С.Ю. Супрамолекулярные наноразмерные системы на границе раздела фаз: Концепции и перспективы для биотехнологий / С.Ю. Зайцев. – М.: ЛЕНАНД, 2010. – 208 с.
2. Мартин-Пальма Р. Нанотехнологии – ударный вводный курс / Р. Мартин-Пальма, А. Лахтакия. – Долгопрудный: Издательский Дом «Интеллект», 2014. – 208 с.
3. Мартынова Е.У. Наночастицы: перспективы использования в медицине и ветеринарии / Е.У. Мартынова, Е.Н. Козлов, Д.В. Муха // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132, № 5. – С. 435-447.
4. Пиотровский Л.Б. Очерки о наномедицине / Л.Б. Пиотровский. – СПб.: Европейский Дом, 2013. – 204 с.
5. Пути поступления наночастиц в организм млекопитающих, их биосовместимость и клеточные эффекты / О.А. Подколотная, И.В. Игнатъева, Н.Л. Подколотный и др. // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132, № 1. – С. 3-15.
6. Пул-мл. Ч. Нанотехнологии / Ч. Пулмл., Ф. Оуэнс. – М.: Техносфера, 2006. – 336 с.
7. Рамбиди Н.Г. Структура и свойства наноразмерных образований. Реалии сегодняшней нанотехнологии / Н.Г. Рамбиди. – Долгопрудный: Интеллект, 2011. – 376 с.
8. Тараховский Ю.С. «Интеллектуальные» липосомальные наноконтейнеры в биологии и медицине / Ю.С. Тараховский // Биохимия. – 2010. – Т. 75, вып. 7. – С. 920-935.
9. Тараховский Ю.С. Трансфекция клеток ДНК-липидными комплексами — липоплексами / Ю.С. Тараховский // Биохимия. – 2009. – Т. 74, вып. 12. – С.1589-1602.
10. Шчарбин Д.Г. Дендримеры в трансфекции генов / Д.Г. Шчарбин, Б.Клайнерт, М. Брышевска // Биохимия. – 2009. – Т. 74, вып. 10. – С. 1314-1326.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ У МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИНК-ПАЛЬЦЕВЫХ НУКЛЕАЗ

И.А. Сизова, В.И. Шалгуев, А. Грайнер, П. Хегеманн

ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.Константинова, Санкт-Петербург, Россия

Одноклеточная эукариотическая микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* (хламидомонада) - популярный модельный организм в фундаментальных и прикладных исследованиях. На протяжении последних десятилетий водоросль активно используется для выяснения механизмов фоторецепции и регуляции фотоповедения. Известно, что ключевыми фоторецепторными белками являются родопсины – активируемые светом хромопротеиды, которые передают сигналы с использованием трансдукторов или работают как ионные каналы или насосы. Фотовозбуждение родопсинов приводит к генерации трансмембранных электрических токов, деполяризации клеточной мембраны, которая при определенном пороговом уровне приводит к открытию кальцевых каналов во флагеллах и изменению направления их движения. К настоящему времени у хламидомонады обнаружено 12 родопсинов, некоторые из которых являются многодоменными белками, включающими домены, участвующие в передаче сигнала (Luck et al., 2012). Функции большинства родопсинов неизвестны. Предполагается, что фотоповедение в основном определяется регулируемым светом ионными каналами Channelrhodopsin 1 и 2 (CHR1, CHR2). Для выяснения функций фоторецепторных белков в клетке необходимо направленно выключать или модифицировать гены. В настоящее время при изучении роли родопсинов в основном используется метод подавления экспрессии генов по механизму селективной РНК-интерференции. С использованием этого подхода показано, что родопсины Cop1 и Cop2 не являются фоторецепторами, ответственными за фототаксис или фотофобный ответ (Fuhrmann et al., 2001). Интересно, что эти белки кодируются одним генным транскриптом, альтернативный сплайсинг которого регулируется светом. Функции белков Cop1 и Cop2 в клетке предстоит выяснить. Изменение соотношения ионных каналов CHR1 и CHR2 с помощью РНК-интерференции показало, что эти родопсины главным образом ответственны за фотофобный ответ и не оказывают прямого влияния на фототаксис (Nagel et al 2003). Новейшими инструментами для редактирования геномов являются сайт-специфические цинк-пальцевые (ЦП) эндонуклеазы. В настоящее время эти ферменты успешно используются для редактирования геномов у млекопитающих, рыб, растений, насекомых, а также некоторых микроорганизмов. В 2013 году мы показали, что ЦП нуклеазы активны в клетках хламидомонады, и с их помощью инактивировали ген CHR1 (Sizova et al., 2013) у штамма CC-4350. ЦП нуклеаза специфичная к участку гена CHR1 4699-4722 п.н. была сконструирована нами на основании информации из опубликованной базы данных цинк-пальцевых модулей ZiFit. Причиной инактивации гена послужили структурные изменения, индуцированные репарацией ДЦР как посредством мутагенной нехомологичной рекомбинации, так и путем гомологичной рекомбинации с внесенным в клетку фрагментом гена CHR1, модифицированным вставкой (58 п. н.) или делецией (228 п.н.). К сожалению, клетки полученных мутантов неподвижны и непригодны для изучения фотоповедения. Для получения подвижных мутантов мы изучили штаммовую зависимость активности ЦП нуклеазы и выяснили, что лучшим реципиентом является штамм CC-3403. Результаты показали, что для этого штамма характерна более низкая частота гомологичной рекомбинации с донорной ДНК, чем у штамма CC-4350. Количество гомологичных рекомбинантов по встроенному в хромосому модельному гену *aphVIII(ChR1)* у штамма CC-3403 примерно в 5 раз ниже, чем у штамма CC-4350. Гомологичные рекомбинанты по гену CHR1 у данного штамма получить не удалось. Ген CHR1 у штамма CC-3403 был инактивирован в результате встраивания фрагмента гена бета-лактамазы (282 п.н) по месту двунитевого разрыва ДНК посредством нехомологичной рекомбинации. Полученный мутант CC-3403-RR6-9 будет использован для изучения фототаксиса, а также факторов, влияющих на генный таргетинг у *Chlamydomonas*. Мы предполагаем сконструировать ЦП нуклеазы специфичные ко всем генам фоторецепторов и создать коллекцию мутантов для изучения фотоповедения у хламидомонады.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-92694 ИНД_а

ЛИТЕРАТУРА

1. Fuhrmann M, Stahlberg A, Govorunova E, Rank S, Hegemann P. (2001) The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J Cell Sci.* 114, 3857-63.
2. Luck M, Mathes T, Bruun S, Fudim R, Hagedorn R, Tran Nguyen TM, Kateriya S, Kennis JT, Hildebrandt P, Hegemann P. (2012) A photochromic histidine kinase rhodopsin (HKR1) that is bimodally switched by ultraviolet and blue light. *J Biol Chem.* 287(47):40083-90.
3. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., Bamberg, E. (2003) *Channelrhodopsin-2*, a light-gated cation channel in green algae. *Proc. Natl. Sci USA* 100, 13940 – 13945.
4. Sizova I.A., Greiner A., Awasthi M., Kateriya S., Hegemann P. (2013) Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases *The Plant Journal.* 5, 873–882.

УДК 577.21

**НАПРАВЛЕННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ-ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТИ:
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ВЫЧИСЛЕНИЙ.****М.С. Кондратьев¹, А.С. Гриценко², А.В. Кабанов¹, Н.Н. Хечинашвили¹***1 – Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия**2 – Воронежский университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

Случаи разливов нефти и ее производных, к сожалению, нередки. В первую очередь это касается утечек при транспортировке, а также различных аварий во время нефтедобычи. От этих явлений ощутимо страдает земельный фонд, кроме того, утечки приводят к тяжелым загрязнениям водных ресурсов, что сказывается на всех элементах пищевых цепочек, принадлежащих к биоценозам – вплоть до влияния на здоровье человека. Физическое устранение нефтепродуктов, сбор нефтяных пятен на открытых пространствах – эффективно, но очень затратно – когда речь идет о разливах на площадях в сотни квадратных километров; особняком стоят утечки в пересеченной местности, когда сбор пленок физически невозможен. В этом случае оказывается необходимым применение реактивов, многие из которых представляют собой ПАВ или же активные химические агенты – и те, и другие оказывают негативное воздействие на окружающую среду. В качестве выхода из сложной ситуации, ожидаемо, было предложено использование ферментов, биокатализаторов белковой природы, безвредных для окружающей среды. Их применение возможно, как в виде растворов, так в составе определенных штаммов микроорганизмов, синтезирующих и продуцирующих такие ферменты. При любом из вариантов использования ферментных катализаторов оказывается важным придание их нативным молекулам дополнительной высокой стабильности и понижение их способности к агрегации – это достижимо либо при помощи методов селекции микроорганизмов («направленная эволюция», что очень долго и дорого), либо путем направленного конструирования молекул ферментов, на основе методов биоинформатики и компьютерного моделирования. Наш проект посвящен второму способу модификации – на основе наших оригинальных научных разработок.

Несколько лет назад в Лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем ИБК РАН был предложен новый механизм повышения термостабильности малых глобулярных белков – при этом повышается и стабильность этих белков при нормальных условиях и заметно снижается их способность к агрегации. Объектами исследования выступили ферменты нафталин-1,2-диоксигеназа и салицилатгидроксилаза, которые являются главными энзимами, участвующими в пути деградации нафталина и его производных (большой части компонентов нефтепродуктов). Мы совместно использовали методы классической протеомики (выравнивание аминокислотных последовательностей, реконструкция по гомологии) и новейшие методы компьютерного моделирования (квантовая химия, молекулярная динамика, молекулярный докинг субстратов), что позволило провести эффективный целенаправленный поиск вида и места одной или нескольких точечных замен в аминокислотной последовательности ферментов. Это дает возможность уже на этапе теоретического анализа достоверно предсказывать расположение узловых мест, влияющих на термостабильность конструируемых ферментов. Нашими коллегами планируется синтез рекомбинатных белков, с последующей экспериментальной проверкой их активности и термостабильности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратьев М.С., Кабанов А.В., Самченко А.А., Комаров В.М., Хечинашвили Н.Н. Использование высокопроизводительных вычислений в задачах повышения термостабильности антиоксидантных ферментов // ВЕСТНИК МГТУ СТАНКИН — г. Москва, — 2014. — С. 106-110.
2. Khechinashvili N.N., Kabanov A.V., Kondratyev M.S., Polozov R.V. The entropic nature of protein thermal stabilization // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2014. – Vol. 32, – № 9. – P. 1396-1405.

УДК 576.315.4

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ ДЕЙСТВИЯ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТКИ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

В.А. Рубакина, А. Г. Богатырева, В.А. Петрова, А.О. Лантушенко

ФГАОУ «Севастопольский государственный университет», Севастополь, Россия

Онкологические заболевания – одна из самых острых проблем современной медицины. Ежегодно такой диагноз ставится миллионам людей. Разработкой новых методов лечения злокачественных образований заняты сегодня не только медики, но биологи, химики и биофизики.

Борьба со злокачественными образованиями ведется различными методами. Отдельное место в этой борьбе занимает химиотерапия. Она основана на использовании лекарственных препаратов, направленных на подавление быстро делящихся злокачественных клеток. Однако кроме лечебного эффекта, эти препараты в большинстве случаев повреждают и здоровые клетки. Поэтому применение химиотерапии может приводить к тяжёлым побочным последствиям. Но, как показали ранее проведенные исследования, токсичность используемых препаратов можно уменьшить, используя их в сочетании с другими веществами [1]. Именно поэтому проводится всестороннее изучение совместного действия различных лекарственных препаратов с различными цитотоксичными агентами.

Типичным представителем цитостатических препаратов, используемых в химиотерапии, является митоксантрон (новатрон, NOV). По структуре молекула новатрона является модифицированным аналогом антибиотиков антрациклинового семейства и в целом проявляет несколько меньшую, чем антрациклины, противоопухолевую активность. Однако побочные эффекты кардиотоксичности NOV существенно снижены по сравнению, например, с дауномицином, что предполагает перспективность более широкого применения антибиотика в клинической практике.

NOV, тем не менее, обладает рядом побочных эффектов, что ограничивает его применение.

Проведенные ранее исследования позволяют предположить, что имеются вещества, в частности кофеин (CAF), позволяющие уменьшить токсичность цитостатических препаратов в случае совместного с ним применения [1].

Кофеин уменьшает цитотоксическое действие бромистого этидия [2] и ряда антиопухолевых препаратов, таких как доксорубин и его аналоги. В работах [3-5] сделан вывод о том, что на молекулярном уровне кофеин выступает в роли комплексообразователя-интерцептора ароматических биологически активных веществ, которые связываются с ДНК путем интеркаляции, тем самым уменьшая их эффективную концентрацию и соответственно фармакологическую активность.

Об эффективности совместного применения NOV и CAF можно будет судить после дополнительных всесторонних исследований, частью которых и является данная работа.

Цели работы:

1. Исследовать воздействия NOV на функциональное состояние ядер клеток буккального эпителия человека.
2. Исследовать совместное действие NOV с CAF на функциональное состояние ядра клеток буккального эпителия человека.
3. Сравнить эффект, произведенный на ядра клеток новатроном в отдельности и эффект его совместного действия с CAF.

Материалы и методы. Экспериментальный материал – клетки буккального эпителия человека. Объектом исследования выступали их интерфазные ядра.

Для проведения эксперимента производился отбор клеток у трех доноров А, В, С. Доноры некурящие, женского пола 20 и 22 лет. Клетки помещали в буферный раствор следующего состава: 3,03 мМ фосфатный буфер, pH = 7,0 с добавлением 2,89 ммоль хлорида кальция.

Эксперимент состоял из следующих этапов:

1. Исследовалось воздействие NOV на функциональное состояние ядер клеток буккального эпителия человека.

2. Исследовалось влияние CAF на биологическую активность NOV в клетках буккального эпителия человека.

Для оценки функционального состояния ядер использовалась методика оценки количества гранул гетерохроматина в ядрах – КГГ [6]. Исследование процесса гетерохроматинизации позволяет оценить изменения функциональной активности клеточного ядра [7,8,9].

Состояние хроматина в ядрах клеток исследовалось путем подсчета количества гранул гетерохроматина. Величина КГГ в каждом варианте эксперимента определялась в 30 ядрах. По отклонению полученного в опыте значения от контрольного значения КГГ делался вывод о среднем значении КГГ.

Результаты эксперимента.

Первый этап эксперимента включал в себя исследование воздействия NOV на ядра клеток буккального эпителия человека при различных концентрациях и временах экспозиции. Рассматривался диапазон концентраций от $2.95 \cdot 10^{-8}$ моль/л до $0.788 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Время варьировалось от 30 минут до двух часов.

Максимальный биологический эффект наблюдается при концентрации NOV равной $2.95 \cdot 10^{-8}$ моль/л и времени экспозиции 1.5 часа. На рисунке 1 для примера представлена диаграмма временной зависимости показателя КГГ при концентрации NOV $2.95 \cdot 10^{-8}$ моль/л для одного донора А. При временах экспозиции 1 час и 1.5 часа существует статистически значимая разница отклонения показателя КГГ относительно контрольного образца.

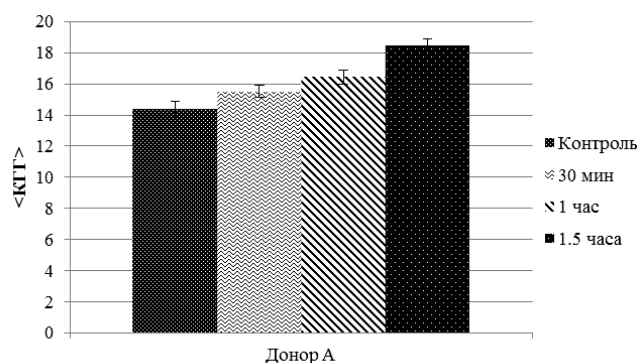


Рисунок 1 – Временная зависимость показателя КГГ при концентрации NOV равной $2.95 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Для всех доноров данная зависимость носит схожий характер.

Результаты второго этапа эксперимента представлены на рисунке 2.

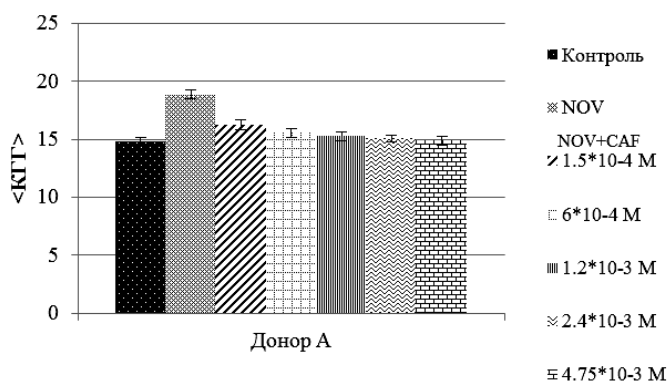


Рисунок 2 – Показатель КГГ в клетках буккального эпителия при постоянной концентрации NOV ($2.95 \cdot 10^{-8}$ моль/л) и различных концентрациях CAF.

Примечание к рисунку 2: В легенде позитивный контроль обозначен «NOV» – образец, содержащий только NOV в концентрации $2.95 \cdot 10^{-8}$ моль/л. Указанные в легенде концентрации – концентрации CAF в образцах, содержащих NOV в одной и той же концентрации $2.95 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Анализ полученных результатов показал, что для всех доноров при постоянной концентрации новатрона ($2.95 \cdot 10^{-8}$ моль/л) с увеличением концентрации САФ в образцах наблюдалось постепенное снижение показателя КГГ относительно позитивного контроля (образец, в котором клетки взаимодействовали только с NOV). Наблюдалась обратная зависимость между показателем КГГ и концентрациями САФ, т.е. с увеличением концентрации САФ в образцах показатель КГГ уменьшался относительно позитивного контроля (рис.2).

Наиболее важным является то, что при сравнении результатов первого и второго этапов эксперимента, можно заключить, что совместное действие NOV с САФ носит совершенно иной характер, чем воздействие на ядра клеток только NOV. С увеличением концентрации САФ биологическая активность новатрона в ядрах клеток буккального эпителия человека снижается (значение КГГ для образцов с максимальной концентрацией САФ примерно такое же, как для контрольного образца). Следовательно, можно предположить, что существует непосредственное взаимодействие молекул исследуемого препарата с молекулами САФ, которое снижает биологический эффект, производимый NOV на ядра клеток, что косвенно согласуется теорией интерцепторно-протекторного действия, т.е. интерцепторно-протекторный механизм взаимодействия в системах «NOV-САФ-ДНК» проявляется на клеточном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chu E., DeVita V.T. Physicians' cancer chemotherapy drug manual. – L.: Jones and Bartlett Publ., 2003. – 512 p.
2. Kimura H., Aoyama T. // J. Pharmacobiodyn. – 1989. – 12. – P. 589 – 595.
3. Traganos F., Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. // Cancer Res. – 1991. – 51. – P. 3682 – 3689.
4. Larsen R.W., Jasuja R., Hetzler R. et al. // Biophys. J. – 1996. – 70. – P. 443 – 452.
5. Kapuscinski J., Kimmel M. // Biophys. Chem. – 1993. – 46. – P. 153 – 163.
6. Shckorbatov, Y.G. He-Ne laser light induced changes in the state of chromatin in human cells / Y.G. Shckorbatov // Naturwissenschaften. – 1999. – V. 86. – № 9. – P. 452-453.
7. Гвоздев В.А. Гетерохроматин // Молекулярная биология. – 1999. – Т. 33. – №1. – С. 14-25.
8. Ашмарин И.П. Молекулярная биология. Л.: Изд-во ЛГУ, 1977. – 368 с.
9. Shckorbatov Y.G., Shakhbazov V.G., Grigoryeva N.N., Grabina V.A. Microwave irradiation influences on the state of human cell nuclei // Bioelectromagnetics, 1998, v.19, No 7, p.414-419.

УДК 579.66

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ

**Т.А. Воейкова¹, А.С. Шебанова², Л.М. Новикова¹, И.Н. Крестьянова¹, Л.К. Емельянова¹,
А.В. Кайшева⁴, Ю.Д. Иванов⁴, О.А. Журавлева¹, К.В. Шайтан^{2,3}, В.Г. Дебабов¹**

¹ФГУП «ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

³Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, Москва, Россия

⁴Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва, Россия

С помощью микроорганизмов можно получать наночастицы металлов, сульфидов и оксидов металлов различной формы и размера. Процессы бактериального синтеза наночастиц идут при низких температурах в водных растворах, без применения токсических веществ, при этом образуются наночастицы с узким распределением по размеру, не агрегирующие в суспензиях. Однако механизмы бактериального синтеза наночастиц полностью не выяснены.

Настоящая работа направлена на выяснение механизма образования наночастиц сульфида серебра (Ag_2S) в растворе солей азотнокислого серебра (AgNO_3) и тиосульфата натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) с помощью электрогенной бактерии *Shewanella oneidensis* MR-1. С помощью бактерий рода *Shewanella* получены наночастицы золота [1], серебра и сульфида серебра [2 - 4], палладия [5], оксидов урана [6].

Нами показано, что при наличии живых клеток *S. oneidensis* MR-1 в реакционном растворе AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ образуются стабильные наночастицы (7.8 ± 1.5 нм), сферической формы [4]. Тепловая инактивация клеток приводит к прекращению образования наночастиц. Однако оказалось, что живые

клетки не играют решающей роли в формировании наночастиц. Наночастицы образуются при использовании клеток, разрушенных ультразвуком, мембранной фракции клеток, менее эффективно в присутствии цитоплазматической фракции [7]. Эти данные ставят под сомнение роль клеток *S. oneidensis* MR-1 как активных редукторов $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в двухкомпонентной системе солей. Показано, что в отсутствии клеток в растворе солей AgNO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ происходит химический синтез сульфида серебра и образуется нерастворимый осадок, состоящий из агломерированных наночастиц. При наличии клеток *Shewanella* в таком же растворе солей биополимеры бактерий служат центрами нуклеации при росте наночастиц Ag_2S . Зрелые наночастицы сохраняют связь с бактериальными белками, которые стабилизируют их в суспензии. Впервые с поверхности наночастиц выделены и идентифицированы декагемные цитохромы внешней мембраны - MrtC и OmcA, а так же мембранный белок порин - MrtB. Роль клеток *S. oneidensis* MR-1 как активных редукторов $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в данной двухкомпонентной системе солей, по-видимому, не является главенствующей.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-00220) и Программы Президиума РАН (№ 24).

ЛИТЕРАТУРА

1. Suresh A.K., Pelleter D.A. et al. // Acta Biomaterialia. 2011. V. 7. P. 2148-2152.
2. C. K. Ng, K. Sivakumar et al. // Biotech. and Bioengin.. 2013. V. 110. P. 1831–1837.
3. Suresh A.K., Doktycz M.J. et al. // Acta Biomaterialia. 2011. V. 7. P. 4253-4258.
4. Дебабов В.Г., Воейкова Т.А. и др. // Российские нанотехнологии. 2013. Т. 8. № 3-4. С. 269-276.
5. Ng C., Tan T. et al. // RSC Advances. 2013. V.3. P.22498-22503.
6. Burgos W.D., McDonogh J.T. et al. // Geochim. et Cosmochim. Acta. 2008. V. 72. P. 4901-4915.
7. Шебанова А.С., Воейкова Т.А. и др. // Биофизика. 2014. Т. 59. Вып. 3. С. 500–507.

УДК 577.323

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ КОРОТКИХ ФРАГМЕНТОВ ДНК ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЗНАЧЕНИЯМ ПРОТОННЫХ ХИМИЧЕСКИХ СДВИГОВ

О.В. Рогова, М.А. Сидорова

СГАБУ «Севастопольский государственный университет», Севастополь, Россия

Разнообразие форм пространственной организации молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), основного носителя генетической информации, является одним из важных факторов в эволюционном процессе, так как это во многом определяет ее биологические функции и оказывает существенное влияние на эффективность взаимодействия ДНК с биологически активными соединениями. Вторичная структура нуклеиновых кислот существенно зависит от их первичной структуры и свойств окружающей среды [2].

В работе проведен сравнительный анализ экспериментальных значений химических сдвигов обменивающихся протонов дезоксиолигонуклеотидов, характеризующихся различным составом, последовательностью оснований в цепи и вторичной структурой. Рассмотрены самокомплементарные двухспиральные последовательности дезоксиолигонуклеотидов различной длины: пять тетрануклеотидов ($5'\text{-d(ACGT)}$, $5'\text{-d(AGCT)}$, $5'\text{-d(GCGC)}$, $5'\text{-d(CGCG)}$, $5'\text{-d(TGCA)}$), три гексануклеотида ($5'\text{-d(CGTAACG)}$, $5'\text{-d(CGCGCG)}$, $5'\text{-d(TACGTA)}$) и октануклеотид $5'\text{-d(GACATGTC)}$. Несамкомплементарные последовательности представлены тетрамерами $5'\text{-d(AAGC)}$, $5'\text{-d(CTGA)}$, $5'\text{-d(CGAA)}$, $5'\text{-d(GAAG)}$ и дезокси-гептануклеотидом $5'\text{-d(GCGAAGC)}$, способным образовывать шпильчатую структуру в растворе.

На основании сравнительного анализа были построены диаграммы (рисунки 1,2), иллюстрирующие отклонения химических сдвигов $\Delta\delta H_i = \delta_{\text{э}}(H_i) - \delta_{\text{с}}(H_i)$, млн⁻¹, протонов аденина и цитозина от усредненных значений $\delta_{\text{с}}(H_i)$, приведенных в работе [11], в различных исследованных последовательностях. На рисунке 2 видно, что химические сдвиги протонов дезоксирибозы испытывают,

в среднем, значительно меньшие изменения по сравнению с ароматическими протонами. Эта закономерность наблюдается для самокомплементарных нуклеотидных последовательностей различной длины. Несколько большие значения величин $\Delta\delta H_i$ для протонов самокомплементарных тетрануклеотидов, по-видимому, связаны с эффектом плавления концевых нуклеотидных пар в случае коротких последовательностей. Наибольшие величины отклонений химических сдвигов $\Delta\delta H_i$, (рисунки 1, 2) для протонов гептамера 5'-d(GCGAAGC) очевидно обусловлены тем, что данный олигомер не образует в растворе каноническую двойную спираль.

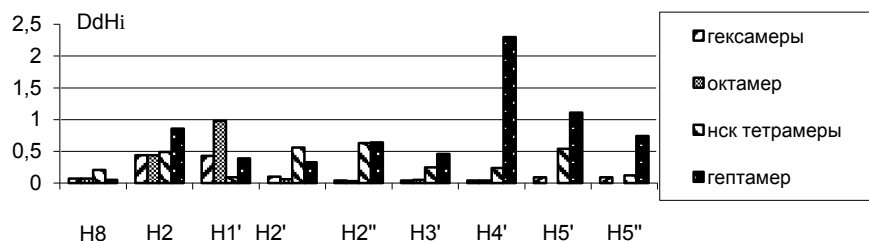


Рисунок 1- Отклонения химических сдвигов $\Delta\delta H_i$, млн⁻¹, протонов аденина от усредненных значений $\delta_c(H_i)$ [11] в исследованных последовательностях (нск тетрамеры - несамокомплементарные тетрамеры)

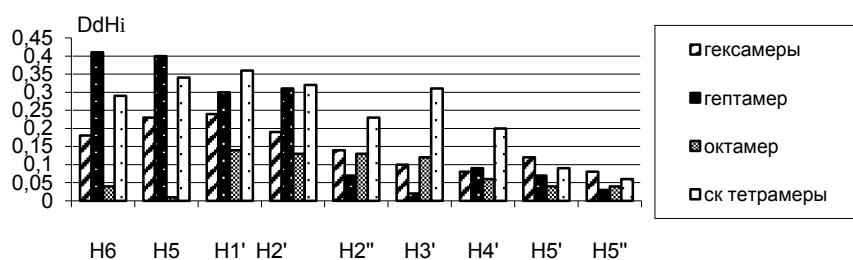


Рисунок 3- Отклонения химических сдвигов $\Delta\delta H_i$, млн⁻¹, протонов цитозина от усредненных значений $\delta_c(H_i)$ [11] в исследованных последовательностях (ск тетрамеры –самокомплементарные тетрамеры)

Анализ результатов, позволяет сделать следующие выводы: 1) длина нуклеотидной последовательности существенным образом влияет на положения резонансных пиков ароматических протонов самокомплементарных дезоксиолигонуклеотидов; 2) химические сдвиги протонов дезоксирибозы испытывают значительно меньшие изменения по сравнению с ароматическими протонами при изменении длины самокомплементарного олигонуклеотида; 3) наблюдается существенное отличие в экранировании протонов само- и несакомплементарных дезоксиолигонуклеотидов, содержащих одинаковые триплетные последовательности.

На основе проведенных исследований можно сделать вполне определенные заключения об особенностях конформационных состояний молекул ДНК, выявить структуры, обладающие отклонениями от стандартной двухспиральной формы (в первую очередь, это касается одноцепочечных и шпильчатых структур ДНК), а также произвести анализ влияния плавления концевых нуклеотидных пар в коротких фрагментах ДНК на геометрию двойной спирали.

УДК 579.254.2

**СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ ГИДРОЛАЗ В БАЗЕ ДАННЫХ
НАЦИОНАЛЬНОГО ЦЕНТРА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ (NCBI)***А.А. Толкачева, Д.А. Черенков, О.С. Корнеева**ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия*

На сегодняшний день на рынке промышленных ферментов отмечается исключительно положительная динамика. Весь рынок ферментных препаратов ежегодно «подрастает» в среднем на 10%, ежегодный рост европейского рынка, обеспеченный инновационными разработками, ожидается на уровне 3,5%. На российском рынке присутствует продукция практически всех мировых лидеров ферментного рынка. По данным аналитических служб, объем отечественного рынка ферментов составляет свыше 40 млн. долл., при этом на долю российского производства приходится немногим более 30%. Это связано, в первую очередь с отсутствием масштабного отечественного производства [1]. В настоящее время стремительно развивающейся отраслью биотехнологии является технология рекомбинантных ДНК. Это эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание микроорганизмов с заданными генетическими характеристиками и позволяющий повысить активность и выход целевого фермента по сравнению с нативным продуцентом. Таким образом, создание коммерчески значимых штаммов-продуцентов, получение рекомбинантных ферментов с разными биохимическими свойствами являются актуальными задачами современной биотехнологии ферментов.

В результате работы, проведенной на кафедре биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» были проанализированы данные Национального центра биотехнологической информации (NCBI), касающиеся физико-химических свойств липаз, протеаз, целлюлаз и ксиланаз из различных источников, кодируемых разными генами. На основании проанализированной информации были выбраны микроорганизмы-источники целевых генов. В качестве перспективного источника генов протеазы и липазы выбраны бактерии рода *Bacillus*; целлюлазы – бактерии рода *Cellulomonas*; ксиланазы – бактерии рода *Geobacillus* и грибы рода *Trichoderma*.

На основании изучения баз данных по молекулярному клонированию генов был подобран члечный вектор pKLAC2, отвечающий требованиям генной инженерии.

В результате проведенных исследований методом ПЦР с соответствующими генспецифическими праймерами амплифицированы гены протеазы, липазы, ксиланазы и целлюлазы, а затем клонированы в вектор pKLAC2.

Таким образом, получены следующие генетические конструкции на основе вектора pKLAC2:

- конструкция pKLAC2-Prot, содержащая кодирующую часть гена протеазы;
- pKLAC2-Lip, содержащая кодирующую часть гена липазы;
- pKLAC2-Cell, содержащая кодирующую часть гена целлюлазы;
- pKLAC2-XylGeo, содержащая кодирующую часть гена ксиланазы из *Geobacillus stearothermophilus*;
- pKLAC2-XylReesei, содержащая кодирующую часть гена ксиланазы из *Trichoderma reesei*;
- pKLAC2-XylViride, содержащая кодирующую часть гена ксиланазы из *Trichoderma viride*.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий, проект № 0009309

ЛИТЕРАТУРА

1. Рынок промышленных ферментных препаратов России и стран СНГ в 2009-2011 годах [Текст]: маркетинговый отчет Abercade consulting. - 286 с.

Секция 4. Экология и ресурсосбережение

УДК 60:502.1

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ТЕХНОГЕННЫЙ ФАКТОР БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

Н.Б. Градова, В.И. Панфилов

ФГБОУ «Российский химикотехнологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Биотехнология является одним из инновационных научно-практических приоритетов XXI века. Настоящий период развития биотехнологии является вторым в России после периода 70-х-80х годов, бурного развития крупнотоннажных биотехнологических производств по получению микробной биомассы на разных источниках сырья, производства ферментов и лизина и др.

Особенностью биотехнологии является использование в качестве основного средства производства «одноклеточных и субклеточных единиц живых организмов (в том числе и генетически изменённых), культивируемых клеток и тканей растений и животных, способных к самовоспроизведению» (определение комиссии ЕЭС, 1988г).

Для настоящего периода развития биотехнологии характерно использование в научных и практических разработках широкого круга биологических объектов:

относящимся к разным уровням организации живого; принадлежащих к разным систематическим группам, культуры клеток растений и животных, микроводоросли, простейшие, грибы, бактерии, цианобактерии, археи, вирусы; принадлежащих к разным физиологическим и гигиеническим группам (апатогенные, сапрофиты, условно-патогенные и патогенные для человека, животных и растений паразитические формы).

Биотехнологические производства являются источником эмиссии специфического техногенного «биологического фактора» в виде биоаэрозолей, водных сред и твёрдых отходов. По своему составу «биологический фактор «представляет природные биоорганические соединения тождественные продуктам, циркулирующим в потоке углерода в природе, что определяет специфику их воздействия на человека и экосистемы, а также специфику методов, которые могут быть использованы для биоиндикации их воздействия на экосистемы. Требования к малотоннажным технологиям, использующих в качестве объектов патогенные формы микроорганизмов и вирусы, получающих продукты, обладающие свойствами ядов, а также к технологиям, осуществляемым в защищённых (стерильных) условиях определены системой GMP.

Широко разрабатываемые в настоящее время в рамках малого и среднего бизнеса технологические процессы микробиологической переработки зерна и других целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности предъявляет высокие требования к разработчикам для обеспечения биологической безопасности данных производств.

В качестве научно-практической основы для разработки системы обеспечения биологической безопасности разрабатываемых технологий должны быть использованы результаты широких медико-биологических и санитарно-гигиенических исследований «биологического фактора», проведенных в 70-80ые годы.

К таким результатам следует отнести следующие: установлена возможность при аэрогенном распространении как клеток непатогенных микроорганизмов, так и инаktivированных клеток (белковой пыли) проявления алергизирующего воздействия на человека; ПДК на содержание белковой пыли в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе устанавливаются по критерию их алергенности на достаточно низком уровне; системы контроля за соблюдением ПДК специфического белка массы инаktivированных микробных клеток возможна на основе использования иммунохимических реагентов;

Необходимо также учитывать, что микробная биомасса в концентрации 0.005г/г и выше при попадании в почву стимулирует рост санитарно-показательных микроорганизмов *E.coli*.

Материал, изложенный в статье, является результатом анализа большого объёма научно-практической литературы, опубликованной в период 70-90-х годов.

УДК 602.4:628.35:664

**РАЗРАБОТКА И ПОДГОТОВКА ПРОМЫШЛЕННОГО ВЫПУСКА
АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРНОГО АНАЛИЗАТОРА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-
ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА****В.А. Алферов, В.А. Арляпов, Л.Д. Асулян, Н.Ю. Юдина, Н.К. Зайцев¹**

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

¹ООО «Эконикс-Эксперт, Москва, Россия

Учитывая постоянно растущий перечень загрязняющих веществ, поступающих в окружающую среду, а также ужесточение гигиенических показателей их нормирования, полный химический анализ загрязнения вод, почв, растительности представляет собой очень сложную и дорогостоящую задачу. Поэтому возрастающее внимание уделяется экспресс- методам контроля, ориентированным, прежде всего, на детектирование опасных уровней загрязнения и оценку совокупного воздействия токсикантов на окружающую среду. Биохимическое (или биологическое) потребление кислорода (БПК) является одним из наиболее широко используемых показателей для контроля чистоты водных сред, и представляет, по определению, количество кислорода, необходимое для биохимического окисления органических веществ, содержащихся в образце. Существующий метод определения БПК основан на тестах, продолжительность которых составляет 5, 10 или 20 суток (ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97). В силу значительной продолжительности процедуры метод не является адекватным в современных условиях жизни, поскольку представляет результаты анализа со значительной задержкой (минимум 5 суток от момента поступления пробы). В настоящее время все промышленные предприятия и водоочистные сооружения РФ используют для повседневного рутинного анализа сточных вод упомянутый метод БПК₅.

В рамках проекта № 14.574.21.0062, выполненного при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», предлагается разработка аналитического прибора нового поколения, предназначенного для экспресс-оценки индекса БПК. Принципиальным отличием метода анализа с использованием разрабатываемого прибора от существующего является сокращение времени анализа от 5 суток до 5 - 15 мин. С помощью данного анализатора возможно осуществлять анализ в режиме реального времени, для измерения не требуется привлечения высокоспециализированного персонала. Прибор может использоваться как в стационарных условиях, так и в составе подвижных лабораторий.

Целью выполнения проекта является: получение значимых научных результатов и решение комплекса научно-практических задач, позволяющих создать и в короткий срок вывести на рынок новый вид научно-технической продукции – биосенсорный анализатор для экспресс-определения биохимического потребления кислорода.

Основной идеологической задачей проекта является соединение знаний, опыта, имеющегося научного задела и интеллектуальной собственности коллектива исследователей Тульского государственного университета и опыта разработки и организации промышленного выпуска приборов аналогичного назначения коллектива сотрудников ООО «Эконикс-Эксперт». Главной научно-технической задачей проекта является разработка экспериментального образца нового аналитического прибора, предназначенного для экспресс-определения БПК в поверхностных пресных, подземных, питьевых и сточных водах. Реализация проекта позволит сократить срок коммерциализации результата до 1,5 – 2 лет, необходимых для проведения сравнительно несложных опытно-технологических работ.

К настоящему времени проведен выбор эффективных биокатализаторов из широкого набора микроорганизмов (родов *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Arxula*, *Saccharomyces* и *Gluconobacter*) по спектру окисляемых субстратов, устойчивости при иммобилизации на электроде, стабильности при хранении и работе. Проведены теоретические и экспериментальные исследования, направленные на выбор и разработку методов иммобилизации биокатализаторов для создания рецепторного элемента биосенсора. Проводится подготовка к изготовлению экспериментальных образцов биосенсорных анализаторов БПК.

Разработанные в ходе выполнения проекта анализаторы нового поколения могут использоваться для выполнения ежедневных текущих анализов проб воды на предприятиях системы водоочистки РФ, Станциями санитарно-эпидемиологического контроля, службами МЧС, МинПрироды, экологическими структурами и биотехнологическими предприятиями.

Широкомасштабное использование разрабатываемого анализатора приведет к существенному сокращению времени химического анализа сточных, природных и поверхностных вод, что в свою очередь повысит экономическую эффективность служб и организаций занимающихся контролем состояния водных ресурсов. Использование современного физико-химического метода анализа вместо морально устаревшего классического химического метода анализа БПК позволит повысить уровень автоматизации анализа, в том числе путем встраивания разрабатываемых анализаторов в состав технологического оборудования для контроля качества сточных вод очистных сооружений на предприятиях. Последнее, в свою очередь, избавит от необходимости постоянного отбора проб и даст возможность проводить «онлайн» мониторинг.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», проект № 14.574.21.0062.

УДК 543.9:663:664

БПК-БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В ОРГАНОСИЛИКАТНУЮ МАТРИЦУ ДРОЖЖЕЙ *DEBARYAMYCES HANSENII*

ЕЛ. Афонина, О.Н. Пономарева О.А. Каманина, В.В. Строителев

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия.

Современные строгие требования к состоянию экологической обстановки диктуют необходимость использования экспресс-методов контроля биохимического потребления кислорода (БПК), основанных на применении БПК-биосенсоров [1]. При разработке таких биосенсоров, как правило, используют целые клетки, так как они способны окислять широкий спектр веществ. Одними из перспективных микроорганизмов для создания БПК-биосенсора являются дрожжи *Debaryomyces hansenii* [2].

Иммобилизация живых клеток при разработке биосенсоров является важным этапом исследований, поскольку определяет характеристики сенсора. Многие инновационные достижения, в том числе при разработке иммобилизованных биосистем, инициированы живой природой. Живые организмы, например, диатомовые водоросли, в процессе эволюции смогли сформировать вокруг клеток минерализованные оболочки, которые обеспечивают клеткам механическую защиту, но не препятствуют поступлению в клетку питательных веществ [3]. Это послужило примером для получения инкапсулированных в силикатные материалы клеток, в том числе для применения в биосенсорах. Ранее нам удалось показать, что метилотрофные дрожжи в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) и силановых прекурсоров - тетраэтоксисилана (ТЭОС) и метилтриэтоксисилана (МТЭС), в определенных условиях способны формировать 3D-архитектуры, в которых вокруг каждой клетки формируется капсула, при этом инкапсулированные клетки образуют единую структуру [4]. Иммобилизация других дрожжей в тех же условиях может не привести к подобному результату, поэтому представляется важным исследование, направленное на выяснение возможностей инкапсулирования дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y - 2482 как способа обеспечения защиты живых клеток от вредных факторов при их использовании в БПК-биосенсорах.

Для иммобилизации клеток использовали ТЭОС и МТЭС в объемном отношении 15/85 и ПЭГ с молекулярной массой 3000. Синтез проводили в условиях основного катализа с использованием NaF. Образующуюся структуру биогрида изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рисунок 1). Вокруг каждой клетки формируются капсула из сферических частиц, напоминающая оболочки, полученные ранее вокруг метилотрофных дрожжей *Pichia angusta* ВКМ Y-2559 [4].

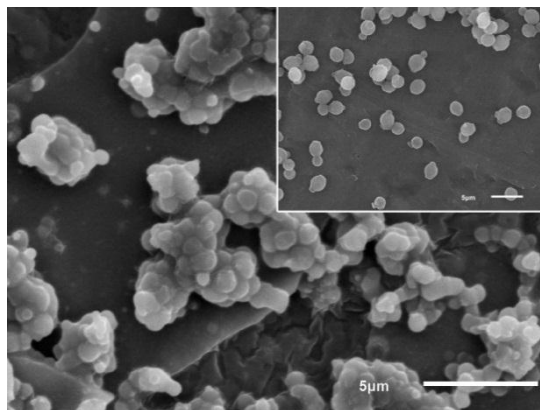


Рисунок.1 - Изображение золь-гель матрицы с инкапсулированными дрожжами *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 (СЭМ). Вставка: изображение клеток дрожжей *Debaryomyces hansenii* в чистой культуре (СЭМ).

Поскольку БПК определяют в образцах, содержащих любые примеси, важно определить способность органосиликатной капсулы защищать клетки от вредных факторов. Для этого проводили измерения дыхательной активности инкапсулированных микроорганизмов в присутствии ионов тяжелых металлов. Защитное действие органосиликатной капсулы по отношению к иммобилизованным клеткам оценивали по способности этой капсулы снижать токсическое действие ионов тяжелых металлов на клетки микроорганизмов.

Инкапсулированные в органосиликатную матрицу дрожжи *Debaryomyces hansenii* не теряют своей активности в присутствии ионов тяжелых металлов. При превышении ПДК в 100 раз дыхательная активность инкапсулированных микроорганизмов снижается на 20% в то время как активность дрожжей, не покрытых силикатной капсулой, снижается в несколько раз.

Полученные результаты указывают на особые защитные функции органосиликатной капсулы, которая образуется вокруг дрожжей, что следует учитывать при разработке БПК-биосенсора. Поскольку полученная матрица эффективно защищает клетки от внешних вредных воздействий, то полученный на её основе биораспознающий элемент применяли для создания БПК – биосенсора. Значения БПК, определяемые с помощью биосенсора на основе инкапсулированных дрожжей и стандартным методом, незначимо отличаются между собой.

Работа выполнена при поддержке Госзадания Минобрнауки РФ № 2014/227.

ЛИТЕРАТУРА

1. Понаморева, О.Н., et al., Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода (обзор). Прикладная биохимия и микробиология, 2011. 47(1): p. 5-15.
2. Arlyapov, V.A., et al., BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* immobilized in poly(vinyl alcohol) modified by N-vinylpyrrolidone. Enzyme and Microbial Technology, 2013. 53(4): p. 257-262.
3. Nassif, N. and J. Livage, From diatoms to silica-based biohybrids. Chem Soc Rev, 2011. 40(2): p. 849-59.
4. Ponamoreva, O.N., et al., Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol-gels for the design of biosensors. Biosensors and Bioelectronics, 2015. 67(0): p. 321-326.

РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩАЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ СМЕСЕЙ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ ЖИВОТНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В.П. Молчанов, М.Г. Сульман, Э.М. Сульман

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

В последние годы большое значение придается развитию производства кормовых добавок, необходимых для балансирования полноценных рационов сельскохозяйственных животных. В связи с бурным развитием биотехнологии и микробиологической промышленности появилась возможность получать кормовые добавки из органических отходов различного состава методом биокаталитической конверсии.

В работе был исследован процесс биоконверсии смеси органических отходов животного и растительного происхождения с дополнительным внесением в исходную смесь различных солей аскорбиновой кислоты. Выбор солей аскорбиновой кислоты в качестве биостимуляторов не случаен. Это связано с тем, что сама аскорбиновая кислота не является фактором роста для микроорганизмов, но она необходима для полноценной жизнедеятельности сельскохозяйственных животных. В то же время, микро- и макроэлементы, входящие в состав аскорбинатов в дозах, не превышающих нормы потребления их животными, способны оказывать благоприятное влияние на протекание процесса биоконверсии.

В многочисленных экспериментах при соответствующих повторах было изучено влияние на процесс биоконверсии аскорбинатов следующих металлов: кальция, калия, натрия, кобальта, марганца, магния, цинка и железа. В процессе биоферментации определяли развитие физиологических групп микроорганизмов, способных к преимущественному разрушению органических веществ.

Проведенные микробиологические исследования позволили сделать однозначный вывод о том, что внесение аскорбинатов положительно повлияло на процесс биоферментации – численность популяции микроорганизмов значительно возросла. Анализ полученных экспериментальных данных показывает, что 60-часовая выдержка органической массы приводит к прекращению экспоненциального роста численности микроорганизмов, и на фоне наиболее полной биотрансформации питательных компонентов субстрата осуществляется синтез вторичных метаболитов.

Выявление в продукте ферментации аминокислосинтезирующих микроорганизмов – опосредованный способ определения потенциальной ценности конечного продукта, рекомендуемого к использованию в качестве кормовой добавки. Относительное содержание аминокислосинтетиков достигало высоких значений в ходе всего процесса, что дало основания предполагать накопление в конечном продукте мономеров белковой субстанции – свободных аминокислот.

Весьма велика роль аминокислот, как основных компонентов протеина в кормлении животных. Для того чтобы в организме животных происходило постоянное образование и обновление белков, они должны получать с кормами нужное количество аминокислот в необходимом соотношении. Однако многие аминокислоты могут находиться в форме, недоступной для усвоения животными организмами. Именно поэтому определение наличия свободных аминокислот в продуктах ферментации имеет огромное значение.

Практически все использованные соли аскорбиновой кислоты существенно интенсифицировали процесс образования свободных аминокислот. Исключение составили эксперименты с аскорбинатами кобальта и натрия, в которых количество свободных аминокислот в конечном продукте было таким же, как и в контрольной пробе без биостимуляторов. Почти идентичные результаты микробиологических исследований и исследований аминокислотного состава конечного продукта были получены при внесении в исходную смесь аскорбинатов марганца и магния. Это может быть объяснено тем, что в целом ряде ферментативных реакций марганец действует как синергист или заместитель магния.

Однако особого внимания заслуживают опыты с аскорбинатами железа и цинка, поскольку в пробах с применением именно этих аскорбинатов наблюдался максимальный рост численности аминокислосинтезирующих микроорганизмов. В контрольной пробе без биостимуляторов происходило увеличение содержания свободных аминокислот в среднем в 14,5 раза. Исследования аминокислотного состава продукта показали увеличение общего содержания свободных аминокислот в 37,6 раза в опытах с аскорбинатом железа и в 35,9 раза в опытах с аскорбинатом цинка. Особое влияние последнего на синтез аминокислот может

быть объяснено тем, что катионы цинка принимают активное участие в формировании структуры ДНК-матрицы белкового синтеза. Увеличение содержания свободных аминокислот при воздействии аскорбината железа объясняется тем, что железо необходимо для нормальной деятельности многих окислительно-восстановительных ферментов, для переноса кислорода и в других процессах метаболизма.

Многочисленные анализы конечного продукта биоконверсии доказывают возможность его использования в качестве премикса при разработке полноценных рационов для крупного рогатого скота и сельскохозяйственной птицы. Внося таким образом различные биостимуляторы, возможно производить целевой биосинтез кормовых добавок с теми или иными заранее заданными свойствами. Выполненные исследования показывают, что использование биологически активных стимуляторов при производстве кормов и кормовых добавок, а вследствие этого достаточная концентрация необходимых аминокислот в них, приводит к увеличению привесов, уменьшению расхода кормов и даже улучшают физиологические показатели животных.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-08-00256).

УДК 574

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВЫ И ВОДЫ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Черенков Д.А., Толкачева А.А., Корнеева О.С.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

Восстановление естественного состояния природных объектов, загрязненных нефтепродуктами, является одной из наиболее сложных задач при ликвидации последствий аварий. Биоремедиация позволяет устранить остаточные загрязнения, наиболее трудно поддающиеся очистке механическими и другими способами. Она основана на применении микроорганизмов – утилизаторов углеводородных загрязнений, способных разлагать нефтепродукты и переводить их в доступные для усвоения другими организмами формы. Успешное применение данного способа очистки приводит к практически полному восстановлению почвы и водоемов. Однако этот способ требует соблюдения специальных условий обработки, кроме того, большинство препаратов для биоремедиации, применяемых на сегодняшний день, имеют ряд существенных недостатков: длительное время, необходимое для получения положительного эффекта (зачастую 2–3 сезона), внесение подкормки в виде удобрений, низкая эффективность разложения нефтепродуктов. Препарат «ВЕГА-эко» является новой биотехнологической разработкой и обладает рядом существенных преимуществ перед существующими на сегодняшний день биопрепаратами. В состав препарата входят три различных штамма микроорганизмов, каждый из которых выполняет свою, определенную функцию, способствующую эффективной утилизации нефтепродуктов: это выработка поверхностно-активных веществ, делающих загрязнение доступным для переработки, разложение на безопасные компоненты и перевод в доступную для других организмов форму. Препарат содержит в своем составе компоненты питательной среды, необходимые для поддержания жизнедеятельности микроорганизмов-нефтедеструкторов, поэтому не требует дополнительного внесения удобрений в процессе применения. Высокая эффективность разложения нефтепродуктов препаратом «ВЕГА-эко» обеспечивает быструю очистку почвы и воды от загрязнения. По результатам проведенных испытаний, было показано, что содержание нефтепродуктов в жидкой среде и в почве снижается в 2 раза и в 8 раз соответственно уже на восьмые сутки после внесения препарата. Таким образом, «ВЕГА-эко» существенно сокращает сроки восстановления естественного состояния почвы и водной среды. Препарат доказал свою эффективность при ликвидации последствий аварии на ручье Безымянный в Московской области, когда произошел сброс мазута в количестве 12 тонн. После очистки берегов и поверхности воды механическими способами и с применением сорбентов, количество нефтепродуктов в почве по берегам ручья оставалось высоким. Применение препарата «ВЕГА-эко» позволило добиться значительного снижения остаточного загрязнения уже через 30 суток после начала работ. Полученные результаты подтверждают, что препарат «ВЕГА-эко» является высокоэффективной разработкой и может быть с успехом использован при очистке водных объектов и почвы от нефтепродуктов.

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДЕСТРУКЦИЯ И ДЕТОКСИКАЦИЯ ПОЛИМЕРНЫХ ПРИСАДОК
К БУРОВЫМ РАСТВОРАМ****В.А. Калюжин, А.В. Калюжина, Р.Н. Закиров***Томский государственный университет, Томск, Россия*

Целью проводимых работ является разработка технологии биологической деградации синтетических полимерных присадок – пластмасс к буровым растворам. Конечным результатом должна быть технология биоремедиации, позволяющая получать грунт, очищенный от буровых полимеров доведенный до 5 класса опасности определяемого методом биотестирования.

Полимеры искусственного происхождения добавляются в буровые смеси для увеличения их вязкости, что снижает скорость осаждения отбуренной породной крошки и способствует ее подъему на поверхность, а также выполняет роль смазки. Полимерные добавки являются биологически опасными веществами. Класс их опасности 2-4. По этой причине буровые работы сопровождаются загрязнением окружающей среды токсичными веществами. При этом расход полимеров для бурения одной скважины протяженностью 1 – 3 км составляет 1 – 3 тонны. Сброс отбуренного материала проводится в буровые амбары. Однако, локализация токсичных отходов недостаточна, так как происходит фильтрация веществ через грунт и размыв содержимого буровых амбаров дождевыми и талыми водами. За счет этих процессов увеличивается площадь загрязненной территории. При этом время естественного полураспада полимерных присадок составляет несколько десятков лет. Следовательно, буровой амбар является источником загрязнений на протяжении многих лет. В свою очередь становится актуальной проблема дезактивации буровых отходов за возможно короткое время. Нами была поставлена задача найти биологический способ деструкции и детоксикации в буровых смесях.

Для проведения работ нами была взята смесь полимерных добавок и проведена деструкция данной смеси. Смесь веществ – полимеров представляло группу соединений, наиболее часто применяемых в буровой практике многих стран. Содержание искусственно введенных добавок составляло по 5 – 15 грамм на 1 кг грунта при пересчете на его сухой вес. Были выделены из окружающей среды микроорганизмы, способные деструктировать буровые полимеры. Минеральные добавки составляли дозу, указанную в патентах. Доза указана в таблице 1. Все полимеры присутствовали в смеси одновременно, и их биодеградация велась также одновременно в одной емкости.

Т а б л и ц а 1

Перечень изучаемых буровых полимеров и их дозировка

Буровые полимеры	Доза в г/кг грунта
1. Сайпан	15
2. Реапак	15
3. Габройл HV	15
4. Polipac	15
5. Дефобур	15
6. Polipac - R	15
7. Polimer XB	15
8. КМЦ	15
9. Метилцеллюлоза	15
10. Тилоза	10
11. РС - 1	5
12. ФК - 2000	5

Химические и экологические свойства изучаемых полимеров следующие:

1. Сайпан – гидролизированный акриловый полимер. Класс опасности – 2.
2. Габройл HV – полимер натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. Класс опасности – 3.

3. КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза – полимерный эфир целлюлозы и гликолевой кислоты. Класс опасности – 3.

4. Тилоза – полимер оксиэтилцеллюлозы. Класс опасности – 4.

5. РС – 1 – гидролизат полиакриламида в среде полифосфата натрия. Класс опасности – 3.

6. Дефобур – кремний органический полимер на носителе двуокиси кремния.

7. ФК – 2000 – высокополимерный продукт щелочной обработки синтетических эфиров карбоновых кислот. Класс опасности – 4.

8. Реапак – полимерное модифицированное ионная форма целлюлозы. Класс опасности – 4.

9. Метилцеллюлоза – полимерный продукт метилированной целлюлозы хлористым метилом.

10. Polipac, polipac – R, polimer XB – полимерные производные целлюлозы и этиленгликоля. Класс опасности – 4.

Общее содержание полимеров в одном килограмме загрязненного грунта составило 155 г.

Степень биологической опасности определялась методом биотестирования в сертифицированной лаборатории областного комитета охраны окружающей среды и природопользования, в отделе Томской специализированной инспекции государственного экологического контроля и анализа города Томска.

В качестве тест-объекта использовали низших ракообразных – дафний *Daphnia magna* Straus и представители зеленых протококковых водорослей *Scenedesmus quadricauda* Breh. Биотестирование определялось по выживаемости дафний в водных вытяжках из грунта при различных степенях разбавления, а также по интенсивности флюорисценции хлорофила в водорослях и их численности.

Было установлено, что вытяжки из грунта в начале опыта вызывает 100% гибель дафний и водорослей при степени разбавления 1:1. Полученные результаты позволяют отнести исследуемый объект к 4 классу опасности. Дата отбора проб 22.04.2015. Затем 18.06.2015 был проведен промежуточный анализ, а 08.07.2015 взята окончательная проба. Результаты анализов приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Влияние грунта на различных этапах очистки на биологические тест-объекты

Наименование показателя тест-объекта	Показатель биотестирования		
	Исходное состояние	Промежуточное состояние	Конечное состояние
Процент гибели дафний	100	0	0
Процент гибели водорослей	100	71	-16

Проведенные эксперименты показали, что удалось очистить от буровых полимеров опытный объем грунта до пятого класса опасности. Длительность процесса составляет 2,5 – 3 месяца. Дозировка веществ, режимы работ совпадают с интервалами защищенными в наших Патентах (Патент № 2315670 от 27.01.2008 Способ биологической очистки грунта и воды от органических соединений алифатического, карбоциклического и гетероциклического рядов и их смесей произвольного состава; Патент № 2405636 от 10.12.2010 г. Способ получения биомассы микроорганизмов при биологической утилизации органических соединений в очищаемой среде). Было показано, что биодеструкция полимерных материалов, применяемых в буровой практике, достигается теми же приемами и подходами, что и вещества-мономеров.

По результатам опытов следует, что очищаемая среда стала безопасной, как для гетеротрофов – дафний, так и для автотрофов – водорослей. Поскольку, процесс деструкции буровых полимеров сопровождается накоплением биомассы микроорганизмов – деструкторов, то последние становятся кормовой базой для гетеротрофов – дафний. Следовательно, очищаемый объем водной среды превращается в генератор зоопланктона. И если, в очищаемую среду ввести потребителей зоопланктона, то становится возможным включение пищевых цепей с выходом, например, рыбной биомассы, имеющей хозяйственное или спортивное значение.

Очевидно, что возможны и иные пути рационального использования образовавшегося источника протеина, за счет формирования многочисленных версий возможных пищевых цепей. В свою очередь, «зацветение» водоемов за счёт размножения водорослей можно регулировать дозированием минеральных добавок.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТА ДНК ИЗ МОЛОК ПРЕСНОВОДНЫХ РЫБ

С.В. Гомбоева, Л.Ю. Прудова, О.Ю. Фалилеева

*ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления»,
г. Улан-Удэ, Россия*

При переработке гидробионтов необходим биотехнологический подход, предполагающий полноценное использование специфических биологически активных веществ (БАВ), которыми так богато сырьё. В настоящее время ДНК и её производные являются объектами исследований с целью получения лекарственных препаратов и биологически активных добавок (БАДов) к пище (ДНКас и ДНКавит, «Биостим», «Лосось»). Значимость нуклеиновых кислот в жизнедеятельности человека подчеркивает доказанный факт торможения клеточного иммунитета у лиц, исключаящих их из питания даже при сохранении его достаточной калорийности. К тому же у пожилых людей отмечаются снижение содержания низкомолекулярных нуклеиновых кислот и повышение активности нуклеаз. Дефицит нуклеиновых кислот оказывается дополнительным фактором усугубления иммунологических расстройств. Для получения препаратов ДНК в настоящее время изучаются молоки рыб, растительное сырьё, в частности биопрепараты производятся из молок лососевых и осетровых видов рыб.

Объектами наших исследований являлись основные промысловые рыбы Байкальского региона из семейства карповых такие как плотва, карась; семейства окуневых - окунь, налим (налимовые). При выделении нуклеопротеидных комплексов из гонад (молок) мороженых пресноводных рыб 3-4 стадии зрелости использовали запатентованный метод [1]. Массовую долю ДНК в готовом препарате определяли по стандартной методике с последующим использованием формулы при расчетах [2].

Полученные данные показали, что содержание ДНК у рыб Байкальского региона в отдельных случаях отличается от морских. Близкие значения наблюдаются у окуня (3,73%) и омуля (3,75%) с треской (3,75%), навагой (3,4%), минтаем (3%), однако у плотвы (1,5%), налима (1,25%) содержание ДНК гораздо ниже.

Применение высокомолекулярной ДНК в качестве БАД ограничено ее слабой растворимостью в воде, низкой биодоступностью, трудоемкой и многостадийной технологией выделения, требующей дорогостоящего оборудования и реактивов. Низкомолекулярная ДНК (молекулярная масса $2-5 \times 10^5$ Да) является значительно более дешевой и доступной для технологического получения, разрешена к применению как биологически активная пищевая добавка. Выделенная низкомолекулярная ДНК из молок пресноводных рыб представляет собой аморфный порошок светло-кремового цвета, растворимый в воде при нагревании и не растворимый в органических растворителях. Содержание нуклеиновых кислот в препарате достигает 68 – 75 %.

С помощью ВЭЖХ идентифицировали выделенные ДНК по препарату-стандарту ДНК (900 н.п.). Для идентификации пиков и количественного определения концентрации препаратов ДНК традиционно применяли методы соотнесения времен удерживания, интегрирование площади пиков, расшифровка УФ – спектров и соотнесение их с библиотеками спектров.

Значительную роль в процессе старения организма играют иммунологические механизмы и свободнорадикальное окисление. Проблема свободных радикалов и реакционноспособных кислородсодержащих частиц продолжает привлекать повышенное внимание учёных. Антиоксиданты играют важную роль в регуляции протекания свободно-радикальных превращений в организме, существенно влияя на его состояние, поэтому данным уникальным веществам и исследованию их антиокислительных свойств посвящено множество работ.

Использование препаратов, обладающих иммунокоррелирующими свойствами, позволит уменьшить предпосылки к развитию патологии в старости и тем самым уменьшить вероятность развития заболеваний.

Антиоксидантную активность в полученных препаратах определяли на приборе «ЦветЯуза-01-АА» (Биотехнологический центр ВСГУТУ). Наибольшее значение антиоксидантной активности констатировали в препарате ДНК из плотвы и окуня (значение ССА составило $2,5 \text{ мг/дм}^3$ и $1,43 \text{ мг/дм}^3$ соответственно); в препарате ДНК из окуня – $0,38 \text{ мг/дм}^3$.

Полученные результаты позволяют рекомендовать применение препарата ДНК для коррекции иммунодефицита и восстановления баланса между процессами перекисного окисления липидов и механизмами антиоксидантной защиты. БАД может быть рекомендована для нормализации показателей иммунной системы и профилактики состояний, сопровождающихся интенсификацией свободнорадикальных процессов.

Таким образом, молоки пресноводных видов рыб могут служить источником нуклеиновых кислот, наряду с молоками морских видов рыб. Использование их в качестве БАД к пище является весьма перспективным направлением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент РФ № 915446. Способ получения ДНК из молок рыб./ Гаймула М.А., Кална В.Х., Микстайс У.Я., Эпштейн Л.М. – Заявл. 10.10.80. Опубл. – 01.07.91.
2. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. / М.: изд. Мир. – 1976. – 412 с.
3. Позднякова Ю.М., Пивненко Т.Н., Захарова М.А., Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж., Давидович В.В. Сравнительный анализ содержания ДНК и ферментного состава в гонадах рыб Байкальского региона // Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). – Владивосток, 2010. - Т. 164.
4. Захарова М.А., Гомбоева С.В., Цыренов В.Ж. Исследование нуклеиновых кислот в гонадах пресноводных рыб Байкальского региона. // Вестник ВСГТУ. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2010.- № 2.

УДК 597.553.2:597

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИБРИОЗА У ЧЕРНОМОРСКИХ МИДИЙ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* НА ПОБЕРЕЖЬЕ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

Т.В. Безгачина

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»,
Москва, Россия*

В связи с ухудшением экологической ситуации в Черном море, у рыб, мидий, и в среде их обитания все чаще появляются возбудители различных инфекционных заболеваний.

Вибриоз является одним из самых опасных инфекционных заболеваний рыб и гидробионтов в пресной, солоноватой и морской воде. Впервые он был обнаружен у угрей в 1909 г. (Bergmann, 1909).

В ихтиопатологии известен «тепловодный» и «холодноводный» вибриоз. Возбудителем тепловодного вибриоза считается грамотрицательная бактерия – *Vibrio anguillarum*, и заболевание достигает максимума при t^0 воды 19-20 $^{\circ}\text{C}$.

Возбудителем «холодноводного» вибриоза или болезни «Хитра» является грамотрицательная бактерия *Vibrio salmonicida* (Egidius et al, 1981), имеющая более низкий температурный оптимум роста 12-16 $^{\circ}\text{C}$, чем *Vibrio anguillarum*, и при 25 $^{\circ}\text{C}$ роста ее не происходит (Holm et al, 1985).

Культуры штамма *Vibrio anguillarum* и *Vibrio salmonicida* периодически выделялись ВНИРО с начала 80-х годов из воды Черного моря в районе Северного Кавказа, а также у культивируемых рыб и рыб естественных популяций; а также у мидий данного бассейна; у радужной форели и среды ее обитания из морских садковых хозяйств и пресноводного хозяйства Балтийского региона; у радужной форели, культивируемой в садках Белого моря; также из воды и мидий Белого моря (район Сонострова Канда-лакшского залива, район Соловецких островов); а также у мидий Баренцева моря (Безгачина, Шумилов, Бондаренко 1995; Безгачина, 2000, 2006, 2007, 2009, 2010, 2010, 2012, 2013, 2014, 2014, 2014).

На Камчатке впервые вибриоз был обнаружен у дикой горбуши и в прибрежных водах Карагинского залива в 1993-1999 гг. (Пугаева, Устименко, Рудакова, Сазонов, 2000).

В Республике Карелия была отмечена вспышка вибриоза в 2006 г. у культивируемой радужной форели в садках в Белом море (Дрошнев, Завьялова, Гулюкин, Хлунов, 2012). В 2007 г. вибриоз вновь был отмечен на Камчатке у горбуши естественной популяции как в Карагинском заливе, так и в северо-западной части Тихого океана (Сергеенко, Надеева, Гаврюсева, 2008). В 2010 г. заболевание было обнаружено у северной двухлинейной и желтоперой камбалы (Бочкова, Гаврюсева, Овчаренко, Жукова, 2011).

В летний период 2014 г. ВНИРО изучало санаторно-эпизоотическое состояние культивируемых мидий Черного моря *Mytilus galloprovincialis* на побережье Северного Кавказа.

Для идентификации возбудителя «тепловодного» вибриоза была использована отечественная агглютинирующая сыворотка, изготовленная путем гипериммунизации кроликов антигеном из культуры штамма *Vibrio anguillarum*.

При постановке пластинчатой реакции агглютинации (РА) была выявлена агглютинация 42-х живых культур *Vibrio anguillarum* гомологичной агглютинирующей сывороткой при ее разведении 1:2-1:1600.

Также положительная реакция агглютинации была отмечена при постановке пробирочной реакции агглютинации 42-х 0,3% формализированных антигенов из выделенных культур штаммов *Vibrio anguillarum* в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мм по стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича с гомологичной агглютинирующей сывороткой при предельном ее титре антител 1:6400 (3 креста), что указывает на их высокую активность.

Формализированные антигены из полученных культур штаммов *Vibrio anguillarum* были исследованы на специфичность с агглютинирующими моновалентными и поливалентными адсорбированными и неадсорбированными сыворотками к гетерологичным культурам микроорганизмов. Таким образом была также выявлена строгая специфичность выделенных культур штаммов возбудителя вибриоза.

Для идентификации возбудителя вибриоза был применен и классический бактериологический метод, который указал на принадлежность его к виду *Vibrio anguillarum*.

ВНИРО совместно с Всероссийским государственным Центром качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ВГНКИ) научно-исследовательские работы по серодиагностике и вакцинопрофилактики вибриоза выполняли с 80-х годов.

В течение этого времени были созданы и испытаны следующие препараты: бивалентные и моновалентные агглютинирующие сыворотки для экспресс-диагностики культур штамма *Vibrio anguillarum* и *Vibrio salmonicida*; получен антиген для реакции иммунодиффузии (РИД) и эритроцитарный антиген для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА); разработан ИФА для идентификации культур штаммов *Vibrio anguillarum*.

Для профилактики и лечения «тепловодного» вибриоза рыб в лабораторных условиях была создана изначально отечественная инактивированная бивалентная вакцина, успешно прошедшая испытания в пресноводных и морских форелевых хозяйствах, как в Черноморском, так и в Балтийском регионах страны.

В дальнейшем ВНИРО, ВГНКИ и Щелковский биокомбинат г. Москвы была разработана реакторным методом промышленная отечественная бивалентная инактивированная вакцина против вибриоза рыб (патенты на изобретения № 2284830 и № 2284831 от 10 октября 2006 г.), испытанная в производственных условиях на рыбных хозяйствах России, которая может изготавливаться и использоваться для профилактики и лечения культивируемых рыб.

Также был изготовлен промышленным способом эритроцитарный антиген для диагностики вибриоза рыб в РНГА (патент № 2295974 от 27.01.2007 г.)

Данный антиген был применен и для контроля накопления титра антител в сыворотке рыб при обработке их промышленной бивалентной вакциной против вибриоза рыб.

Результаты проведенных исследований указывают на возможность применения культур штамма *Vibrio anguillarum* для производства лечебных и диагностических препаратов.

С помощью экспресс-методов серодиагностики вибриоза рыб возможна в кратчайшее время идентификация возбудителя вибриоза на рыбоводных хозяйствах, что позволит вовремя предотвратить распространение эпизоотии. В районе размещения марихозяйств необходимо постоянно выполнять микробиологический мониторинг мидий и среды их обитания.

Использование вакцины для профилактики и лечения рыб поможет улучшить их физиологическое состояние и сохранить значительное количество рыбных ресурсов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безгачина Т.В., Шумилов К.В., Бондаренко В.З. Идентификация возбудителей «тепловодного» и «холодноводного» вибриоза стальноголового лосося, культивируемого в Черноморском регионе на побережье Северного Кавказа в условиях ухудшения экологической среды // Тез. докладов Международного симпозиума по марикультуре в г. Краснодаре в п.Небуг. – Москва. – 1995. – С. 15-16.
2. Безгачина Т.В. Испытание на специфичность антигена, изготовленного из культуры штамма *Vibrio salmonicida* – возбудителя болезни «Хитра» лососевых рыб // Сб. научных трудов «Паразиты и болезни рыб», Москва. – Изд. ВНИРО. – 2000. – С.12-16.

3. Безгачина Т.В. О специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* – возбудителя вибриоза, идентифицированной в Черном море у мидий *Mytilus galloprovincialis* в районе Северного Кавказа в 2005 г. // Тез. докл. VII Всероссийской конференции по промысловым беспозвоночным, Мурманск, 9-13 октября 2006 г. Минсельхоз РФ, Агентство по рыболовству, Межведомственная ихтиологическая комиссия, Департамент рыбной промышленности Мурманской области, ВНИРО, ПИНРО, Москва: Изд. ВНИРО, – 2006. – С. 229
4. Безгачина Т.В. К вопросу о специфичности антигена из культуры штамма *Vibrio anguillarum* - возбудителя вибриоза идентифицированной в 2006 г. у мидий Черного моря. // Тез. докладов Международной научной конференции 5-8 июня 2007 г. "Естественные и инвазийные процессы формирования биоразнообразия водных и наземных экосистем", РАН. Южный Научный Центр. – Ростов-на-Дону. – 2007. – С. 46-47.
5. Безгачина Т.В. Выделение возбудителя вибриоза – культуры штамма *Vibrio anguillarum* у мидий Черного моря на побережье Северного Кавказа в летний период 2008 г. Тез. докладов X съезда Гидробиологического общества при РАН, Владивосток: - 2009 – С. 35
6. Безгачина Т.В. Серологическая идентификация возбудителя вибриоза культуры штамма *Vibrio anguillarum* у мидий Черного моря *Mytilus galloprovincialis* на побережье Северного Кавказа в осенний период 2007 г. // Тез. докл. Международной конференции (Иркутск, 20-25 сентября, 2010) «Проблемы экологии. Чтения памяти профессора М.М. Кожова». Иркутск: Иркутский государственный университет. - 2010. – С. 350
7. Безгачина Т.В. К вопросу о вибриозе – бактериальном заболевании мидий Белого моря // Материалы III Всероссийской морской научно-практической конференции «Стратегия развития России и национальной морской политики в Арктике» (Арктика 2010). – Мурманский государственный университет, Мурманск. – 2010. – С. 68-69.
8. Безгачина Т.В. Микробиологическое исследование мидий *Mytilus edulis* Баренцева моря в летний период 2010 г. // Тез. докл. XI Всероссийской конференции по проблемам рыбопромыслового прогнозирования, посвященной 150-летию со дня рождения Н.М. Книповича (22-24 мая 2012 г., г. Мурманск), Мурманск.: Издательство ПИНРО. – 2012. – (электронная версия).
9. Безгачина Т.В. К вопросу о выделении возбудителя «холодноводного» вибриоза *Vibrio salmonicida* от радужной форели, выращиваемой в Белом море в Республике Карелия//Материалы XXIX Международной конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера (27-29 марта 2013 г. Мурманск. Россия), Федеральное Агентство по рыболовству, Мурманск.: Изд. ПИНРО. – 2013.- С. 12-14.
10. Безгачина Т.В. Идентификация возбудителя вибриоза с применением серологических методов исследования//Материалы научной конференции, приуроченной к пятилетию открытия базовой кафедры ЮНЦ РАН «Технические средства аквакультуры в ДГТУ (17-18 февраля 2014 г.), ФГБОУ ВПО «Донской государственный технический университет», Ростов-на-Дону.: Изд. ЮНЦ РАН. – 2014. – С. 177-180.
11. Безгачина Т.В. Серологическая идентификация возбудителя вибриоза рыб // Материалы XIII Международной научно-практической конференции «Биоразнообразие и устойчивость живых экосистем» 6-11 октября 2014 г., г. Белгород. Россия, Белгородский государственный национальный исследовательский университет. – Белгород. – 2014. – С. 163-164.
12. Безгачина Т.В. О «холодноводном» вибриозе у черноморской мидии *Mytilus galloprovincialis* на побережье Северного Кавказа//Материалы Международной научной конференции «Актуальные вопросы рыбного хозяйства и аквакультуры бассейнов южных морей России», г.Ростов-на-Дону 1-3 октября 2014 г., ФГБОУ ВПО «Донской государственный технический университет», Ростов-на-Дону.: Изд. ЮНЦ РАН. – 2014. –С. 299-303.
13. Бочкова Е.В., Гаврюсева Т.В., Овчаренко Л.В., Жукова Л.А. Комплексные исследования состояния здоровья двух промысловых видов камбал Берингова моря // Сб. научных трудов «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб» Москва. – 2011. – С. 85-89.
14. Дрошнев А.Е., Завьялова Е.А., Гулюкин М.И., Хлунов О.В. Современная вакцинопрофилактика радужной форели против вибриоза. Российский ветеринарный журнал «Сельскохозяйственные животные», № 1, - Москва. – 2012. – С. 31-33.
15. Патент на изобретение № 2284830 от 10.10.2006. Приоритет от 18.04.2005. "Способ получения инактивированной вакцины против вибриоза рыб". РФ Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. – Москва. – 2006. - 6 с.
16. Патент на изобретение № 2284831 от 10.10.2006. Приоритет от 18.04.2005. "Инактивированная вакцина против вибриоза рыб". РФ Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. – Москва. – 2006. –6с.
17. Пугаева В.П., Устименко Е.А., Рудакова С.Л., Сазонов А.А. Вибриоз у дикой горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) в прибрежных водах Карагинского залива. // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и Северо-Западной части Тихого океана. – Петропавловск-Камчатский. – КамчатНИРО. – 2000. – вып. 5. – С. 175-180.

18. Сергеев Н.В., Надеева О.А., Гаврюсева Т.В. Санитарно-эпидемиологическое состояние популяций тихоокеанских лососей Камчатки. // Материалы Международной конференции: "Современное состояние водных биоресурсов" 26-28 марта 2008 г., г. Новосибирск. – Новосибирский Государственный Аграрный Университет. ФГУП "Росрыбцентр". – Новосибирск. – 2008. – С. 387-391.

19. Bergmann A.M. Die rote Beulenkrankheit des Hals// Ber. Kgl. Bayer. Biol. Versuch – München. – 1909. – 2. P. 10-54.

20. Egidius E., Andersen K., Clansen E., Roa J. Cold-water vibriosis or "Hitra disease" in Norwegian salmonid farming // J. Fish Diseases. – 4. – N.4-1981- P. 353-354.

21. Holm K.O., Strøm E., Stensvåg K., Roa I., Iørgensen T. Characteristics of a *Vibrio* sp. Associated with the "Hitra disease" of Atlantic salmon in Norwegian fish farms // "Тёбё кэнкю FishPathol". – V. 20. – N. 2-3. – 1985. – P. 125-129.

УДК 579.6

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СПОСОБНОСТЬ РОДОККОКОВ, ВХОДЯЩИХ В БИОПРЕПАРАТ «МИКРОБАК», ПРОДУЦИРОВАТЬ ГЛИКОЛИПИДНЫЕ БИОСУРФАКТАНТЫ

Т.М.Льонг¹, И.А.Нечаева¹, О.Н.Понаморева¹, К.В.Петриков²

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина» РАН, Пущино, Россия

Одним из наиболее распространенных загрязнителей в современном мире является нефть и нефтепродукты из-за больших объемов добычи, транспортировки, переработки углеводородов. В России большие запасы нефти расположены в районах Западной Сибири и Арктики, разрабатывать эти месторождения приходится в суровых климатических условиях, при этом неизбежны разливы нефти. Перспективным способом очистки почв и водоемов от нефтепродуктов является внесение активных микроорганизмов-деструкторов в виде биопрепарата в места загрязнения. Микроорганизмы-нефтедеструкторы способны продуцировать биосурфактанты, что расширяет их адаптивные механизмы при росте на гидрофобных субстратах [1]. Одним из эффективных биопрепаратов для очистки нефтезагрязнённых территорий в условиях холодного климата является "Микробак", в состав которого входят родоккоки, способные продуцировать гликолипидные биосурфактанты в окружающую среду [2]. Следует отметить, что нам не удалось найти почти никакой информации о влиянии температуры на способность психротрофных бактерий продуцировать биосурфактанты при росте на гидрофобных субстратах. Выяснение влияния температуры окружающей среды на способность микроорганизмов *Rhodococcus* sp. S67 и *Rhodococcus* sp.X5, входящих в биопрепарат «Микробак», продуцировать гликолипидные биосурфактанты, как один из возможных механизмов адаптации бактерий-нефтедеструкторов к условиям холодного климата, является актуальной задачей для разработки биотехнологий очистки нефтезагрязнённых территорий, расположенных в Арктике.

При выращивании родоккоков на гексадекане в жидкой среде наблюдали формирование разных структур биомассы бактерий как при 26 °С, так и при 6 °С (рис. 1).

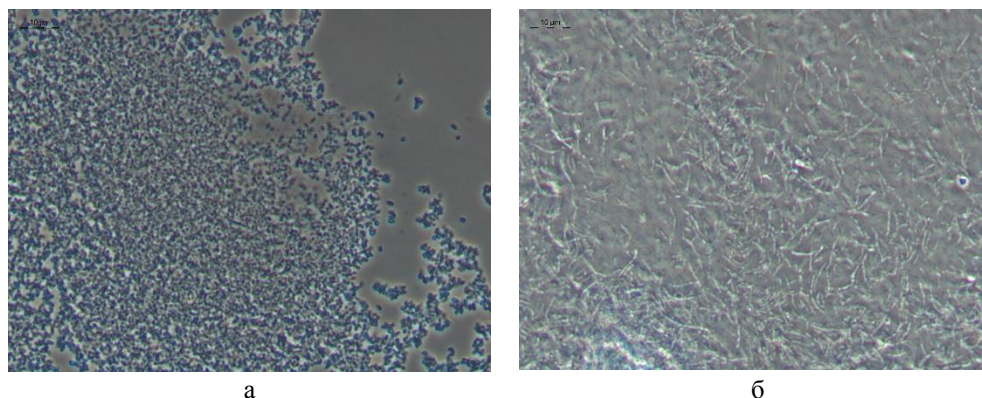


Рисунок 1. Микрофотографии родоккоков, выращиваемых в течение 6 суток на гексадекане в жидкой среде при 6°С: а - *Rhodococcus* sp.X5; б - *Rhodococcus* sp. S67

Бактерии X5 локализованы на границе раздела фаз гексадекан-вода, в то время как клетки S67 располагаются в центре гидрофобной капли. Кроме того, температура среды в значительной степени влияет на морфологию бактерий S67: клетки приобретают вытянутую форму и образуют цепочки. Гидрофобность клеточной стенки *Rhodococcus* S67 выше, чем у *Rhodococcus* X5. Это определяет их физиологическое поведение в культуральной среде. Известно, что родоккокки продуцируют трегалолипиды при росте на гидрофобных субстратах [2]. Для сравнительной оценки способности родоккокков продуцировать гликолипиды в среду проводили экстракцию из культуральной среды и определение гликолипидов методом тонкослойной хроматографии. При нанесении на хроматографическую пластину одинаковых аликвот экстракта определяли относительное количество гликолипидов в зависимости от температуры культивирования по интенсивности окраски полос на хроматограмме. На хроматограмме можно различить несколько компонентов гликолипидных природы, два из которых являются основными (рис.2).

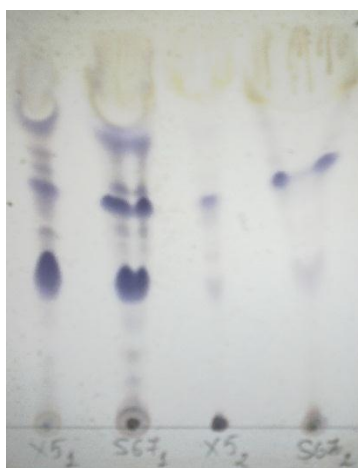


Рисунок 2 - Хроматограмма гликолипидов, продуцируемых родоккокками:
● X5₁, S67₁ (26°C); ● X5₂, S67₂ (10°C)

При пониженной температуре снижается способность бактерии продуцировать гликолипиды, но изменяется соотношение двух основных компонентов. Такие различия в биохимическом поведении родоккокков в зависимости от температуры обнаружены впервые. Это может быть одним из механизмов адаптации бактерий к условиям низких температур и является отправной точкой для дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banat, I. M., A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M. G. Martinotti, L. Fracchia, T. J. Smyth, R. Marchant. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010. 87(2): p. 427-44.
2. Petrikov K., Delegan Ya., Surin A., Ponamoreva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure. *Process Biochemistry*. - 2013, N. 48, P. 931–935

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ИНУЛИНАЗЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ЭНЕРГОСБЕРЕЖЕНИЯ

И.В. Мажулина¹, А.А. Шевцов², Т.Н. Тертычная¹, С.Ф. Яковлева²

¹ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I»,
Воронеж, Россия

²ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»,
Воронеж, Россия

Основами государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 г. ставится задача модернизации и интенсификации перерабатывающей промышленности с целью обеспечения продовольственной безопасности страны за счет развития фундаментальных исследований в области современных биотехнологических способов получения продукции повышенной пищевой ценности с новыми функционально-технологическими свойствами.

Особое место в биотехнологических процессах пищевой технологии отводится мембранному разделению жидких сред с возможностью их концентрирования при обычной температуре без термического воздействия на их физиологическое и химическое состояние.

Недостаточное изучение общих закономерностей совместно протекающих процессов культивирования, ультрафильтрации и вакуум-сублимационной сушки ферментных препаратов сдерживает разработку и использование новых, перспективных технологий, позволяющих интенсифицировать все ее стадии с рациональным использованием энергетического потенциала и обеспечением высокого качества получаемого продукта.

Для получения ферментного препарата (ФП) инулиназы единственно приемлемым энергоподводом является вакуум-сублимационная сушка, поскольку этот препарат чрезвычайно чувствителен к действию повышенных температур.

Важной стадией перед сушкой является ультрафильтрация культуральной жидкости, полученной глубинным культивированием микроорганизмов. При этом ультрафильтрация позволяет удалить низкомолекулярные белки, повысить содержание сухих веществ и активность фермента инулиназы.

Разработана статистическая модель процесса ультрафильтрации инулиназы бактерий *Bacillus polymyxa* 29, в которой в качестве критериев оптимизации использованы такие важные показатели, как удельные энергозатраты; расход, массовая доля СВ и активность инулиназы в концентрате на выходе из мембраны.

Для решения поставленной задачи использовалась пилотная установка мембранной фильтрации, предназначенная для определения основных условий организации процесса в широком диапазоне изменения режимных параметров.

Основным конструктивным элементом установки являются керамические мембраны INSIDE CéRAM™ фирмы «TAMI Deutschland GmbH», которые по сравнению с полимерными имеют значительные преимущества:

- стойкость к избыточному давлению (свыше 100 бар);
- использование инертного материала;
- высокая механическая прочность, в том числе к воздействию абразивных частиц и бактерий;
- работа при более высоких температурах;
- гарантируемая с высокой достоверностью производительность.

В качестве основных факторов, влияющих на процесс ультрафильтрации, были выбраны массовая доля сухих веществ (СВ) в исходном растворе (X_1) $C_n = 5 \dots 8 \%$; активность инулиназы в культуральной жидкости (X_2) $A_n = 32 \dots 40$ ед/см³; разрешающая способность мембраны (X_3) $D = 20 \dots 300$ кДа; расход исходного раствора (X_4) $G_n = 0,022 \dots 0,030$ м³/с. Все эти факторы совместимы и некоррелированы между собой. Выбор интервалов изменения факторов обусловлен технологическими условиями процесса ультрафильтрации продуцента инулиназы, а также технико-экономическими показателями процесса.

Критериями оценки влияния различных факторов на процесс ультрафильтрации были выбраны Y_1 – удельные энергозатраты на прокачку раствора, отнесенные на 1 м³ пермеата, мДж/м³; Y_2 – расход концентрата на выходе из мембраны, м³/с; Y_3 – массовая доля СВ в концентрате, %; Y_4 – активность инулиназы в концентрате, ед/см³. Математическими методами моделирования установлены рациональные интервалы исследуемых факторов: $X_1 = 6,5 \dots 7,5$ %; $X_2 = 37 \dots 39$ ед/см³; $X_3 = 100 \dots 230$ кДа; $X_4 = 0,023 \dots 0,027$ м³/с.

Установлены кинетические закономерности процесса вакуум-сублимационной сушки ферментного препарата инулиназы *Bacillus polymyxa* 29. Решена математическая модель нестационарного процесса десублимации при вакуум-сублимационной сушке ФП, позволяющая прогнозировать изменение толщины десублимата и коэффициента теплообмена во времени на межфазной поверхности десублиматора.

Предложен алгоритм управления биотехнологией получения ферментных препаратов на базе паро-компрессионного теплового насоса, обеспечивающий повышение энергетической эффективности совместно протекающих процессов ферментации и вакуум-сублимационной сушки (Пат. РФ № 2480520, Пат. РФ № 2484129), обеспечивающий повышение энергетической эффективности совместно протекающих процессов культивирования, ультрафильтрации и вакуум-сублимационной сушки.

Получен препарат инулиназы с активностью 1315-1325 ед/г. Исследован процесс кислотной и термической инактивации препарата. При 40 °С и pH 7,0 активность фермента за 120 ч снижалась на 25,0 % и на 55,0 % при pH 6,0. Инулополимерксин можно использовать для гидролиза инулинсодержащего сырья до фруктозы с целью замены сахарозы в рецептурах продуктов питания диабетического назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шевцов А.А. Выбор оптимальной загрузки сублиматора по величине удельных энергозатрат при вакуум-сублимационной сушке ферментного препарата инулиназы / А.А. Шевцов, И.В. Мажулина // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2012. – №1. – С. 16-21.
2. Шевцов А.А. Выбор рациональных параметров процесса ультрафильтрации инулиназы *Bacillus polymyxa* 29 / А.А. Шевцов, А.И. Ключников, А.В. Дранников, И.В. Мажулина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2013. – № 7. – С. 30-33.
3. Шевцов А.А. Математическая модель десублимации при вакуум-сублимационной сушке / А.А. Шевцов, Ю.Н. Золотарев, И.В. Мажулина // Известия вузов. Пищевая технология. – 2013. – № 4. – С. 93-95.

УДК [664.2 : 582.736.3]

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЙ ПЕРЕРАБОТКИ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПРОИЗВОДСТВА ГОРОХОВОГО КРАХМАЛА

Н.В. Шелепина

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный институт экономики и торговли», Орел, Россия

Разработанная нами технология извлечения нативных крахмалов из зерна гладко- и морщинистосемянных форм гороха [2] предполагает получение таких побочных продуктов как семенные оболочки и зародыши, представляющие собой биологически ценное сырье, которое может найти применение в других отраслях промышленности.

В процессе замачивания зерна активизируются ферменты, которые расщепляют сложные запасные вещества на более простые (аминокислоты, жирные кислоты, простые сахара), при этом значительно возрастает содержание витаминов, синтезируемых зародышем. Необходимость максимального отделения зародыша в процессе производства крахмала обусловлена высокой активностью и лабильностью содержащихся в нем соединений, следствием чего является высокая окисляемость и гидролизуемость липидного комплекса, что приводит к снижению качества получаемых крахмалопродуктов [1].

Зародыши, полученные в процессе переработки зерна гороха на крахмал, высушивали при температуре 18 ... 20°С до влажности не более 11,0 %, измельчали с помощью лабораторной мельницы ЛЗМ-1М до тонкой муки, просеивали через сито из шелковой ткани №43 и упаковывали в бумажные пакеты.

Дальнейшие исследования показали, что данное вторичное сырье отличается повышенным содержанием белка, липидов, жирорастворимых витаминов А и Е, каротиноидов, витамина В₁. Белки зародышей полноценны по таким незаменимым аминокислотам как треонин, лейцин, тирозин, фенилаланин и лизин [4].

Семенные оболочки как побочный продукт переработки зерна гороха, являются перспективным сырьем для получения пектиновых веществ.

Подготовка оболочек гороха к выделению пектина заключалась в их очистке от механических примесей, а при влажности более 8,0 % – сушке при температуре не более 80°C; хранении и измельчении.

Нами установлено, что оболочки гороха, предназначенные для извлечения пектиновых веществ, могут храниться в течение 10 мес. при относительной влажности воздуха не более 70,0 % и температуре 5 ... 20°C [3]. Измельчение оболочек до размера частиц не более 1 мм способствует наиболее полному извлечению пектиновых веществ из подготовленного сырья.

При исследовании различных концентраций раствора соляной кислоты для гидролиза-экстрагирования пектина из оболочек гороха установлено, что 2,0 %-ная концентрация соляной кислоты является оптимальной для данного процесса, так как обеспечивает наибольший выход пектиновых веществ из сырья.

Гидролиз-экстрагирование пектиновых веществ проводили 2,0 %-ным водным раствором соляной кислоты при гидромодуле 1:7, рН 1,2 ... 1,5, температуре гидролизуемой смеси 75 ... 78°C. Продолжительность гидролиза составила 110 ... 120 мин [3].

По окончании гидролиза полученный гидролизат центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об./мин с получением твердой фазы и пектинового экстракта. Твердую фазу многократно промывали водой до рН 7,0, высушивали и просеивали, получая нерастворимые пищевые волокна. Пектиновый экстракт охлаждали до комнатной температуры.

Коагуляцию пектина проводили этиловым спиртом 96,0 % об. при температуре 8 ... 10°C в течение 10 мин. Образующийся осадок пектина отделяли от спиртового раствора путем фильтрования. На следующей стадии производили двухфазную очистку пектина с использованием этилового спирта концентрацией 70,0 и 96 % об. по 30 мин, соответственно.

Затем пектин высушивали при температуре 18 ... 20°C в течение 5 ... 6 ч до влажности не более 13,0 %, измельчали до частиц размером не более 0,5 мм и просеивали через сито из шелковой ткани №140, получая порошок светло-желтого цвета, который упаковывали в бумажные пакеты. Хранение пектина осуществляли при температуре 5 ... 20°C и относительной влажности воздуха не более 70,0 % вследствие его высокой гигроскопичности. Продолжительность хранения пектина составляла не более 12 мес.

Качественные характеристики пектиновых веществ, выделенных из семенных оболочек гороха, соответствуют требованиям к высокоэтерифицированным пектинам [2]. Также они отличаются повышенной сорбционной способностью по отношению к ионам тяжелых металлов, что определяет целесообразность их использования в составе пищевых продуктов функционального назначения.

Таким образом, реализация технологий переработки побочных продуктов производства крахмала позволяет не только снизить экологический и экономический ущерб от неиспользованных отходов, но и повысить биологическую ценность и расширить ассортимент пищевых продуктов.

Результаты исследований получены в рамках государственного задания Минобрнауки России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шаззо, А.А. Разработка технологии переработки зародышей зерна кукурузы и изучение потребительских свойств получаемых продуктов и БАД. автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.18.15 / Шаззо Адам Асланович. – Краснодар, 2011. – 27 с.
2. Шелепина, Н.В. Научно-практическое обоснование эффективных способов переработки зерна современных сортов и форм гороха. автореф. дис. ... доктора с.-х. наук: 05.18.01 / Шелепина Наталья Владимировна. – Мичуринск-научоград РФ, 2014. – 33 с.
3. Шелепина, Н.В. Разработка технологии и оценка качества пектиновых веществ из семенных оболочек зерна гороха / Н. В. Шелепина // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия. Естественные, технические и медицинские науки. – 2013. – №6 (56). – С. 182-186.
4. Шелепина, Н.В. Характеристика зародышевых продуктов из зерна гороха / Н.В. Шелепина // Вестник КрасГАУ. – 2013. – №8. – С. 90-94.

УДК 602.4:628.35:664

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЛИТИЧЕСКИХ И МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕДИАТОРНОГО БПК-БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ АКТИВНОГО ИЛА*А.С. Зайцева, А.Д. Туровская, В.А. Арлянов**ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия*

Определение биохимического потребления кислорода (БПК) в воде является важным параметром контроля загрязненности воды. В настоящее время существует несколько стандартных методик определения БПК [1], которые характеризуются значительной сложностью и продолжительностью анализа (от 5 до 20 суток); высокой погрешностью измерений (от 13 до 25 %). По данным причинам возможны экологически опасные ситуации. В связи с этим возникает необходимость в создании простого, высокоточного и экспрессного метода определения БПК с возможностью дальнейшей автоматизации. Таким методом является определение БПК с помощью биосенсоров [2-3], однако использование таких устройств сильно ограничено высоким значением нижней границы определяемых концентраций, которое находится в пределах 5-6 мг/дм³, что недостаточно для анализа очищенных сточных вод, где значение БПК составляет 0,5-1 мг/дм³.

Целью данной работы является разработка экспресс-анализатора для определения биохимического потребления кислорода на основе медиатора нейтрального красного и клеток микроорганизмов активного ила.

В основу лабораторной модели БПК-биосенсора положен амперометрический метод анализа регистрации окислительной активности биологического материала. Данный подход позволяет производить высокоточные измерения в микроамперном диапазоне токов, используя миллиграммовые количества биомассы. В измерительную ячейку с растворенным медиатором нейтральным красным в калий-натрий фосфатном буферном растворе (рН 6,8) помещены рабочий угольно-пастовый электрод с адсорбированными клетками микроорганизмов и хлоридсеребряный электрод сравнения. Электроды подключены к гальванопотенциостату «IPC Micro», поддерживающему в системе постоянный потенциал 335 мВ. При введении аналита, микроорганизмы окисляют его, образованные электроны переносятся на рабочий электрод посредством медиатора, при этом возрастает сила тока в системе, амплитуда которой выбрана в качестве аналитического сигнала.

В данной работе предлагается использовать одноклеточные микроорганизмы активного ила, так как они способны потреблять тот или иной компонент загрязнённой пробы, что позволяет повысить универсальность анализа. В качестве медиатора выбран нейтральный красный, использование которого приводит к снижению рабочего потенциала измерений с 700 мВ (кислородный электрод) до 335 мВ (электрод на основе нейтрального красного), что позволяет снизить риск протекания побочных реакций с участием электроактивных примесей.

Впервые определены характеристики рецепторного элемента, сформированного на основе клеток активного ила, полученного с очистных сооружений Тульского Городского Водоканала, адсорбированного на угольно-пастовый электрод. Относительное стандартное отклонение амплитуды изменения силы тока, генерируемого в системе, в результате добавления субстрата составляет 2,5%, что указывает на стабильность получаемого аналитического сигнала (допустима величина относительного стандартного отклонения 5%). Сенсор калибровали по стандартному раствору глюкозо-глутаматной смеси (ГГС), содержащей суммарно 300 мг/дм³ глюкозы и глутаминовой кислоты (1:1), что соответствует значению БПК 205 мг/дм³, согласно ПНДФ [1]. Диапазон определяемых значений БПК, регистрируемый разработанным сенсором составил 0,01-140 мг/дм³, что позволяет использовать данное устройство для экспресс-анализа очищенных вод. Показано, что рецепторный элемент на основе активного ила в условиях медиаторного переноса электронов способен окислять широкий спектр органических соединений, что приводит к воспроизводимости результатов анализа полученных с использованием разработанного сенсора и результатов стандартного метода. При апробации разработанного сенсора на образцах сточных вод очистных сооружений установлено, что полученные результаты имеют высокую корреляцию со стандартной методикой ($R=0,9997$), при этом время анализа сокращено с 5 суток до 5-10 минут. Срок эксплуатации рецепторного элемента не менее 58 суток, что соизмеримо с параметрами современных аналогов. Разработанный БПК-биосенсор превосходит мировые коммер-

ческие аналоги («QuickBOD α1000», «BOD-3300», «HABS-2000», «ARAS», «BODypoint» [3]) по чувствительности (нижняя граница определяемых значений БПК 0,004 мг/дм³), что позволяет применять данный анализатор для экспресс-анализа очищенных вод. Лабораторная модель БПК-сенсора может в дальнейшем использоваться для оснащения промышленных предприятий, систем водоочистки, службами санитарно-эпидемиологического контроля.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», проект № 14.574.21.0062 и гранта РФФИ, договор № Ор 15-38-50976/15.

ЛИТЕРАТУРА

1. ПНДФ 14 1:2:3:4. 123-97. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде в пресных, подземных, питьевых, сточных и очищенных сточных водах. М., 1997. 25с.
2. Jouanneau S. et al. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review //Water research. – 2014. – Т. 49. – С. 62-82.
3. Арляпов В.А., Каманин С.С., Алферов С.В., Алферов В.А. Устройство для экспресс-определения биохимического потребления кислорода. Патент РФ № 106898 от 27.07.2011

УДК 664

ЭНЕРГОЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИЗКОЛАКТОЗНОЙ ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОЙ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Е.В. Славоросова, В.Г. Куленко, В.Б. Шевчук, Е.А. Фиалкова

*ФГБОУ ВПО "Вологодская государственная молочнохозяйственная академия имени Н.В. Вережанина",
Вологда, Россия*

Молочная промышленность является одной из энергоемких отраслей промышленности. Кроме того, в последние годы все актуальнее становится вопрос дефицита молочного сырья в связи с чем, возникает необходимость в более рациональном его использовании. Поэтому все чаще обращаются к одной из самых острых на сегодняшний день, даже для промышленно развитых стран, проблеме рационального использования молочной сыворотки – вторичного молочного сырья при производстве, преимущественно, сыра и творога.

Молочная сыворотка, содержит около 50% наиболее ценных сухих веществ молока. Практически вся лактоза, легкоусвояемые сывороточные белки, содержащие незаменимые аминокислоты, минеральные вещества и большая часть витаминов переходят из молока в сыворотку. В то же самое время, обладающая уникальными пищевыми свойствами, не переработанная, сливаемая в водоемы сыворотка является сильнейшим загрязняющим агентом, так как органические вещества сыворотки для своего окисления потребляют очень большое количество кислорода, ухудшая тем самым условия развития флоры и фауны водоемов, так, к примеру, 1 т сыворотки по сложности утилизации соответствует 100...150 т бытовых сточных вод. Таким образом, предприятия молочной промышленности могут явиться источниками интенсивного загрязнения гидросферы. [1,2]. Здесь следует еще раз отметить, что с сывороткой теряется половина сухих веществ молока, переработанного на творог, или сыр. Причем это наиболее ценные его пищевые ингредиенты. Предприятия же, перерабатывающие сыворотку, во-первых, освобождаются от штрафных санкций за слив сыворотки со сточными водами, Во-вторых, получают дополнительно весомое количество бесплатного молочного сырья, в-третьих, не нарушают экологию, в-четвертых, повышают пищевую ценность выпускаемых продуктов, т. к. насыщают ценнейшими легкоусвояемыми сывороточными белками и другими ценнейшими ингредиентами. Таким образом, решение вопросов переработки сыворотки, особенно с применением энергосберегающих технологий является, в настоящее время, весьма актуальным.

Особенно прибыльной для предприятий может быть переработка сыворотки и ее использование в производстве гуманизированных пищевых продуктов. Однако, избыточное количество солей и лактозы в натуральной сыворотке делает невозможным широкое применение ее в качестве основных ингредиентов для таких продуктов. Удаление же солей и избыточной лактозы из сыворотки может сделать ее незаменимой основой продуктов функционального назначения. Целью работы является разработка энергосберегающей технологии производства низколактозной деминерализованной молочной сыворотки.

В настоящее время известно несколько способов освобождения сыворотки от избыточной лактозы и солей. Например, известен способ производства сухой делактозированной деминерализованной сыворотки, которая является вторичным продуктом производства лактозы из сыворотки. При этом сыворотку освобождают от избыточного количества белка, концентрируют вакуум выпариванием, кристаллизуют, отделяют кристаллы лактозы, далее деминерализуют и сушат. Содержание белка в полученном продукте достигает 35% [3].

Известен патент США на способ производства продукта из молочной сыворотки, который включает следующие этапы: поступление сыворотки, электродиализ, вакуум-выпаривание, кристаллизацию, центрифугирование. Электродиализ позволяет удалить 30- 50% солей. Вакуум-выпаривание концентрирует сыворотку до 40-60% содержания сухих веществ, что обеспечивает эффективность процесса кристаллизации лактозы. Полученный концентрат охлаждают до осаждения не менее 40% сухих веществ. Осажденную лактозу отделяют путем фильтрации, декантации или на центрифуге [4].

Нами разработан новый энергосберегающий способ получения низколактозной деминерализованной молочной сыворотки, включающий следующие этапы: поступление сыворотки, нанофильтрацию, кристаллизацию, совмещенную с выпариванием, отделение лактозы центрифугированием с возможной последующей сушкой обоих продуктов как лактозы, так и низколактозной деминерализованной сыворотки. Нанофильтрация является наиболее энергоэффективным и не нарушающим состава сыворотки способом концентрирования продуктов. Одновременно с концентрированием сыворотки при нанофильтрации осуществляется и частичная деминерализация, при этом сохраняются все остальные составные части сыворотки. Использование нанофильтрации позволяет удалить до 50 % солей и 80 % влаги, а также сконцентрировать сыворотку до 25-30 % содержания сухих веществ [5].

В соответствии с предлагаемым способом разработан кристаллизатор с воздушным и водяным охлаждением и подогревом, в котором наряду с оптимизацией процесса кристаллизации имеет место интенсивное выпаривание кристаллизата.

Аппарат состоит из двух колонок. Внутри колонок расположены барботеры, представляющие собой перфорированные цилиндрические вставки с тангенциальной подачей горячего воздуха с температурой 60°C и холодного воздуха с температурой 10°C. Для этого отверстия в барбатере располагаются по касательной к внутренней поверхности вставок. Такая конструкция барбатера позволяет закручивать кристаллизат внутри колонки, увеличивая скорость движения кристаллизата, создавая при этом лучшие условия для кристаллизации. Горячий и холодный воздух получается при прохождении воздуха с комнатной температурой через вихревую трубу Ранка-Хильша. Одновременно с воздухом в рубашку каждой колонки подается горячая или ледяная вода. В рубашке расположена направляющая, благодаря которой вода циркулирует, закручиваясь в противоположную сторону от вращения продукта в колонке. Установка работает в циклическом режиме. В каждом цикле осуществляется попеременное охлаждение и нагревание каждой колонки. Холодный воздух барботируется через слой насыщенного раствора лактозы, а холодная вода подается в рубашку колонны, обеспечивая кристаллизацию раствора. Аналогичным образом, с помощью горячего воздуха и горячей воды получают высокую температуру насыщенного раствора лактозы, обеспечивая его выпаривание. По истечении половины цикла осуществляется реверс подачи теплоносителей: холодные воздух и вода начинают подаваться во вторую колонну, а горячие – в первую [6]. Циклический режим работы обеспечивает равномерное выпаривание раствора и кристаллизацию лактозы в каждой колонке, кроме того, циклические колебания температуры интенсифицируют процесс кристаллизации лактозы, увеличивая её выход и позволяя получить равномерный гранулометрический состав, и повышает производительность установки [7].

Предполагается постепенно заполнять кристаллизатор сывороткой, сгущенной до содержания сухих веществ 20-30 % и обессоленной на нанофильтрационной установке. В процессе кристаллизации уже подсушенная при нанофильтрации сыворотка будет концентрироваться до содержания сухих веществ 55% [8].

Отличительной особенностью данного кристаллизатора является возможность концентрирования сыворотки в процессе кристаллизации, что позволяет заменить дорогостоящее вакуум-выпаривание нанофильтрацией, с последующим выпариванием в кристаллизаторе. Благодаря снижению расхода пара и воды экономическая эффективность предложенного способа повышается в несколько раз по сравнению с традиционным способом.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Мусульманова, М.М., Элеманова, Р.Ш. Аксупова, А.М. Биотехнологические приемы в области переработки молочной сыворотки [Электронный ресурс]/ М.М. Мусульманова, Р.Ш. Элеманова, А.М. Аксупова// Фундаментальные и прикладные аспекты создания биосферосовместимых систем: материалы международной научно-технической интернет-конференции. - Орел: Госуниверситет – УНПК, 2013. – с. 170-175.
2. Дымар, О. В. Переработка молочной сыворотки в Белоруссии./ О.В. Дымар //Переработка молока. -№8. -2011.
3. Евдокимов, И. А. Перспективы и особенности организации переработки сыворотки за рубежом и в России./ И. А. Евдокимов, М. С. Золоторева, Д. Н. Володин, В. К. Топалов // Переработка молока. - №8. -2011.
4. Патент США. Обработка сыворотки № 3615664. Кл. 99-57 МКИ (А 23с 21/00) Заявл. 5.12.69. Опубл. 26.10.71.
5. Славоросова Е.В. Научное обоснование перспективного направления переработки молочной сыворотки./ Е.В. Славоросова, В.Г. Куленко, Е.А. Фиалкова [и др.] Инновационные тенденции развития российской науки: материалы VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых/под общ. ред. А.Г.Миронова; Краснояр. гос. аграр. ун-т. –Красноярск. -2015. с.251-254.
6. Заявка на изобретение №2015112559 (019676) «Кристаллизатор-выпариватель»/ Куленко В.Г., Шевчук В.Б., Славоросова Е.В., Фиалкова Е.А. ; заявитель ВГМХА имени Н.В. Верещагина. - заявл. 06.04.2015 г.
7. Бажал, И.Г. Интенсификация изогидрической кристаллизации при помощи принудительной рекристаллизации [Текст]/ И.Г.Бажал [и др.] // журнал «Прикладная химия». - 1973, - №9.
8. Заявка на изобретение №2015109584 (015171) «Способ переработки молочной сыворотки»/Куленко В.Г., Шевчук В.Б., Славоросова Е.В., Дыкало Н.Я., Фиалкова Е.А. ; заявитель ВГМХА имени Н.В. Верещагина. - заявл. 18.03.2015 г.

УДК 662.73

ПРОДУКТЫ ПРЕВРАЩЕНИЯ УГЛЕВОДОВ СОЛОМЫ ПШЕНИЦЫ

Е.В. Чечикова, С.Н. Евстафьев

*ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет»,
Иркутск, Россия*

Субкритический автогидролиз можно рассматривать как экологичный метод извлечения углеводов из лигноцеллюлозного сырья. Неизбежными процессами, протекающими при термическом воздействии на такие компоненты как моносахариды, являются их вторичные превращения.

Целью работы явилось изучение влияния температуры обработки соломы пшеницы водой в субкритических условиях на состав продуктов превращения углеводов.

В работе использовали солому пшеницы, собранную по окончании вегетационного периода на территории Иркутской области. Эксперименты выполняли в статическом режиме на лабораторной экстракционной установке в интервале температур 140-350 °С, давлении 30 МПа и продолжительности 10 минут. В результате автогидролиза получали жидкие и твердые продукты.

Установлено, что в условиях автогидролиза при температурах до 200 °С основным процессом является гидролиз полисахаридов, с образованием моно- и олигосахаридов, среди которых преобладают продукты гидролиза гемицеллюлоз, а при повышении температуры - вторичные превращения сахаров с образованием спиртов, оксикислот и продуктов дегидратации углеводов. По данным метода ГХ-МС кроме моно- и олигосахаридов в составе жидких продуктов присутствуют алканы, аминокислоты, многоатомные спирты, одно-, двух- и трехосновные и высшие карбоновые кислоты, гидроксикислоты, а также ароматические (фенольные) соединения. Суммарное содержание этих соединений в составе жидких продуктов зависит от температуры автогидролиза.

Независимо от условий автогидролиза преобладающими являются спирты и карбоновые кислоты. Четко прослеживается увеличение доли карбоновых кислот, спиртов и ароматических соединений с повышением температуры (таблица 1).

Т а б л и ц а 1

Компонентный состав жидких продуктов автогидролиза соломы пшеницы, в % отн.

Наименование	Температура, °С			
	140	200	270	330
Карбоновые кислоты:	7,9	11,2	11,7	15,5
Одноосновные	0,4	0,3	2,7	5,0
Двухосновные	2,6	3,7	5,7	5,2
Трехосновные	0,6	1,4	0,0	0,0
Оксикислоты	4,0	5,7	2,8	4,7
Аминокислоты	0,3	0,1	0,5	0,5
Спирты	8,5	11,8	10,8	18,5
Ароматические соединения	1,4	1,4	6,0	8,1
Алканы	0,2	0,0	0,2	0,2
Лактоны	2,3	3,8	2,2	3,7

Оксикислоты и карбоновые кислоты могут быть продуктами разложения биомассы соломы, углеводов и аминокислот. Среди оксикислот в преобладающих количествах содержатся яблочная и глицериновая. Валериановая, энантовая, пальмитиновая, олеиновая и стеариновая карбоновые кислоты составляют большую долю среди одноосновных карбоновых кислот. Содержание двухосновных карбоновых кислот в составе жидких продуктов выше и колеблется в пределах от 33 до 49 % отн. от суммы идентифицированных карбоновых кислот. Из двухосновных карбоновых кислот в преобладающих количествах присутствуют янтарная, фумаровая и глутаровая. Трехосновные карбоновые кислоты представлены изолимонной кислотой. Можно предположить, что присутствующие разнообразные кислоты влияют на значения рН-среды жидких продуктов автогидролиза соломы. Данная закономерность наблюдалась для автогидролиза в динамических условиях [2].

Источником алканов (C_{12} - C_{16}), спиртов и жирных кислот вероятнее всего является жирно-восковой слой, который находится на поверхности соломины и легко разрушается уже при низких температурах автогидролиза. Среди спиртов обнаружены глицерин, 2-метил-бутандиол-1,3, сорбит, инозитол и некоторые другие.

Аминокислоты (валин, серин, глицин, аминомалоновая кислота и глутамин), также присутствующие среди идентифицированных соединений, относятся к экстрактивным веществам соломы и образуются вследствие деполимеризации растворимых в воде белков и пептидов, что согласуется с литературными данными [3].

Вещества ароматической природы, такие как бензойная, 3-оксibenзойная, ванилиновая, сиреневая кислоты, пирокатехин и некоторые другие, являются, вероятно, низкомолекулярными продуктами делигнификации.

Продуктами превращения пентоз является фурфурол, а гексоз – 5-оксиметилфурфурол. Согласно данным ГХ-МС в жидких продуктах они не обнаружены, присутствуют продукты внутримолекулярной дегидратации оксикислот – лактоны триоксибутановой, 2,4,5-триокси-2-оксиметилпентановой, тетраоксипентановой и 2,4,5,6-тетраоксигексановой кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ingram T., Rogalinski T., Bockemühl V., Antranikian G., Brunner G. Semi-continuous liquid hot water pretreatment of rye straw // J. of Supercritical Fluids. 2009. № 48. с. 238–246
2. Чечикова Е.В., Евстафьев С.Н. Превращения полисахаридов соломы пшеницы в динамических условиях процесса субкритического автогидролиза // Химия растительного сырья. 2015. №1. DOI: <http://dx.doi.org/10.14258/jcprm.201501426>
3. Pourali O. Production of Valuable Materials from Rice Bran Biomass Using Subcritical Water // Doctoral Thesis at Osaka Prefecture University, February 2010

Секция 5. Биотехнология в пищевых производствах и в сельском хозяйстве

УДК 619:577.15:615.37

БИОТЕХНОЛОГИЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

А.И. Албулов, М.А. Фролова, А.В. Гринь

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», Щелково, Россия

Одним из механизмов старения организма являются сдвиги обмена нуклеиновых кислот, проявляющиеся снижением синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). В этой связи большой интерес представляет использование в составе биологически активных добавок к пище и специализированных пищевых продуктов ДНК, которая, являясь продуктом природного происхождения с высокой биологической активностью, стимулирует иммунную устойчивость организма к заболеваниям, вызываемым общей ослабленностью организма, повышает его сопротивляемость к инфекциям и к действию неблагоприятных факторов внешней среды.

Основным недостатком большинства известных в настоящее время способов получения ДНК является то, что они предназначены для использования в лабораторных условиях и не рассчитаны на получение целевого продукта в промышленных масштабах. Основная часть этих методов позволяет получать высокомолекулярную ДНК, которая имеет ограниченную область применения и используется в геномной инженерии и научно-исследовательских работах по молекулярной биологии и генетике [1-5].

В качестве сырья для получения ДНК нами были использованы молоки лососевых рыб. При обработке параметров технологического процесса основными критериями являлись содержание основного вещества в препарате ДНК и выход готового продукта. Было изучено влияние на эти показатели таких параметров, как соотношение компонентов реакционной среды, температура и продолжительность процесса.

Разработанный технологический процесс включает в себя измельчение предварительно размороженного сырья на коллоидной мельнице, гидролиз протеолитическим ферментом трипсин при следующем соотношении компонентов: молоки лососевых рыб : вода : трипсин = 40:59,88:0,12 в течение 3 часов при 45°C и при pH 8-9 с последующим отделением балластных белков и липидов центрифугированием на проточной центрифуге, фильтрацией через бельтинг-ткань и высушиванием раствора ДНК на лиофильной или распылительной сушке. На способ получения ДНК из молок лососевых рыб получен патент РФ [6].

Т а б л и ц а 1

Органолептические и физико-химические показатели кислоты дезоксирибонуклеиновой из молок лососевых рыб, изготовленной по технологии ВНИТИБП

Наименование показателей	Характеристика и норма
Внешний вид	Аморфный порошок
Цвет	От белого до светло-коричневого
Запах	Свойственный данному продукту с рыбным оттенком
Массовая доля влаги, %, не более	8,0
Массовая доля ДНК, %, не менее	40,0
Массовая доля золы, %, не более	15,0
Массовая доля общего азота, %, не менее, из которых азот ДНК, %, не менее	12,0 6,0
Массовая доля жира, %, не более	1,0

Санитарно-эпидемиологическая экспертиза, а также исследования показателей безопасности и качества ДНК, изготовленного по разработанной технологии, проведенные в НИИ питания РАМН, показали соответствие исследуемого препарата действующим законодательным актам и нормативным требованиям, установленным для пищевого сырья. На основании Экспертного заключения НИИ питания РАМН Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека выдано Свидетельство о государственной регистрации на Дезоксирибонуклеиновую кислоту, предназначенную для использования в пищевой промышленности при производстве биологически активных добавок к пище и специализированных пищевых продуктов.

В настоящее время на производственном участке отдела получения биологически активных веществ ВНИТИБП налажен выпуск ДНК пищевого качества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биологически активная пищевая добавка дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из молок лососевых рыб / Ю.И. Касьяненко, Л.М. Эпштейн, А.П. Гажа и др. // Известия ТИНРО. – 1999. – Т. 125. – С. 139-146.
2. Пат. СССР № 915446 Способ получения ДНК из молок рыб / Гаймула М.А., Кална В.Х., Микстайс У.Я., Эпштейн Л.М.: Опубл. 01.07.91.
3. Позднякова Ю.М. Технология биологически активных добавок к пище на основе ферментативного гидролиза гонат гидробионтов Текст.: Дис. канд. технич. наук / Позднякова Ю.М. Владивосток. ТИНРО-центр. 2003. – 125 с.
4. Получение высокополимерной ДНК из молок осетровых рыб / Ю.И. Вайнберг, Э.Н. Каплина, И.А. Кольцов и др. // Хим. фарм. журн. – 1982. – № 7 С.67-70.
5. Получение и свойства производных ДНК из молок лососевых / Ю.И. Касьяненко, Ю.В. Ковалева, Л.М. Эпштейн и др. // Изв. ТИНРО-центра. -1997. –Т. 120. – С. 37-43.
6. Патент РФ № 2488634 опубл. 27.07.2013 г. Бюлл. № 21.

УДК /551.510.42:628.15/16 / (075.8)

РЕКУПЕРАЦИЯ АКТИВНОГО ИЛА

Т. А. Иванова¹, Е. Д. Керечанина², Н. Д. Павлов¹

¹ФГБОУ ВПО «Великолукская государственная сельскохозяйственная академия»,
Великие Луки, Россия

²ФГБОУ ВПО «Великолукский филиал Петербургского государственного университета путей
связи Императора Александра I», Великие Луки, Россия

Известно, что в активном иле содержатся белки 37-52%, аминокислоты 20-35%, а также витамины группы В. Данные приведены в % на сухое вещество. Он может быть использован для кормления животных, рыб и птиц. Разработаны различные технологические схемы получения белково-витаминного кормового продукта (белвитамила), производства смеси кормовых дрожжей с илом и получения технологического витамина В₁₂ для комбикормовой промышленности. Схема получения гранулированного белвитамина приведена на рисунок 1. Как следует из рисунка избыточный активный ил из отстойника поступает в уплотнитель, затем на центрифугу, где сгущается до влажности 70-80%. После этого он поступает в шнековый гранулятор и в сушилку, где при 120-200°C высушивается до остаточной влажности 5-10%. Продукт упаковывают, а газы очищают в циклонах. Витамин В₁₂ (кабаламин) является антианемическим средством, стимулирует и регулирует процесс кроветворения, участвует в белковом обмене и в обмене углеводов, оказывает действие на рост, регулирует основные обменные процессы в печени, влияет на сохранение нормальной деятельности нервной системы. Витамин В₁₂ имеет формулу С₆₃Н₈₈О₁₄РСо. Его молекулярная масса 1357. Ранее В₁₂ извлекали из печеночных экстрактов, в настоящее время из культуральной жидкости антибиотиков.

Получение витамина В₁₂ состоит из нескольких стадий. Активный ил уплотняют до влажности 95-96 %, затем подкисляют серной кислотой до рН = 3 и направляют в реактор, где подогревают паром до

110°C. После охлаждения из ила в центрифуге отделяют твердые частицы, которые сушат, дробят и затем используют как удобрение, а фильтрат направляют в коагулятор, где обрабатывают щелочью до pH = 5. В коагуляторах массу отстаивают 1-6 часов, затем осадок отделяют на центрифуге и перерабатывают в удобрение, а фильтрат выпаривают, обрабатывают щелочью, сушат и дробят. Готовый продукт расфасовывают.

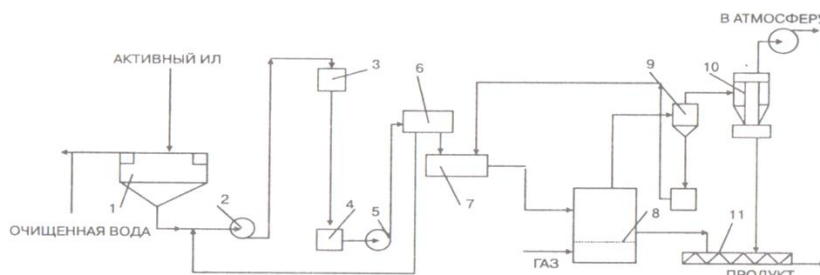


Рисунок 1 - Схема установки для получения беловитамина в виде гранул: 1 – вторичный отстойник; 2, 5 – насосы; 3 – уплотнитель; 4 – емкость; 6 – центрифуга; 7 – шнековый гранулятор; 8 – сушилка; 9 – циклон; 10 – батарейный циклон; 11 – шнековый транспортер

Для повышения качества дрожжей, обогащения их витамином B₁₂ готовят смеси дрожжей с активным илом. Смесь готовят смешением сухих компонентов дрожжей и ила в соотношении 10:1. При этом обеспечивается необходимое количество в смеси витамина B₁₂. Кормовая смесь может быть приготовлена смешением сгущенных компонентов дрожжей с илом (рисунок 2).

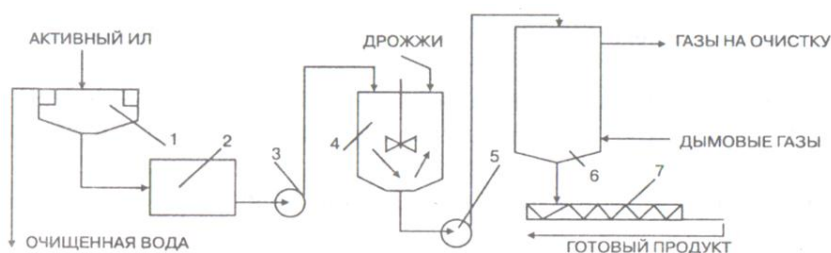


Рисунок 2 - Схема получения кормовых дрожжей с активным илом: 1 – вторичный отстойник; 2 – емкость; 3, 5 – насосы; 4 – смеситель; 6 – сушилка; 7 – шнек

Активный ил влажностью 96.5% из вторичных отстойников направляют в емкость, откуда насосом подают в смеситель, в который поступают и концентрированные дрожжи. Образующуюся смесь сушат.

Для получения белка экстракционным способом сгущенный активный ил обрабатывают соляной кислотой так, чтобы концентрация ее после перемешивания равнялась децинормальной. В таких условиях смесь выдерживают 24 часа при периодическом перемешивании. После отделения воды ил обрабатывают 0.1 Н раствором NaOH и выдерживают сутки. После этого щелочную жидкую фракцию, отделенную от ила, нагревают до 80-90°C, а затем охлаждают до 25°C и осаждают белок, добавляя 10%-ную соляную кислоту до pH = 4.6-4.7. Белок высушивают и расфасовывают.

Для получения активного угля высушенный избыточный активный ил подкисляют и смешивают с формальдегидом. Далее проводят карбонизацию, то есть пиролиз в печах без доступа воздуха при 700-800 °C. Чем выше температура, тем плотнее получают материал. При этом из-за уменьшения объема пор его реакционная способность снижается. В процессе карбонизации выделяются летучие соединения. При 600 °C летучие составляют ≈ 70 % от исходного вещества (28 % – смолы, 25 % – вода и 17 % – газы), а оставшийся карбонизат (≈30 %) на 4/5 состоит из углерода. Карбонизат подвергают активации кислородом, водяным паром или диоксидом углерода. Оптимальная температура активации 750-1000 °C. После активации производят тонкий размол и рассев материала. Для получения гранулированного угля порошкообразный материал после карбонизации смешивают со связующим, формируют гранулы, а затем активируют.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова Т. А., Спасов В. П. Химия окружающей среды и техника ее защиты: Учебник – Великие Луки, 1999. – 228 с.

УДК630*165.6: 631.147(075.8)

**БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЛЕСОКУЛЬТУРНОЙ ПРАКТИКЕ
БЫСТРОРАСТУЩИХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД****А.И. Сиволапов¹, Т.А. Благодарова², В.А. Сиволапов³**¹ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный лесотехнический университет им. Г.Ф. Морозова»,
Воронеж, Россия²ФГБУ «Всероссийский НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии», Воронеж, Россия³Филиал ФБУ «Рослесозащита» «ЦЗЛ Воронежской области», Воронеж, Россия

В настоящее время наряду с традиционными приемами воспроизводства ценных форм и сортов лесных древесных растений используют метод культуры изолированных органов и тканей (клональное микроразмножение растений). К преимуществам этого метода относятся: быстрота производства, исключение вирусных заболеваний, потребность в малом количестве инициальных эксплантов и ограниченность площадей, возможность круглогодичного продуцирования посадочного материала. Необходимость массового воспроизводства генетически улучшенных форм древесных растений с помощью культуры тканей для улучшения качественного состава лесонасаждений за счет получения клоновых растений, устойчивых к болезням и вредителям, стрессовым и техногенным факторам может ускорить воспроизводство лесных ресурсов, позволит получить генетически улучшенный материал значительно раньше, чем в обычных условиях. В последние годы особую значимость приобретают плантационные культуры березы, ольхи, тополя с коротким периодом ротации на получение мелкотоварной древесины для целей прессования, производства строительных деталей и целлюлозы. В Учебно-опытном лесхозе ВГЛУ в 1997 году созданы испытательные культуры тополя и березы, в Новоусманском лесхозе – культуры ольхи черной и серой (рисунок 1, 2). Регенеранты *in vitro* получены Т.М. Табацкой и О.С. Машкиной в НИИЛГиС. Ежегодные наблюдения и исследования по использованию микроклонального размножения в лесокультурной практике быстрорастущих древесных пород в лесостепи можно сделать следующие выводы:

1. Наиболее ценными быстрорастущими породами для плантационного лесоразведения в лесостепи являются: береза повислая, лучшие сорта тополя и ольха черная. Биотехнология *in vitro* имеет принципиальное значение для размножения трудно размножаемых семенами и черенками хозяйственно ценных форм и сортов древесных растений (рисунок 1).

2. В Центральной лесостепи накоплен 18-летний опыт создания плантационных культур трудно укореняемого триплоидного сорта тополя сереющего Хоперский 1 регенерантами *in vitro* на серых лесных супесчаных почвах Конь-Колодезского лесничества и на темно-серых лесных суглинистых почвах Правобережного лесничества. В 18 лет средняя высота деревьев тополя Хоперский 1 на супесях составила $24,0 \pm 0,45$ м., средний диаметр $23,4 \pm 1,36$ см.; на суглинках соответственно $24,5 \pm 0,58$ м. и $35,0 \pm 0,85$ см (рисунок).

2. Установлено влияние происхождения посадочного материала (регенеранты *in vitro*, сеянцы) березы повислой на рост по высоте и диаметру. На серых лесных супесчаных почвах Конь-Колодезского лесничества запас 18-летних плантационных культур березы повислой, созданных регенерантами *in vitro*, составляет $198,6$ м³/га, сеянцами – $91,6$ м³/га, но качество стволов у сеянцев лучше, чем у регенерантов.

3. Опыт создания культур березы карельской из регенерантов *in vitro* показал большое значение последних при получении специальных сортиментов.

4. Экспериментально установлено, что в культурах ольхи черной и серой различия по высоте и диаметру регенерантов *in vitro* и сеянцев в возрасте 10 лет на темно-серых суглинистых влажных почвах поймы реки Тавровка Новоусманского лесничества не существенны. Для ольхи биотехнология *in vitro* имеет значение при создании клоновых архивов хозяйственно-ценных форм, сортов, клоновых лесосеменных плантаций.

5. Показано, что плодоношение клоновых лесосеменных плантаций ольхи, созданных регенерантами *in vitro* начинается раньше на 2-3 года, чем у сеянцев.



Рисунок 1 – Регенеранты тополя Хоперский 1 (слева) и березы повислой (справа)

ЛИТЕРАТУРА

1. Сиволапов, В. Плантационное лесовыращивание березы, ольхи и тополя с использованием биотехнологии *in vitro* / В. Сиволапов, А. Сиволапов, Т. Благодарова. Saarbrücken, Deutschland: LAP LAMVERT Academic Publishing, 2014. – 120 с. Электронная книга. <http://dnb.d-nb.de>
2. Машкина, О.С. Производство посадочного материала сортов тополя сереющего, размноженных *in vitro* [Текст] / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая, А.И. Сиволапов // Актуальные направления научных исследований XXI века: теория и практика: сб. науч. тр. По материалам международной заочной науч.-практ. конф. – Воронеж, 2013 - № 4 - С. 117 – 121.

УДК 619:577.15:615.37

ПРОМЫШЛЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТРИПСИНА

М.А. Фролова, А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко, Ю.Д. Фролов

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Щелково, Россия

В настоящее время существуют определенные трудности в обеспечении предприятий биологической промышленности трипсином российского производства. В течение последних лет внутреннее производство ферментных препаратов демонстрирует тенденцию к сокращению, что обусловлено значительной конкуренцией со стороны зарубежных фирм, предлагающих широкий ассортимент продукции.

С целью получения трипсина, пригодного для применения в биотехнологии для диспергирования тканей животных и птиц при получении культур клеток во ВНИТИБП была разработана технология получения трипсина, отличающаяся простотой, полным исключением применения растворителей и солей-осадителей ферментов, воспроизводимостью и низкими трудозатратами. На одном из этапов технологического процесса получения трипсина был использован метод отделения высокомолекулярных соединений от низкомолекулярных в жидкой фазе с использованием селективных мембран, что привело к значительному упрощению технологического процесса и повышению специфической активности конечного продукта [1-6]. Новизна исследований по разработке способа получения трипсина подтверждена Патентом РФ [7].

В качестве исходного сырья для получения трипсина использовали поджелудочную железу от убойных животных (крупный рогатый скот и свиньи). Ультрафильтрацию раствора трипсина осуществляли с использованием полупроницаемых мембран в виде полых волокон из полиамида с пределом задержания по белку 15, 30 и 100 кДа. Сухую форму препарата получали методом высушивания по разработанному нами режиму.

Испытания диспергирующих свойств ферментного препарата трипсина в ФГУП «Ставропольская биофабрика» и ФГУП «Армавирская биофабрика» показали его эффективность. Испытуемый препарат был не токсичен и обладал активными диспергирующими свойствами (таблица 1).

Т а б л и ц а 1

Результаты испытания препарата трипсина производства ВНИТИБП для дезагрегации почек телят (ПТ) и фибробластов куриных эмбрионов (ФКЭ)

№ опыта	Тип культуры	Выход клеток из 1 мг ткани, млн/г	Срок образования монослоя, сут.	Морфология клеток	Посевная концентрация клеток, тыс./мл	Жизнеспособность клеток, %
1	ПТ	45	6	без изменений	600	80
2	ПТ	40	6	без изменений	700	75
3	ПТ	50	6	без изменений	550	82
4	ФКЭ	35	2	без изменений	2000	84
5	ФКЭ	40	2	без изменений	1800	80
6	ФКЭ	38	2	без изменений	2000	82

Промышленная технология получения трипсина освоена в условиях опытного производства в отделе получения биологически активных веществ ВНИТИБП, разработаны и утверждены в установленном порядке нормативная документация «Технологический регламент на производство ферментного препарата трипсин» и «Методические рекомендации по применению трипсина в биотехнологии при производстве препаратов ветеринарного назначения».

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюхов И.Л., Шокун Ю.Г. Применение мембранного процесса для получения ферментного препарата из рыбного сырья // Научн. труды Дальрыбвтуза-Владивосток. – 1999. – Вып. 2 – С. 120-126.
2. Федоренко Б.Н., Трефилов Э.М., Згуревец Н.А. Снижение потерь фермента от инактивации в промышленной ультрафильтрации // Тез. Докл. Всес. конф. «Биотехнология 86». М. – 1986. – С. 99-100.
3. Hu G., Leger R.J. A phylogenetic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi // Journal of Evolutional Biology – 2004. – V/ 17 – P. 1204-1214.
4. Leiros N.K., Brandsdal B.O., Andersen O.A., Os V., Leiros I., Helland R., Otlenski J., Wilassen N.P. / Stalas A.O. Trysin specificity by LIE calculations, X-ray structures and association constant measurements // Protein sci.- 2004. -v. 13. – N 4. - P. 1056-1070.
5. Polgar L. The catalytic triad of serine peptidases // Cell. Mol. Life Sci. – 2005. – V. 62. –P. 2161-2172.
6. Rawlings N.D., Barrett A.J. Families of serine peptidases // Methods in Enzymology. – 1994. – V. 244. – P. 19-61.
7. Патент РФ «Способ получения трипсина» № 2265053 опубл. 27.11.2005 Бюлл. № 33.

УДК 619:616-036.22

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОСТИЖЕНИЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН

Н.М. Пухова, А.Я. Самуйленко, В.И. Еремец

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», Щелково, Россия

Основным способом борьбы с бешенством во всем мире признана вакцинопрофилактика. В этом году исполняется 130 лет с момента получения и применения Л.Пастером первой антирабической вакцины. За этот период были созданы и постоянно совершенствовались десятки различных вакцинных препаратов. Многолетний опыт иммунопрофилактики бешенства определил основные требования к антирабическим вакцинам - высокая иммуногенность, безопасность, стабильность при хранении, низкая цена и удобство в применении.

В настоящее время мировое производство антирабических вакцин ветеринарного применения исчисляется сотнями млн. доз в год, доля России составляет около 10 %, что явно недостаточно. ВОЗ призывают к расширению производства безопасных и эффективных иммунопрепаратов, критическая нехватка которых существует на глобальном уровне.

Отечественные антирабические вакцины, по своей безопасности и эффективности, в основном, соответствуют мировым стандартам и рекомендациям ВОЗ [1]. Многие вакцины, сохраняя свои названия, совершенствовались на протяжении десятилетий.

Методами генной инженерии были созданы рекомбинантные и ДНК-вакцины против бешенства, которые биологически безопасны, устойчивы во внешней среде и индуцируют напряженный иммунитет. Применение рекомбинантного вируса исключает попадание во внешнюю среду потенциально опасного генома вируса бешенства, поэтому наибольшее распространение они получили для пероральной вакцинации диких плотоядных. Разработаны также субъединичные вакцины, полученные с использованием трансгенных растений, которые в настоящее время проходят испытания на животных.

Но вакцины нового поколения, несмотря на свои высокие характеристики, пока не нашли широкого применения в ветеринарии, в основном по причине трудоемкости получения иммуногена и высокой себестоимости. Поэтому во многих странах продолжают исследования по совершенствованию цельновирионных препаратов и, используя современные достижения молекулярной биологии и биотехнологии, создаются новые высокоэффективные препараты [2].

В нашей стране зарегистрированы и используются более десятка антирабических вакцин для животных отечественного и зарубежного производства. Импортные вакцины Deferson (США), Rabies (Голландия), Rabisin (Франция) имеют высокую иммуногенную потенцию, и при условии хранения 2-8 °С остаются активными от 18 месяцев до 3 лет, но по цене значительно превосходят отечественные.

Во ВНИТИБП была разработана жидкая универсальная инактивированная антирабическая этанол-вакцина УНИРЭВ, производство которой основано на современных биотехнологических методах - культивирование инфицированных вирусом бешенства (шт. «Щелково-51») клеток перевиваемой линии ВНК-21/13 в биореакторах суспензионным и псевдосуспензионным (на микроносителях) способами [3]. Испытания этанол-вакцины на биологические свойства, показали, что препарат не содержит живого вируса, безвреден, не вызывает каких-либо аллергических реакций при введении животным, обладает высокой иммуногенной потенцией и антителоиндуцирующей активностью на уровне лучших зарубежных аналогов. В отличие от них не содержит антибиотиков и токсичные ртутьсодержащие компоненты [4].

Эффективность этанол-вакцины УНИРЭВ и ее производства была определена по нескольким показателям (рисунок 1).

Если учесть, что доля импорта ветеринарных вакцин растет с каждым годом и стоимость отечественных вакцин значительно ниже зарубежных аналогов, универсальная вакцина против бешенства животных (УНИРЭВ) вполне может стать конкурентоспособной на отечественном рынке и найдет широкое применение в ветеринарной практике страны и за рубежом.



Рисунок 1 - Критерии эффективности антирабической этанол-вакцины

ЛИТЕРАТУРА

1. Инфекционная патология животных. Руководство в 7 томах. Т.П. Бешенство // Самуйленко А.Я., Гринь С.А., Еремец В.И., Матвеева И.Н., Ключкина В.И., Кочиш Т.Ю., Пухова Н.М., Захарченко О.С., Боро И.Л., Раевский А.А., Сазанова Э.Я., Сапегина Е.П., Рахманин П.С. – М., 2012. – 153с.
2. Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Еремец Н.К., Барсуков Ю.И., Захарченко О.А. Способы борьбы с бешенством плотоядных животных // Ж.Ветеринария и кормление. – №4. – 2014. – С.48-50.
3. Пухова Н.М., Самуйленко А.Я., Зенов Н.И., Красуткин С.Н., Захарченко О.С. Совершенствование цельновирионных вакцин против бешенства животных // Вет.врач: – Казань. – 2012. – №5. – С.5-7.
4. Пухова Н.М., Шубина Е.А., Елаков А.Л. Контроль качества антирабических вакцин // Методы оценки соответствия. – 2013. – №12. – С.8-11.

УДК 663.531

**ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА НА ПРОЦЕСС
ВОДНО-ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ ЯЧМЕНЯ***Т.С.Ковалева, А.Н.Яковлев, Г.В.Агафонов, С.Ф. Яковлева**ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия*

Главной задачей производства этанола является получение качественного продукта при максимальном гидролизе всех высокомолекулярных веществ зерна и минимальном расходе теплоэнергоресурсов. Решение этой задачи достигается применением дополнительных ферментных препаратов.

В состав биополимеров зерна ячменя входят крахмал, некрахмальные полисахариды (β - глюканы, пентозаны), белки. Все эти вещества находятся в прочном комплексе с крахмалом, затрудняют доступ основных ферментов (α -амилаз и глюкоамилаз) к полисахаридным цепям. Особенно высоко содержание пентозанов и β - глюканов в зернах ячменя.

Недостаточный гидролиз некрахмалистых полисахаридов и белковых веществ приводит к неудовлетворительному разжижению замеса, снижению скорости осахаривания и, следовательно, к увеличению дозировки α - и глюкоамилаз, либо к задержке брожения и ухудшению показателей зрелой бражки.

В качестве сырья для использовали ячмень с крахмалистостью 53,2 %, влажностью 13,5 %, степень измельчения 75–80 % .

В качестве источника термолабильной α -амилазы использовали ферментный препарат Ликвамир 1200С, источника протеаз - протеолитический ферментный препарат GC-106, для расщепления некрахмалистых полисахаридов - комплексный препарат ВискоСтар 150 Л (β -глюканаза, ксиланаза, целлюлаза). Выше перечисленные ферментные препараты вносили в замес.

Приготовление и разваривание замеса осуществляли по механико-ферментативной схеме. Определяли массовую долю сухих веществ в фильтрате с помощью рефрактометра. Как следует из полученных материалов, независимо от применяемого комплекса ферментов переход сухих веществ в растворимое состояние идет постепенно в течение всего анализируемого процесса и достигает максимального значения к концу вводно-тепловой подготовки. При внесении на стадии водно-тепловой обработки ферментного препарата ВискоСтар 150 Л массовая доля сухих веществ в замесе увеличивается на 12,8%, а ВискоСтар 150 Л и GC-106 на 17,2% по сравнению с контролем. При использовании дополнительных ферментов крахмал становится более доступным для действия теплоты и α -амилазы Ликвамира 1200С и более полно переходит в растворимое состояние. Под действием вносимых ферментов в растворимое состояние частично переходят β – глюканы, ксиланы и белки. Все это в совокупности увеличивает массовую долю растворимых сухих веществ в замесе. При использовании комплекса ферментных препаратов в процессе гидроферментативной обработки в растворимое состояние переходят до 65 % спирторастворимых и до 95 % водорастворимых углеводов по отношению к общему содержанию углеводов в замесе.

БИОМАССА КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ, КАК СПОСОБ ОБОГАЩЕНИЯ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Д.В. Зипаев, Т.С. Курмаева

ФГБОУ ВПО «Самарский государственный технический университет», Самара, Россия

Ритм жизни современного человека отличается высокими показателями занятости, которая зачастую приводит к тому, что времени на полноценный отдых и сон, а тем более на приготовление качественной пищи не хватает. Остро стоит вопрос обеспеченности витаминами, минеральными веществами, полноценными белками. В большинстве случаев рацион состоит из продуктов, отличающихся высокой степенью технологической переработки, которая позволяет сократить время приготовления пищи или полностью обойтись без термической обработки. Однако содержание полезных веществ в такой еде резко снижается. Отсюда развитие авитаминозов, белковой недостаточности, ожирения, заболевания сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта. К последним относится нарушение баланса полезных микроорганизмов, которое приводит к различного рода аутоиммунным заболеваниям.

В течение последних семи лет на базе факультета пищевых производств Самарского государственного технического университета проводится разработка ряда новых способов получения различных продуктов питания и напитков с использованием биомассы кефирных грибов, выращенных на модельной среде.

Кефирные грибки представляют собой естественный симбиоз четырех групп микроорганизмов: молочнокислые палочки, молочнокислые кокки, уксуснокислые бактерии и дрожжи.

Биомасса кефирных грибов (БКГ) в процессе выращивания накапливает в своем составе витамины группы В, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, аминокислоты и минеральные вещества, что делает её весьма ценной биологически активной добавкой при производстве продуктов питания с повышенной пищевой ценностью.

Исходя из экспериментальных данных, наиболее подходящей базой для модельной питательной среды для увеличения прироста БКГ служит молочная сыворотка, а также сопутствующие компоненты – соли аммония, калия и карбамид в различной концентрации [1].

Как известно, Россия – это страна, которая всегда отличалась большим потреблением хлеба на душу населения. Поэтому полученная БКГ использовалась для обогащения именно хлеба.

При использовании БКГ в качестве компонента рецептуры пшеничного хлеба он был подвержен процессу гомогенизации с целью подавления биологической активности используемой добавки. Гомогенизат БКГ вводили в опару для достижения наилучших физико-химических показателей хлеба.

Полученные изделия обладают специфическим запахом и привкусом. Мякиш имеет равномерную пористость, не влажный на ощупь, эластичный, после надавливания восстанавливает исходную форму. Кроме того, добавленный гомогенизат БКГ снижает развитие картофельной болезни хлеба [2].

В настоящее время большую популярность получили различные кисломолочные напитки, которые не только утоляют жажду и голод, но и служат источником витаминов и полезных микроорганизмов.

Молочная сыворотка служит источником лактозы, молочных белков (α -лактоглобулин, β -лактоальбумин, иммуноглобулины), при одновременном незначительном количестве молочного жира. Поэтому она была использована для получения сывороточного напитка с добавлением БКГ. Это сделано для обогащения сыворотки полезными веществами и создания полезной микрофлоры для желудочно-кишечного тракта организма человека. В качестве сокодержавного наполнителя в рецептуре напитка использовался соковый концентрат «Апельсин-Манго». Полученный напиток имеет ярко оранжевый цвет, отчетливо фруктовый запах благодаря внесению фруктово-ягодного наполнителя, вкус напитка кисло-сладкий, фруктовый, без сывороточного привкуса. Срок годности сывороточного напитка с сокодержавным наполнителем составляет 10 суток, коэффициент резерва как и для молочных скоропортящихся продуктов равен 1,5. Используемое сырье для получения сывороточного напитка было проанализировано на наличие антибиотиков на приборе Delvotest, результаты которого показали их полное отсутствие в молоке [3].

Как известно, молочные продукты являются источником кальция, который отвечает за рост и крепкость костей и в совокупности с витамином D служит профилактикой остеопороза у взрослых и рахита у детей. К таким продуктам принадлежит сыр, относящийся к одному из популярных продуктов у российского потребителя. Поэтому был использован рассольный сыр, в рецептуру которого вносилась БКГ как обогащающая добавка.

Органолептические показатели рассольного сыра, выработанного с использованием биомассы кефирных грибков, были следующие: внешний вид и консистенция – мягкая пластичная, мажущаяся, однородная по всей массе; вкус и запах – чистый кисломолочный, без посторонних привкусов и запахов; цвет – белый, равномерный по всей массе [1].

Таким образом, использование БКГ в продуктах питания в качестве обогащающей добавки является перспективным направлением биотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зипаев Д.В., Зимичев А.В. Биотехнология кефирных грибков. Монография // Самара: СамГТУ, 2013. – 115 с.
2. Шевченко А.Ф., Зипаев Д.В., Валиулина Д.Ф. Хлеб с биомассой кефирных грибков. // Хлебопечение России. – 2011, № 4. – С. 12-14
3. Зипаев Д.В., Суханова Д.А. Разработка нового сывороточного напитка с фруктово-ягодным наполнителем. // Вестник Международной Академии Холода. – 2014, № 2. – С. 66-68

УДК 573.6.086.835

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ САХАРОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОМАЛЬТУЛОЗЫ

О.С. Корнеева, О.Ю. Гойкалова, В.В. Сложеникина

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

Углеводы, как известно, являются активными участниками обмена веществ, а также источниками энергии в организме человека. В тоже время количество заболеваний, связанных с избыточным потреблением сахарозы, постоянно растет. В связи с этим разработка технологий получения безвредных натуральных сахарозаменителей с функциональными свойствами является актуальной задачей.

Изомальтулоза – природный заменитель сахара, который присутствует в меде и соке сахарного тростника. По сравнению с известными сахарозаменителями изомальтулоза отличается низким гликемическим индексом (2 ед), низкой калорийностью (2 ккал/г), чистым сладким вкусом, некариогенностью, отсутствием тератогенного воздействия.

Получают изомальтулозу из сахарозы путем биотрансформации с применением бактериального фермента – сахарозоизомеразы, продуцируемого некоторыми микроорганизмами. В работе изучен процесс биотрансформации сахарозосодержащего сырья (тростниковый сахар-сырец, свекловичная меласса, сироп сахарного сорго) сахарозоизомеразой бактерий рода *Egwinia* для получения изомальтулозы.

Установлено, что тростниковый сахар-сырец может выступать в качестве альтернативного субстрата в ферментативной реакции биотрансформации наряду с чистой сахарозой. Выход изомальтулозы при трансформации сахара-сырца был сопоставим с контролем и составил 97 % за 3,5 ч при оптимальных условиях изомеризации (рН 6,0, 30 °С, дозировка фермента 5 Е/мг сахарозы). В опыте со свекловичной мелассой и сиропом сахарного сорго наблюдалось ингибирование биотрансформации, степень трансформации к 3-му часу снижалась на 14,5 и 18,7 %, соответственно. С целью научного обоснования полученных результатов эксперимента нами исследовалось влияние некоторых несахаров, сопровождающих тростниковый сахар-сырец, мелассу, сироп сахарного сорго на процесс биотрансформации чистой сахарозы.

Доказано ингибирующее воздействие ионов металлов (алюминий, железо), анионов неорганических кислот (нитратов, хлоридов, фосфатов), аминокислот (серин, аспарагиновая кислота), органических кислот (лимонная, уксусная кислоты) на процесс биотрансформации чистой сахарозы. Снижение степени изомеризации сахарозы в присутствии исследуемых несахаров наблюдалось от 50 до 65 % по сравнению с контролем. Активирующее воздействие на сахарозоизомеразу и, как следствие, выход изомальтулозы было

установлено для солей кальция и марганца в виде их сульфатов. Введение данных компонентов в раствор чистой сахарозы приводило к увеличению выхода изомальтулозы на 30,5 и 13,2 % соответственно.

Полученные данные позволяют рекомендовать тростниковый сахар-сырец как альтернативную замену дорогостоящей сахарозы с целью получения изомальтулозы. В дальнейшем результаты эксперимента будут положены в основу исследований по оптимизации состава реакционной смеси в процессе биотрансформации сахарозосодержащего растительного сырья для получения изомальтулозы.

УДК 663.14.031:663.16

ОЦЕНКА БИОПОТЕНЦИАЛА ПЕРВИЧНОГО И ВТОРИЧНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ, ОБОГАЩЕННОЙ КАРОТИНОИДАМИ

О.П. Червякова, Б.А. Кареткин, И.В. Шакир, В.И. Панфилов

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

Интенсивное развитие животноводства невозможно без создания полноценной кормовой базы, которая предусматривает организацию комплексного питания сельскохозяйственных животных. Традиционные корма (зерновые, бобовые, растительная масса) не сбалансированы по своему макро-составу (содержание липидов, белков). Помимо белка и других веществ энергетического и конструктивного обмена, они должны содержать определенные количества микроэлементов и витаминов. В сбалансированных кормах существенное место отводится витамину А и его предшественникам, так как эти компоненты питания позволяют улучшить азотистый и углеводный обмен у животных.

Каротиноиды являются биологически активными веществами, обладающими провитаминной активностью и играющими важную роль в протекании физиологических процессов. Недостаток этих компонентов в рационе животных можно компенсировать путем внесения в состав кормов биомассы каротинсинтезирующих микроорганизмов.

Анализ литературы показал, что перспективными источниками биологически активных веществ являются микроорганизмы, способные синтезировать и накапливать их в легкодоступной для сельскохозяйственных животных форме. Кроме того, находясь в комплексе с липидами – естественными стабилизаторами витаминов, каротиноиды в сухой биомассе защищены от разрушения и сохраняют свою биологическую активность [1]. Известно, что микроорганизмы способны использовать для роста различные источники питательных веществ, в том числе и компоненты растительного сырья. Данный вид возобновляемого сырья является ценным и перспективным субстратом для получения кормовых и биологически активных добавок на основе микроорганизмов. Учитывая возможность использования некондиционного сырья и побочных продуктов сельскохозяйственной и пищевой промышленности, проблема их переработки является актуальной в настоящее время [2-5].

Ежегодно в разных регионах нашей страны после переработки растительного сырья образуется большое количество углеводсодержащих отходов. Использование вторичного растительного сырья для культивирования микроорганизмов решает как экологические проблемы, так и проблему получения кормовой микробной биомассы.

В связи с этим целью работы явилась оценка потенциала различных типов растительного сырья для получения биомассы дрожжей *Rhodotorula rubra*, обогащенной каротиноидами.

В работе использовали несколько видов растительного сырья и отходов его переработки – клубни топинамбура, кофейный шлам, экструдированные пшеничные отруби, маслоэкстракционный шрот семян подсолнечника после выделения белковой фракции и шелуху подсолнечника. Для повышения биодоступности питательных компонентов сырье подвергали предварительной обработке ферментативным и кислотным гидролизом в определенных ранее оптимальных условиях [4-6]. Для ферментативного гидролиза использовали комплексные ферментные препараты Viscoferm и Cellic CTec (Novozym, Дания), обладающие целлюлазной, ксиланазной, β-глюконазной, гемицеллюлазной активностями.

На основе полученных гидролизатов составляли питательную среду для культивирования дрожжей *Rhodotorula rubra*. По завершению процесса культивирования определяли степень потребления общих углеводов, накопление биомассы и каротиноидных пигментов.

В результате исследований установлено, что предварительная обработка, как кислотным гидролизом, так и ферментативным, в значительной степени позволила повысить доступность питательных компонентов, при этом содержание общих углеводов в гидролизатах в среднем составило 30–40 г/л. При культивировании дрожжей накопление биомассы достигало 8–10 г/л, а степень потребления углеводов – 60–80 %.

Показано, что дрожжи *Rhodotorula rubra* при культивировании на гидролизатах растительного сырья и отходах его переработки накапливают каротиноидные пигменты, но содержание их зависит от типа сырья и способа его обработки и колеблется от 40 до 280 мкг/л культуральной жидкости. Наибольшим потенциалом для микробного синтеза каротиноидов дрожжами обладают кислотные гидролизаты шрота подсолнечника и клубней топинамбура.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ влияния условий распылительной сушки на сохранность антиоксидантных свойств биомассы *Rhodotorula rubra* / М.Г. Гордиенко, А.А. Войновский, О.П. Червякова, Н.А. Суясов // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2013. – № 1. – С. 98–104.
2. Использование кофейного шлама в качестве сырья для получения белковой кормовой добавки / Е.В. Башашкина, И.В. Шакир, Н.А. Суясов, В.И. Панфилов // Химическая промышленность сегодня. – 2010. – № 6. – С. 28–33.
3. Интенсификация процесса биоконверсии отходов пищевой промышленности в дрожжевую биомассу кормового назначения / В.Д. Смирнова, И.В. Балакирев, Е.В. Башашкина и др. // Химическая промышленность сегодня. – 2010. – № 8. – С. 10–15.
4. Биоконверсия отходов производства растворимого кофе в продукты кормового назначения / Е.В. Башашкина, Н.А. Суясов, И.В. Шакир, В.И. Панфилов // Экология и промышленность России. – 2011. – № 1. – С. 18–19.
5. Фам Ань Кьонг. Получение белка одноклеточных из растительного сырья по малоотходной и энергосберегающей технологии: Автореф. дис... канд. техн. наук. – Москва: РХТУ, 1998. – 21 с.
6. Факторный эксперимент для оптимизации условий предварительной обработки питательной среды / Б.А. Кареткин, Т.С. Катаева, Д.В. Баурин и др. // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 11-1. – С. 13–19.

УДК 619:615.24

ЖИВОТНОЕ СЫРЬЕ КАК ИСТОЧНИК ПРИРОДНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ИММУНИТЕТА

Е.Р. Василевская, Л.В. Федулова

ФГБНУ «ВНИИМП им. В. М. Горбатова», Москва, Россия

В последнее время все большую актуальность приобретает поиск и разработка природных веществ адаптогенного действия. Разработано огромное количество препаратов растительного и синтетического происхождения, однако, подобные средства не способны комплексно воздействовать на организм как живую систему в целом. На основе знаний о видовой природе неспецифического иммунитета большое значение приобретает изучение возможности создания стимуляторов неспецифического иммунитета на основе видо- и тканеспецифических биомолекул. Многочисленными исследованиями подтверждено, что ткани и органы сельскохозяйственных животных содержат биологически активные вещества направленного действия [1]. Для обоснования целевой сырьевой базы нами были проведены комплексные исследования иммунокомпетентных органов и тканей свиней.

Для проведения исследований были получены лиофильно высушенные водно-солевые экстракты селезенки (1), мезентеральных лимфатических узлов (2) и тимуса (3) половозрелых свиней. Проведен

аминокислотный анализ на анализаторе Biotronik-IC-2000 (Германия) [2]. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле (стандарты Fermentas, Литва) [3].

Анализ спектра свободных аминокислот (Таблица 1), позволил выявить достаточно высокое содержание глутаминовой кислоты, глицина и аспарагиновой кислоты в лиофилизатах 1 и 2: Glu – 17,4 и 19,8 мольных процента; Gly – 13,0 и 14,6 мольных процента; Asp – 9,1 и 8,5 мольных процента, соответственно. В то же время в образце 3 содержание этих аминокислот заметно ниже: Glu – 7,7; Gly – 5,2; Asp – 3,4 мольных процента.

Т а б л и ц а 1
Содержание свободных
аминокислот в экстрактах

АК, мол. %.	1	2	3
Asp	9,1	8,5	3,4
Thr+Asn	5,6	5,0	4,7
Ser+Gln	7,9	7,6	7,9
Glu	17,4	19,8	7,7
Pro	6,0	6,0	5,3
Gly	13,0	14,6	5,2
Ala	9,5	9,5	9,4
Val	4,8	4,2	7,4
Ile	3,3	2,7	6,5
Leu	6,3	5,0	12,8
Tyr	2,8	2,4	4,5
Phe	2,9	2,5	4,9
Lys	5,9	6,8	8,9
His	1,7	1,6	2,3
Arg	3,7	3,8	6,7

Содержание аланина во всех образцах составляет от 9,4 до 9,5 мольных процента. Уровень нейтральных гидрофильных аминокислот: сумма серин+ глутамин от 7,6 до 8,6 мольных процента, треонин и аспарагин от 5,0 до 5,4 мольных процента, а также пролин от 5,3 до 6,0 мольных процента. Среди гидрофобных аминокислот: валин, лейцин, изолейцин, тирозин и фенилаланин, наиболее высоко содержание лейцина в экстракте 3 (12,8 мол. %); в экстрактах 1 и 2 – заметно ниже – 6,3 и 5,0 мол. %, соответственно. Стоит отметить, что в образцах отсутствуют модифицированные, в частности метилированные, аминокислоты, что дает возможность отнести белки, входящие в состав экстрактов, к глобулярным белкам.

Электрофоретическое разделение образцов в 12,5 % и 15 % полиакриламидном геле показало, что экстракты - многокомпонентные смеси, содержащие белки широкого диапазона молекулярных масс. Экстракт селезенки содержит большее количество высокомолекулярных белков, в диапазоне от 170 до 72 кДа (5 белковых зон в диапазоне от 170 до 72 кДа равной интенсивности; зона в области 55 кДа, интенсивные полосы в области 43 и 34 кДа; 26 и 17 кДа, минорные полосы от 20 до 12 кДа и интенсивная полоса 10 кДа). В

экстрактах тимуса и лимфатических узлах преобладают низкомолекулярные белки в диапазоне от 72 до 26 кДа, а также ниже 10 кДа (слабые белковые полосы в области 130 и 95 кДа, интенсивно окрашенные полосы в области 72 кДа; белковые треки 55 и 40 кДа; не менее 6 минорных полос от 34 до 10 кДа).

По полученным данным можно предположить, что белковые фракции, обнаруженные при анализе экстрактов, соответствуют различным компонентам системы врожденного и адаптивного иммунитета (RIG-I-подобный рецептор-1 (107,5 кДа), активатор пролиферации пероксисом гамма-рецептор (57,5 кДа); поверхностный антиген лейкоцитов (33,25 кДа); интерлейкин-17А (17,3 кДа); адреномедуллин-5 (12,5 кДа); ингибитор лейкоцитов цистеинпротеаза-1 (17,3 кДа); тирозинкиназа-связывающий белок (11,6 кДа) и пр) [4].

Результаты проведенных исследований показали, что водно-солевая экстракция является оптимальным щадящим методом, позволяющим сохранить биологически активные компоненты, содержащихся в животных тканях и органах. Показано, что исследуемые экстракты содержат широкий спектр аминокислот и набор факторов иммунитета, что позволяет рассматривать иммунокомпетентные органы – селезенку, лимфатические узлы и тимус – в качестве потенциального сырья для создания природных регуляторов нарушений системного иммунитета при различных паталогических состояниях. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-16-00008).

ЛИТЕРАТУРА

1. Чернуха И.М. Биотрансформация побочного мясного сырья как инновационный подход к созданию протеомно-пептидных средств направленного действия./И.М. Чернуха, Л.А. Люблинская, Л.В. Федулова, Е.Р. Василевская, Е.А. Котенкова, А.Н. Макаренко // Все о мясе. – 2015 - №2. – С.14-17.
2. Дэвени Т. Аминокислоты, пептиды и белки. / Дэвени Т. Гергей Я. – М.: Мир, 1976. – 368 с.
3. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М., Наука, 1981. – 288 с.
4. Электронная база данных UniProt Consortium, 2002–2014. – URL: www.uniprot.org/uniprot/ (дата обращения: 14.02.15).

УДК 632.954

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДОЛГОВРЕМЕННЫХ ФОРМ ПЕСТИЦИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО ПОЛИМЕРА ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА**О.Н. Виноградова, А.А. Шумилова***Институт Биофизики СО РАН, Красноярск, Россия*

Бурное развитие химии и интенсивного сельского хозяйства способствовали производству и использованию огромного количества различных химических веществ, предназначенных для защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, сорняков и патогенных микроорганизмов. Накопление пестицидов в биосфере посредством повышения концентрации в трофических цепях биоты, агроэкосистемах и природных экосистемах, является одной из самых насущных экологических проблем мира. Новое направление для снижения риска неконтролируемого распространения и накопления пестицидов в окружающей среде – разработка нового поколения экологически чистых препаратов с регулируемым высвобождением активного компонента за счет использования специальной основы – биоразлагаемых материалов.

В работе использовали полимер поли(3-гидроксibuтират) [П(ЗГБ)] для конструирования матрицы для контролируемого высвобождения входящего в состав гербицида метрибузина (МЕТ). Физические смеси П(ЗГБ)/МЕТ в виде растворов и порошков были использованы для создания пленочных и таблетированных форм. С использованием физико-химических методов (СЭМ, X-Ray, ДСК) доказана устойчивость препарата при инкубировании в стерильной воде в течение длительного времени (до 50 дней). Рассмотрена деградация полученных полимерных форм и выход метрибузина в почву. Таким образом, изменяя форму (пленки, таблетки) и нагрузку препаратом можно контролировать время высвобождения метрибузина.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 14-26-00039

УДК 637.07

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРЕННЫХ БЕЛКОВЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ ПИЩЕВЫХ ЦЕЛЕЙ**А.Ю. Соколов***ФГБОУ ВПО «Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова», Москва, Россия*

Отечественными и зарубежными учеными в последние десятилетия разрабатывались способы производства белковых продуктов в солюбилизированной форме с целью придания им необходимых структуры и свойств, особенно в случае необходимости создания смесей, композитов, в том числе с искусственными компонентами.

Однако акцент был сделан на создании технологий изготовления различных форм белковых препаратов в основном для медицины (хирургия, тканевая инженерия; фармацевтическая отрасль), технических применений (волоконистые композиты) с использованием протеолиза различными ферментами, обработки некоторыми электролитами [3-5]. Однако, с учетом высокой стоимости очищенных ферментных препаратов и необходимости строго соблюдения (оптимизации) параметров протеолиза, эффективность их промышленного применения вызывает сомнения.

Поэтому, более экономически оправданными и изученными в нашей стране являются способы конверсии белоксодержащего сырья в пищевые материалы с помощью неорганических соединений электролитического ряда, разрешенные СанПиНами в качестве пищевых добавок.

В связи с этим, целью работы являлась разработка солюбилизированных белковых продуктов на основе коллагенсодержащего сырья (шкурки свиной) и субпродукта 2 категории (рубца КРС) с высоким

содержанием коллагена. Разработанная схема изготовления белковых продуктов в растворенной форме включала следующие этапы: промывку сырья, его измельчение, щелочно-солевое воздействие, нейтрализацию, диспергирование в растворе органической кислоты, гомогенизацию, фильтрацию, параметры проведения которых не раскрываются [1]. В результате, были получены жидкообразные вязкие продукты, названные условно СКШ – из шкуры, СКР – из рубца, которые могут выполнять функции структурообразующих агентов и носителей некоторых функциональных ингредиентов.

Показатели качества новых продуктов зависят от свойств исходного сырья и стабильности проведения технологических процессов обработки. В частности, химический состав продуктов варьировал в следующих пределах, %, влага – 86,0-90,2; белок – 2,5-3,0, в том числе белки соединительной ткани – 2,1-2,4; величина pH – 6,1-7,0; изоточка, определенная с помощью фотометра, (pI) составила около 7,3. Для сравнения, pI коллагена равна 6,0 (определено методом интегрального рассеяния света) [2]. По данным И.В. Триерс и др., для нативного коллагена pI находится в пределах 6,5-7,8, что не противоречит полученным нами данным. Для щелочного желатина, полученного из мягкого коллагенсодержащего сырья, pI варьирует от 4,8 до 6,0, что вызвано особенностями промышленного метода его получения, потерей амидного азота при известковании, образованием несвязанных карбоксильных групп (А. Вейс).

Учитывая высокую чувствительность реологических характеристик, в частности, эффективной вязкости, к изменениям параметров технологического процесса получения белковых продуктов, были построены реограммы, отражающие специфику течения образцов (СКШ и СКР), в зависимости от скорости сдвиговой деформации на вискозиметре «Полимер РПЭ-1М», рисунок 1. Анализ графиков свидетельствует о практически идентичном ходе кривых, основное различие наблюдается только при скоростях сдвига воспринимающих элементов T1/B1 прибора в диапазоне 2,8-5,5 с⁻¹, когда структура жидкости нарушалась механически, затем реологическое поведение стабилизировалось и при этом различие в нем было незначительным.

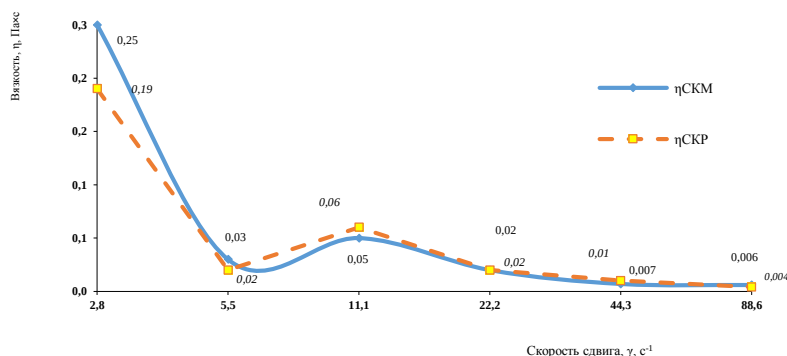


Рисунок 1 – Реограммы белковых солюбилизованных продуктов

Таким образом, результаты свидетельствуют о возможности изготовления белковых продуктов из отдельных видов сырья в растворенной форме с определенными параметрами химических и реологических свойств, предназначенных для структурообразования и стабилизации мясных систем (за счет формирования белковых ассоциатов) или применения как субстрата для различных физиологически функциональных ингредиентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 2478299 РФ. Способ получения коллагенсодержащей матрицы для иммобилизации биологически активных веществ / Титов Е.И., Апраксина С.К., Митасева Л.Ф., Соколов А.Ю. и др. Оpubл. 10.04.2013. Бюл. № 10.
2. Сергеева И.А. Особенности межмолекулярного взаимодействия коллагена в водных растворах: автореф. дис... канд. физ.-мат. наук / И.А. Сергеева. – М.: МГУ, 2009. – 25 с.
3. Antoine E.E. Tunable collagen I hydrogels for engineered physiological tissue micro-environments / E.E. Antoine, P.P. Vlachos, M.N. Rylander // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, Issue 3, 30.03.2015.
4. Lepetit Jacques. Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects // Meat Sci. – 2008. 80, № 4, P. 960-967.
5. Sui, Z. Preparation of collagen/PVA composite fiber / Z. Sui, Y. Wei, X. Zhao // Advanced Materials Research. – 2011. – Volume 331, P. 61-64.

УДК664.8

ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ НА ПРОЦЕССЫ ГИДРОЛИЗА И ЭКСТРАГИРОВАНИЯ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ТЫКВЫ

Н.А. Матвиенко, С.Ф. Яковлева, Е.А. Мотина

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

На современном этапе развития пищевой промышленности потребность в пектине значительно превышает объемы его закупок за рубежом, в России на сегодняшний день его производство отсутствует.

Учитывая большую значимость пектина для пищевой, фармацевтической и медицинской промышленности, с целью снижения зависимости экономики России от импортных поставок и внедрения инновационных технологий проблема производства пектина приобретает чрезвычайную актуальность.

Извлечения пектина и пищевых волокон (ПВ) осуществляли из отжимов тыквы, полученных после извлечения из ее плодов сока. Скорость процессов гидролиза и экстрагирования пектина из растительного сырья определяется такими факторами, как температура, pH среды, продолжительность и гидромодуль процесса.

В качестве гидролизующего агента использовали анолит, полученный в результате электрохимической активации. Для сравнения в аналогичных экспериментах применяли раствор соляной кислоты. Процесс гидролиза-экстрагирования проводили при температуре 60 °С в течение 60 минут, pH варьировали в диапазоне от 2,0 до 5,0. Результаты исследования приведены на рисунке 1.

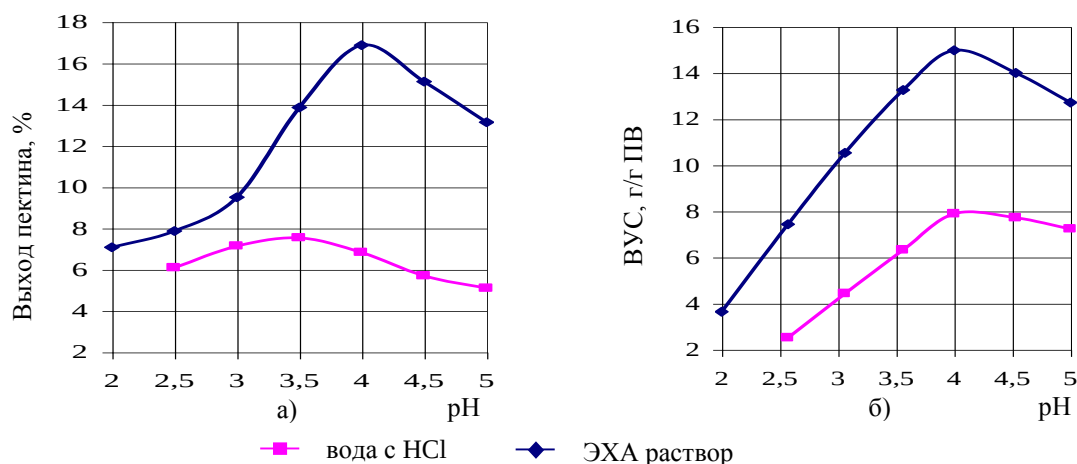


Рисунок 1 - Зависимость а) выхода пектина и б) ВУС ПВ из тыквенных отжимов от pH гидролизующего агента

Повышение pH от 2,0 до 4,0 приводит к резкому увеличению выхода пектина, полученного на ЭХА воде (от 7,08 % до 16,88 %), и повышению водоудерживающей способности (ВУС) ПВ (от 3,64 г/г ПВ до 14,98 г/г ПВ). Дальнейшее увеличение pH дает меньший выход пектиновых веществ, ВУС волокон также снижается. По сравнению с традиционной технологией выход пектина существенно повышается (на 6-8 %).

Использование в качестве гидролизующего агента раствора соляной кислоты с pH 2,0 не позволяет выделить ни пектин, ни ПВ из тыквенного жома, так как создаются очень жесткие условия процесса гидролиза-экстрагирования. По-этому гидролизующий агент (раствор HCl) с таким значением pH является агрессивной средой для тыквенного жома и данный режим не подходит для получения пектина и ПВ из этого сырья. Пектиновые вещества, экстрагируемые из сырья в жидкую фазу, подвергаются дополнительному кислотному воздействию, что приводит к деградации молекул. При значении pH менее 3,5 происходит гидролиз гликозидных связей, преимущественно расщепляется α -рамнозилгликозидная связь, поэтому выход пектина резко снижается. Использование ЭХА воды с pH более 4,0 не обеспечивает создания условий, необходимых для эффективного гидролиза протопектина, выход пектина уменьшается.

Результаты изучения влияния pH на выход пектина и качество ПВ свидетельствуют о том, что процесс гидролиза-экстрагирования следует вести на ЭХА воде с pH 4,0. Выход пектина при этом достигает 16,88 % к массе воздушно сухого жома, а получаемые ПВ имеют высокое качество.

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЬТЕРНАТИВНОГО КОРМОВОГО БЕЛКА

А.С. Ковтунова, Я.Б. Древко, Д.В. Мендубаев, Е.В. Аникеев, О.С. Ларионова, Е.А. Фауст

ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Саратов, Россия

Интенсивное развитие животноводства резко обострило проблему белкового питания животных. Создание стабильной кормовой базы является определяющим фактором в развитии данной отрасли. Недостаток кормов животного происхождения, которые в основном используются в свиноводстве и птицеводстве, не позволяет обеспечить полноценное кормление животных. В связи с этим появилась необходимость изучить возможность использования в рационах сельскохозяйственных животных новых кормовых добавок, которые по полноценности сопоставимы с отходами мясной и рыбной промышленности. Одной из таких белковых добавок является мука из личинок *Musca domestica*, получаемая в результате биотехнологической переработки ими птичьего помета. По содержанию незаменимых аминокислот, олеиновой и линолевой кислот она является достойной альтернативой традиционному источнику протеина животного происхождения в рационах, а именно мясной муке [1].

Имеются сведения, что замена части комбикорма мукой из личинок *Musca domestica* в рационе свиней, цыплят-бройлеров и молодняка серебристо-черных лисиц способствует получению максимального среднесуточного прироста живой массы [3].

Для улучшения питательной ценности муки и с терапевтической целью личинки культивировали на субстрате, обогащенном комбинациями микроэлементов. Нами проведены исследования по введению в субстраты селена в виде ДАФС-25 - 25% Se [2]. При средней массе одной личинки 14,6 мг при использовании 1 кг птичьего помета получали до 9 г биомассы от одной особи имаго *Musca domestica*. Личинки в течение 5 дней активно растут, увеличивая свою массу в 300 раз, и хорошо перерабатывая помет [4].

Аминокислотный состав муки из личинок был исследован в научно-исследовательской лаборатории «Исследование качества и реологических свойств продуктов» ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова» с помощью системы капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ® 105М». Методика предназначена для определения массовой доли аминокислот в исходном сырье для их производства в форме фенилизотиокарбамильных производных, позволяет определять общее содержание аминокислот в пробах (суммарно свободные и связанные формы).

Аминокислотный состав муки из личинок *Musca domestica* представлен на рисунках 1, 2, 3 и 4.

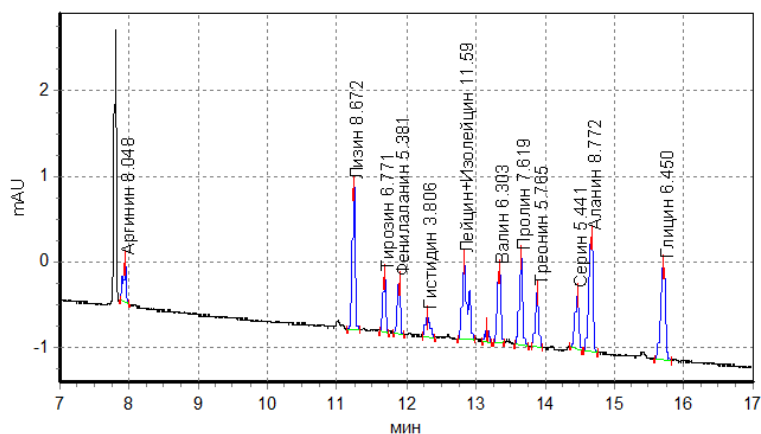


Рис. 1. Содержание аминокислот в биомассе личинок (контроль), мг/л.

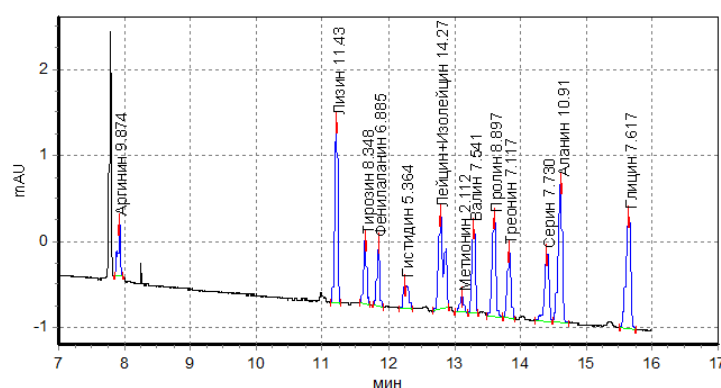


Рис.2. Содержание аминокислот (мг/л) в биомассе личинок с содержанием Se в субстрате 0,7 мг/кг.

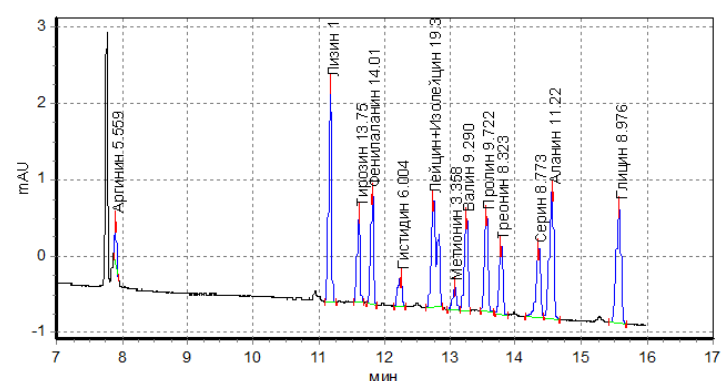


Рис.3. Содержание аминокислот (мг/л) в биомассе личинок с содержанием Se в субстрате 7 мг/кг.

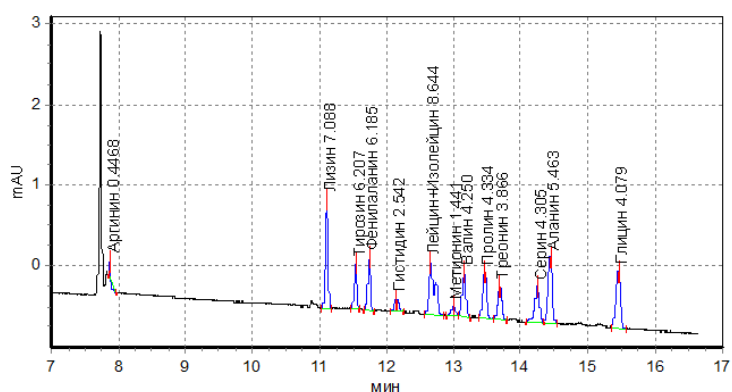


Рис.4. Содержание аминокислот (мг/л) в биомассе личинок с содержанием Se в субстрате 70 мг/кг.

Таким образом, в результате проведенного нами эксперимента, было установлено, что внесение в субстрат селенсодержащих препаратов, а именно ДАФС-25 - 25% Se в количестве 7 мг/кг является оптимальным для культивирования личинок *Musca domestica*. Использование данной концентрации положительно влияет на аминокислотный состав полученной муки, при этом количество лизина увеличивается в 1,85 раза, тирозина – 2,08; фенилаланина – 2,7; гистидина – 1,59; лейцин+изолейцин – 1,7; метионина – 2,24 раза по отношению к контролю.

Следовательно, биоконверсия птичьего помета личинками *Musca domestica* может стать одним из путей решения проблемы дефицита кормового белка животного происхождения и охраны окружающей среды от загрязнения отходами животноводства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колтыпин Ю. А., Стеркин И.В., По стопам Геракла. – М.: Колос, 1983.- 191 с.
2. Ларионова О. С., Фауст Е. А., Древко Я. Б., Ковтунова А. С., Зяйнитдинов Д. Р. Биотехнологическая конверсия отходов животноводства в решении проблемы дефицита кормового белка. Сборник публикаций, Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: реальность и перспективы», 2014.
3. Allotey, J. & Mpuchane, S. 2003. Utilization of useful insects as food source. African. Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development, 3(2): 1–6.
4. H.C. Klunder a, J. Wolkers-Rooijackers a, J.M. Korpela b, M.J.R. Nout. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University, Bomenweg 2, 6703 HD Wageningen, The Netherlands, Food and Agriculture Organization of United Nations, Representation in Lao PDR, Vientiane, Lao Democratic People's Republic Food Control 26 (2012).

УДК 579.66

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИНОРНЫХ САХАРОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ БИОМАССЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

П.В. Шуваев, О.С. Корнеева, А.А. Толкачёва

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

На рынке заквасок 90 % продукции относится к импорту, поэтому перед биотехнологической промышленностью стоит задача - уменьшить зависимость предприятий от иностранного сырья, в особенности цен на него, для чего, в первую очередь, необходимо организовать производство собственных заквасочных культур на территории страны. Особенно актуальным является получение биомассы заквасочных культур для производства молочнокислых продуктов, обладающих профилактическим действием к различным заболеваниям и укрепляющим защитные функции организма, снижающим риск воздействия вредных веществ [1].

В мировой науке накоплен обширный материал, свидетельствующий о важной роли «минорных сахаров» (фукоза и манноза) в основных физиологических процессах, как у микро, так и макроорганизмов, в частности, у млекопитающих. Известны их иммуностимулирующие свойства и определяющая роль во многих типах реакций межмолекулярного и межклеточного узнавания [2]. Присутствуя в пище человека в небольших количествах, «минорные сахара» оказывают существенное влияние на нормофлору желудочно-кишечного тракта. Фукозный сироп получил положительное заключение Ставропольского научно-исследовательского противочумного института при испытании питательных сред [3]. В модельном эксперименте *in vitro* нами было показано их стимулирующее действие на рост и развитие бифидобактерий [4]. Применение данных углеводов в качестве компонентов питательной среды при культивировании молочнокислых микроорганизмов может существенно изменить их свойства, повысив биосинтетическую способность.

Цель данной работы состояла в том, чтобы изучить влияние исследуемых сахаров на способность МКБ р.р. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* и *Lactobacillus* накапливать биомассу.

Объектами исследования были чистые культуры : *Lactococcus lactis subsp. lactis* 454, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* 244, *Streptococcus thermophilus* КДП-5, *Streptococcus thermophilus* 400 3, *Leuconostoc mesenteroides subsp. lactis* РД-5, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* 12 L. В эксперименте использовали также МКБ в составе широко применяемых в производстве лиофилизированных промышленных заквасок: №1. ТА 460 LYO 250 DCU (используемая при производстве творога) (*Streptococcus thermophilus*); №2. PD 208151 – 6. ORU (*Lactobacillus paracasei* подвид *paracasei* – *Lactobacillus paracasei* (используемая при производстве кисломолочных напитков); №3. YO-MIX 208 LYO 250 DCU (используемая при производстве йогурта) (*Streptococcus thermophilus*, *Lbc. delbrueckii* подвид *bulgaricus*, *Lbc. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*).

Установлено, что в процессе культивирования молочнокислых бактерий на среде с маннозой прирост биомассы увеличивается в среднем на 31%, а на среде с фукозой – на 28%.

Применение маннозы для культивирования МКБ (при нейтрализации питательной среды до pH 6,0) обеспечивает увеличение прироста биомассы в среднем на (48-52) %.

Оценку качества заквасочных культур, выращенных на средах, в составе которых глюкоза заменена на маннозу и фукозу, проводили путём сквашивания молока. Как показали результаты, замена глюкозы одним из сахаров в составе среды для выращивания МКБ не оказывает отрицательного влияния на органолептические свойства кисломолочных продуктов, выработанных с их использованием.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективности использования исследуемых углеводов в составе питательных сред при производстве биомассы молочнокислых бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новое в технологии кефира / Пономарёв А.Н., Шуваева Г.П., Мерзликина А.А., Пономарева Е.В. - Вестник ВГУИТ, № 1, 2014, с.146-149.
2. Кунижев, С. М. Распространение и значение минорных моносахаридов/ С. М. Кунижев, Е. В. Денисова// Вестник Ставропольского государственного университета. – 2002. - № 4. – С. 92-100
3. Денисова Е.В. Оптимизация биотехнологии получения минорных моносахаридов и разработка лечебно-профилактических препаратов на их основе/ Е.В. Денисова. - автореферат на соиск. ученой степени кандидата биологических наук, 2002
4. Изучение пребиотических свойств заменителя сахара изомальтулозы в условиях «in vitro»/ О.Ю.Божко, Г.П.Шуваева, О.С.Корнеева// Современные проблемы науки и образования. – 2011.-№5; URL.: www.science-education.ru/99-4920

УДК 619:615.31:547.466

ПРИМЕНЕНИЕ БЕЛКОВОГО ГИДРОЛИЗАТА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ДИСПЕПСИИ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Р.В. Рогов, А.Е. Гунько, А.Я. Самуйленко, А.И. Албулов, М.А. Фролова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», Щелково, Россия

Одной из наиболее острых проблем в животноводстве являются желудочно-кишечные болезни новорожденных телят, которые причиняют большой экономический ущерб. Отход от этих заболеваний составляет более 50% от общего падежа телят [1]. Диспепсия молодняка (несварение) – заболевание, сопровождающееся функциональным расстройством деятельности желудочно-кишечного тракта. Сущность заболевания сводится к нарушению переваривания пищи, поносу, токсикозу и нарушению обмена веществ. Причиной заболевания может служить неполноценное кормление стельных коров и нарушение зооветеринарных правил выращивания телят [2, 3].

Для лечения диспепсии телят использовали инъекционную форму белкового гидролизата из мышечной ткани норок, изготовленную по разработанной нами технологии. Препарат представляет собой ферментативный гидролизат глубокой степени расщепления и содержит в своём составе свободные аминокислоты, в том числе все незаменимые (4).

Изучение влияния инъекционной формы гидролизата проводили в условиях хозяйства ООО «Куриловское» Собинского района Владимирской области.

Для проведения эксперимента были сформированы 2 группы телят костромской породы 1-3-х дневного возраста и 1 контрольная (по 5 голов в каждой). Телята переболевали простой формой диспепсии. Белковый гидролизат вводили подкожно 1 раз в сутки в количестве 50 мл/гол. (1-я опытная группа) и 100 мл/гол. (2-я опытная группа). Контрольной группе животных не вводили.

Во время опыта следили за приростом массы тела животных, проявлением клинических признаков, за сохранностью телят. Среднесуточный и абсолютный прирост определяли до опыта и через 10 дней с начала эксперимента. Все животные, находившиеся в опыте, ежедневно подвергались клиническому осмотру.

На второй день после начала лечения у телят опытных групп появился аппетит, улучшился сосательный рефлекс, каловые массы начали приобретать более оформленную консистенцию, телята становились более активными. К концу лечения клиническое состояние животных нормализовалось.

В контрольной группе телят при хозяйственном способе лечения, продолжительность болезни составила 4,5 дня, ее течение умеренное, количество выздоровевших 90 %, среднесуточный привес составил 220 г. У одного теленка в группе заболевание перешло в токсическую форму.

У телят 1-ой опытной группы продолжительность болезни составила 3,5 дня, что на 1 день короче контрольной. Количество заболевших и выздоровевших животных составило 100 %, при этом среднесуточный привес равнялся 260г, что на 40г. выше, чем в контрольной группе.

Т а б л и ц а 1

Зоотехнические показатели телят во время опыта

Показатели	Группы		
	Контрольная	1-я опытная	2-я опытная
Средний вес при рождении, кг	30.3±1,20	29.6±0,85	28,7±1,70
Количество телят, гол	5	5	5
Возраст, сут.	1-3	1-3	1-3
Продолжительность болезни, дни	4,5	3,5	3,2
Пало, гол.	0	0	0
% заболевших	100	100	100
% выздоровления	90	100	100
Живая масса в 10 дней, кг	32,5±0,35	32,2±0,30	31,5±1,0
Среднесуточный привес, г	220±12,662	260±6,65*	280±7,63*
Абсолютный прирост, кг за 10 дней	2,2±0,153	2,6±0,236	2,8±0,265

Примечание: * $P \leq 0,05$ к контрольной группе.

Во 2-ой опытной группе продолжительность болезни составила 3,2 дня, что на 1,3 дня короче по сравнению с контролем. Среднесуточный привес составил 280г, что на 60 г больше, чем в контроле и на 20 г больше, чем в 1-ой опытной группе.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что введение гидролизатов на ранних сроках развития болезни позволяет предотвратить развития данного состояния организма при этом повысить сохранность молодняка и увеличить среднесуточные привесы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Внутренние болезни животных: учебники для вузов / Под общ. ред. Г.Г.Щербакова, А.В.Коробова // – СПб.: «Лань», 2002. – 736с.
2. Павлов, Д.К. Заболевания желудочно-кишечного тракта у новорожденных телят / Ветеринарная жизнь. – 2006. - №11. – С. 5-7.
3. Мовсум-Заде, К.К. Гидролизаты белка в ветеринарии / К.К. Мовсум-Заде, В.А. Берестов // Петрозаводск: Карелия. - 1989. - 156 с.
4. Фролова М.А. Получение опытно-промышленной партии белкового гидролизата из тушек норок и изучение его токсичности / М.А. Фролова, А.И. Албулов, Р.В. Рогов, П.Н. // Экобиотех-2011. «Известия Самарского научного центра РАН». - Уфа-2011. том 13.№5.-С. 207-209.

УДК 633.19:663.86

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АМАРАНТА В КАЧЕСТВЕ СЫРЬЯ
ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ НАПИТКОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ***О.С. Корнеева, Д.Е. Стрельникова, Л.А. Мирошниченко**ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия*

В настоящее время одним из актуальных вопросов биотехнологии является создание продуктов функциональной направленности.

Для создания различных продуктов, обладающих лечебно-профилактическими свойствами используют растительное сырьё из злаковых культур, таких как рожь, пшеница, ячмень, овёс.

Большинство из этих злаковых содержит в своём составе глютен. Но есть люди с непереносимостью данного компонента, поэтому им противопоказано употреблять в пищу вышеперечисленные злаки.

Мы предлагаем создать напиток на основе такой культуры как амарант.

Семена амаранта содержат в среднем 15-17% белка, 5-8% жиров, 3,7-5,7% клетчатки, витамины В1, В2, Е, D, фосфор, кальций, рутин, фосфолипиды, желчные кислоты, большое количество аминокислот (в особенности лизина). Содержание лизина в белке амаранта в два раза больше, чем у пшеницы.

Если оценить идеальный белок (близкий к яичному) в 100 баллов, то молочный белок казеин будет иметь 72 балла, соевый – 68, пшеницы – 58, кукурузы – 44, а амаранта – 75 баллов.

Еще одно ценное свойство амаранта – содержание в нем легко усвояемых пищевых волокон (клетчатка, пектин). К тому же семена амаранта содержат очень мало глютелинов.

Таким образом амарант является очень перспективным сырьем для создания напитков на его основе.

УДК 577.218

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОВ ВИРУСА КУСТИСТОЙ КАРЛИКОВОСТИ МАЛИНЫ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИРУСОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ РЕМОНТАНТНОЙ МАЛИНЫ***Ю.Ф. Мытницкая, В.В. Заякин, И.Я. Нам**ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет им. И. Г. Петровского», Брянск, Россия*

Во всем мире вирусы растений наносят значительный экономический ущерб посадкам сельскохозяйственных культур. Так, наибольший урон посадкам малины приносит вирус кустистой карликовости (ВККМ), способный снизить урожайность до 70% при комплексной инфекции [1, 2]. Ранее большинство противовирусных стратегий основывались на естественных защитных иммунных механизмах растений. Однако среди диких видов и сортов *Rubus* sp. не выявлено источников резистентности к вирусу кустистой карликовости малины [3]. Поэтому, согласно данным многочисленных исследований, наиболее надежным и эффективным методом контроля является получение устойчивых трансгенных растений.

Механизм устойчивости в подавляющем большинстве используемых методов получения трансгенных растений основан на явлении РНК-сайленсинга, или пост-транскрипционного замолкания генов. Пост-транскрипционное замолкание генов (PTGS) представляет собой консервативный механизм «обратной генетики» для подавления экспрессии целевых генов, у которого обнаруживаются черты сходства с РНК-интерференцией животных [4]. РНК-сайленсинг препятствует размножению вирусов в растениях при помощи двух основных механизмов. В ходе первого происходит деградация как дцРНК, промежуточных продуктов саморепликации вирусов, так и исходных микроРНК (автономно-клеточный сайленсинг), что приводит к увеличению накопления соответствующих miRNA. В ходе второго пути генерируется мобильный сигнал, который запускает деградацию гомологичных микроРНК в отдаленных клетках (системный сайленсинг) [5].

Таким образом, наличие специфичных дцРНК является необходимым условием запуска механизма сайленсинга. Для получения таких дцРНК нами было разработано несколько видов генетических конструкций на основе фрагментов гена транспортного белка и гена белка оболочки ВККМ. В таких конструкциях несколько копий целевого фрагмента объединялись в прямой и обратной ориентации как показано на рисунке 1.

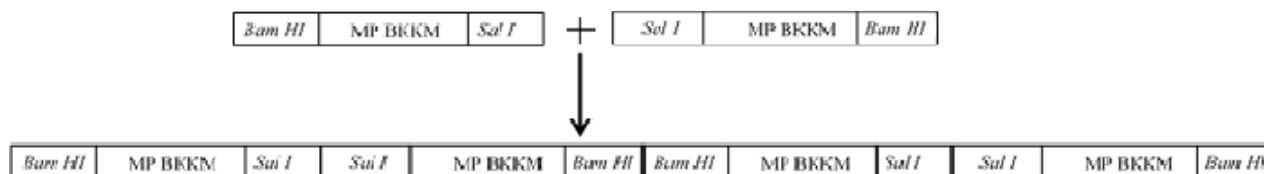


Рисунок 1 - Схема образования многокопийной вставки фрагмента гена транспортного белка ВКМ

При трансформации растительных клеток данными генетическими конструкциями происходит их встраивание в растительный геном. Реализация генетической информации в клетках растения, подвергнутого трансформации, приводит к синтезу мРНК, содержащей область взаимной комплементарности. Наличие взаимной комплементарности способствует формированию вторичной структуры мРНК. Таким образом, образуются дцРНК, способствующие запуску механизма посттранскрипционного замолкания генов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Converse R.H., Auger J. Identification of the Tomato Ring Spot Virus (TomRSV) and Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV) in raspberry in Chile // Fitopatologia. 1984. Vol. 19. №1. P. 22-26.
2. Martin R.R., Keller K.E., Mathews H. Development of resistance to Raspberry Bushy Dwarf Virus in 'Meeker' Red Raspberry // Acta Horticulturae. 2004. Vol. 656. P.186-191.
3. Hall, H. K., Hummer, K., Jamieson, A. J., Jennings, S. N., & Weber, C. A. (2009). Raspberry Breeding and Genetics. Plant Breeding Reviews. Vol.32. P. 290.
4. Fire, A. and S.Q. Xu. 1995. Rolling replication of short DNA circles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 92. P. 4641-4645
5. Tavernarakis, N., Wang, S. L., Dorovkov, M., Ryazanov, A. and Driscoll, M. (2000). Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. Nat. Genet. Vol. 24, P. 180-183.

УДК 619:615.31:547.466

БЕЛКОВЫЙ ГИДРОЛИЗАТ ИЗ ОТХОДОВ ПУШНОГО ЗВЕРОВОДСТВА

А.Е. Гунько, Р.В. Rogov, А.Я. Самуйленко, А.И. Албулов, М.А. Фролова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», Щелково, Россия

Для нормализации протеинового баланса в кормлении животных используют различные белковые добавки, в частности отходы переработки молока, мясокостную и рыбную муку, кормовые дрожжи, белковые гидролизаты и др. Вторичным сырьем при производстве пушнины являются тушки зверей, которые после убоя необходимо своевременно утилизировать, чтобы не загрязнять окружающую среду.

В качестве белокосодержащего сырья для получения белкового гидролизата использовали отходы пушного звероводства (тушки норок), которые получали в зверосовхозах «Салтыковский» и «Русский соболь» Московской области.

По результатам проведенных исследований был разработан промышленный способ получения белкового гидролизата, который характеризуется высокой степенью расщепления белка (содержание аминного азота не менее 7,0 %), содержит в своем составе свободные аминокислоты (в том числе все незаменимые). Выход продукта после высушивания составляет 8,8-10,1 % от массы исходного сырья с остаточной влажностью не более 5,0 %. На способ получения белкового гидролизата из отходов пушного звероводства получен Патент РФ.

В опытах на животных показано положительное влияние белкового гидролизата в составе рациона кормления молодняка норок и соболей на прирост живой массы тела, клинические и биохимические показатели крови, а также в комплексном лечении диспепсии молодняка крупного рогатого скота и свиней.

УДК: 663.5

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БАД «ТЫКВЕРОН» ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ТВОРОЖНЫХ ПРОДУКТОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

А.В. Черкасова, Л.П. Бессонова, А.В. Гребенищikov

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

В настоящее время в общем объеме пищевых продуктов России функциональные (ФП) - составляют около 5%, большинство этих продуктов являются импортными [1]. В связи с санкциями Европейского Союза и США в отношении России дефицит ФП увеличивается, поэтому вопрос создания отечественных натуральных ФП является актуальным и значимым. Данная работа посвящена разработке творожного продукта, обогащенного β -каротином. В качестве источника β - каротина использовалась натуральная БАД «Тыкверон», разработанная авторами, в состав которой входит тыква и яичный желток.

Для ее производства компоненты, входящие в состав БАД (тыкву и яичный желток) подвергали предварительной термической обработке: тыкву варили на пару, а желток при температуре $t=60^{\circ}\text{C}$ в течение 1,5 часов, что дает возможность получить стабильную эмульсию, в процессе последующего смешивания. При этом желток, входящий в состав эмульсии, являлся матрицей – носителем β - каротина, а тыква его источником. Для стабилизации эмульсии на заключительном этапе в ее состав вводили сахар и лимонную кислоту. Витаминизированную смесь подвергали сублимационной сушке, в результате которой получили порошкообразную БАД «Тыкверон».

БАД «Тыкверон» имела светло-желтый цвет, вкус и запах соответствовали аналогичным характеристикам яичного порошка, влажность около 4%.

Микробиологические показатели БАД «Тыкверон» представлены в таблице 1.

Таблица 1

Микробиологические показатели БАД «Тыкверон»

Показатели	Характеристика
Количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, КОЕ /г	$5,3 \cdot 10^3$
Бактерии группы кишечных палочек (колиформы) в массе продукта 0,1 г	-
E.coli в массе продукта 1г	-
S.aureus в массе продукта 1г	-
Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы допускаются в массе продукта 10г	-
Дрожжи, КОЕ /г	21
Плесени, КОЕ /г	7

Как видно из табл., БАД «Тыкверон» соответствует ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» [2].

Для практической апробации применения БАД «Тыкверон» разработан творожный продукт «Натуральный». Для оптимизации его рецептурного состава были приготовлены 3 образца с различным содержанием БАД «Тыкверон». В полученных образцах определяли органолептические и физико-химические показатели в сравнении с контрольным образцом – творогом жирностью 9%.

Органолептические показатели представлены на рисунке 1.

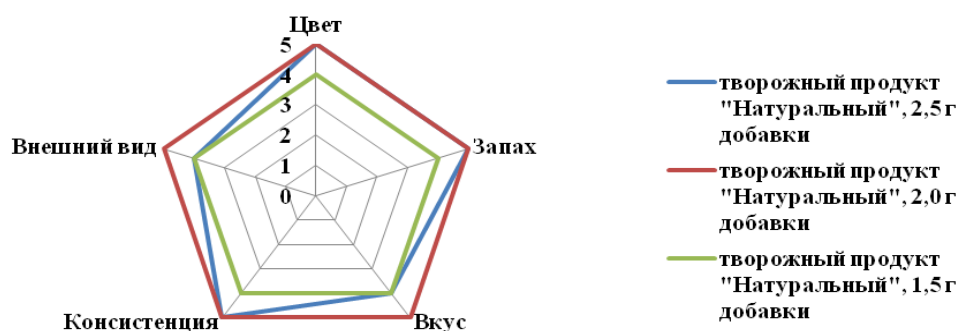


Рисунок 1 – Органолептические показатели творожного продукта «Натуральный»

Как видно на рисунке 1, лучшие показатели органолептической оценки имеет творожный продукт, содержащий 2 мг β-каротина.

При добавлении 50% β-каротина от суточной потребности продукт приобретает более кислый вкус, что можно объяснить увеличением содержания стабилизатора - лимонной кислоты, присутствующего в БАД. Это же подтверждает график изменения титруемой кислотности в процессе хранения творожного продукта, представленный на рисунке 2.

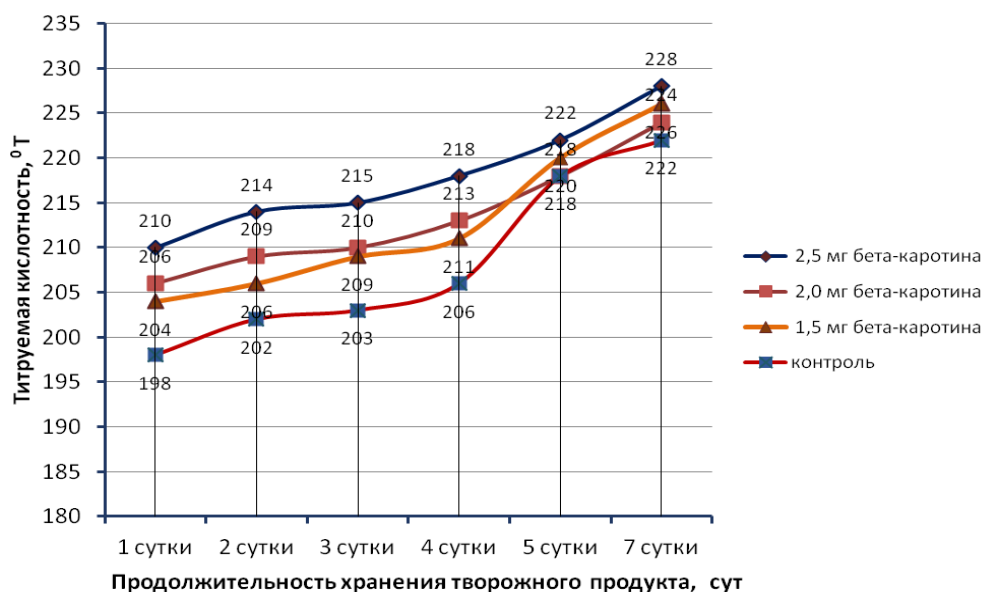


Рисунок 2 – График изменения титруемой кислотности в процессе хранения творожного продукта

Как видно на рисунке 2, творожный продукт «Натуральный», содержащий 2 мг β-каротина, наиболее близок к значениям титруемой кислотности контрольного образца и имеет лучшие органолептические показатели.

Выполненные исследования показали, что применение БАД «Тыкверон» при производстве 100 г. творожного продукта обеспечивает потребителя 40% суточной потребности бета – каротина, соответствует требованиям микробиологической безопасности; благотворно влияет на органолептические и физико-химические показатели конечного продукта (исследование выполнено в рамках государственного задания проекта №3265 от 17.12.14 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Донская Г.А. Функциональные молочные продукты / Г.А.Донская // Молочная промышленность. - 2007. - №3. - с. 52 - 53.
2. ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств»

УДК 602.4:628.35:664

РАЗРАБОТКА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕЧАТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ НА ОСНОВЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И ТЕРМОРАСШИРЕННОГО ГРАФИТА ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ

С.Б. Чарыева, С.С. Каманин, В.А. Арляпов, В.А. Алфёров

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

Развитие промышленной биотехнологии стимулирует разработку методов мониторинга процессов ферментации. Так как в процессе брожения необходимо контролировать содержание глюкозы в таких продуктах как вино, пиво и другие, то необходима разработка селективных методов ее определения с использованием ферментов. На основании изученных литературных источников нами было высказано предположение, что внедрение графитовых материалов в структуру модифицированных печатных электродов позволит улучшить характеристики биосенсоров на их основе. В работе исследовалось влияние терморасширенного графита (ТРГ) отличающиеся высокой тепло- и электропроводностью, хорошей биосовместимостью и высокой удельной площадью поверхности благодаря пористой структуре, которая позволяет повысить чувствительность за счет увеличения фактора шероховатости [1-3]. Выбранный нами фермент - глюкозооксидаза (ГО) обладает абсолютной специфичностью, катализируя окисление β -D-глюкозы с образованием глюконолактона. Для эффективного переноса электронов с активного центра фермента на электрод используются медиаторы, например ферроцен. Уникальная сэндвич-подобная структура ферроцена при переходе от восстановленной в окисленную форму позволяет не менять координационную сферу и геометрию комплекса [4].

Целью данной работы является разработка и определение характеристик ферментных биосенсоров на основе модифицированных печатных электродов с использованием терморасширенного графита и ферроцена для контроля содержания глюкозы в продуктах биотехнологических производств.

В качестве преобразователя использовали потенциостат PalmSens EmStat (PalmSens, Нидерланды) интегрированный с графитовым печатным электродом (Русенс, Россия). На поверхности электрода, модифицированного терморасширенным графитом, располагали глюкозооксидазу иммобилизованную в поперечно-сшитый гидрогель бычьего сывороточного альбумина (БСА). Сшивающим агентом служил глутаровый альдегид (ГА). За ответ сенсора принималась амплитуда изменения выходного сигнала биосенсора при добавлении глюкозы.

Определены основные аналитические и метрологические характеристики биосенсора на основе печатного электрода. Диапазон определяемых концентраций глюкозы для биосенсора на основе модифицированных печатных электродов составил 0,87-1,8 ммоль/дм³. Разработанные сенсоры характеризуются высокой операционной стабильностью (2,1%) и экспрессностью (1-2 мин). Проведенное исследование стабильности сигнала полученных печатных электродов при хранении, показало, что они не теряют своей активности в течение 30 суток и характеризуются хорошей воспроизводимостью ($n = 3$).

Разработанный биосенсор на основе модифицированных печатных электродов по своим характеристикам не уступает известными аналогами, а именно с электродом на основе ГО иммобилизованной в полиэтиленмин [5] и электродом модифицированным оксидом олова SnO₂, покрытой пленкой Nafion [6].

Проведен анализ образцов винной продукции с использованием разработанных электродов. В качестве референтного метода применяли метод капиллярного электрофореза. Значения, полученные с использованием разработанных электродов, и референтным методом анализа различаются незначимо.

Таким образом, используемые печатные электроды в сочетании с разработанными методами иммобилизации позволяют получать биосенсоры с высокими аналитическими и метрологическими характеристиками, которые могут применяться для определения содержания глюкозы в бродильных средах.

Работа выполнена при поддержке государственного задания Минобрнауки РФ № 14.2094.2014/К и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук, договор № 14.Z56.14.330-МК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang Z., Dai Z. Carbon material-based electrochemical biosensors: an overview //Nanoscale. – 2015. – Т. 7. – №. 15. – С. 6420-6431.
2. Яковлев А. В. и др. Терморасширенный графит: синтез, свойства и перспективы применения (Обзор) //Журнал прикладной химии. – 2006. – Т. 79. – №. 11. – С. 1761-1771.
3. Wang L. et al. Preparation and Its Adsorptive Property of Modified Expanded Graphite Nanomaterials //Journal of Chemistry. – 2014. – Т. 2014.
4. Metzler-Nolte N., Salmain M. The bioorganometallic chemistry of ferrocene //Ferrocenes: Ligands, Materials and Biomolecules. – 2008. – С. 499-639.
5. Pchelintsev N. A., Vakurov A., Millner P. A. Simultaneous deposition of Prussian Blue and creation of an electrostatic surface for rapid biosensor construction // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2009. – Т. 138, № 2. – С. 461-466.
6. Berisha L. et al. A New Biosensor for Glucose Based on Screen Printed Carbon Electrodes Modified with Tin (IV)-Oxide. – 2013.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

журнала «*Актуальная биотехнология*»

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

- **Фундаментальные аспекты современной биотехнологии**
- **Биотехнология в пищевых, химических производствах и сельском хозяйстве**
- **Биоинженерия и биоинформатика, бионанотехнологии**
- **Оборудование и автоматизация биотехнологических производств**
- **Информационные технологии и математическое моделирование**
- **Экология и ресурсосбережение**
- **Экономика и управление**
- **Высшая школа в подготовке кадров**

Требования к оформлению статей

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

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

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

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

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

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

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

5. Иллюстрации в формате jpeg или gif:

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

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

6. Формулы и буквенные обозначения:

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

Формат формул (стандартный редактор) :

- стиль – «математический»;
- размер символа — 11

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

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

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

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

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

К статье должны прилагаться сопроводительные документы:

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

Вопрос об опубликовании статьи, ее отклонении решает редакционный совет журнала и ее решение является окончательным. В случае возвращения статьи для исправления датой представления считается день получения исправленного текста. Срок доработки – не более 1 месяца