

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
СЕВЕРНЫЙ (АРКТИЧЕСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ



**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ  
ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ  
СИНТЕТИЧЕСКИХ  
И ПРИРОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ»  
(НАРОЧАНСКИЕ ЧТЕНИЯ - 11)**

**Материалы  
Международной научно-практической конференции  
20–23 сентября 2017 г.**

Минск – Ставрополь 2017

УДК 001.11: 57.08  
ББК 30.16  
М 75

Рекомендовано Советом биологического факультета  
18 октября 2017 г., протокол №2

Составители:

Курченко В.П. – заведующий НИЛ прикладных проблем биологии БГУ  
Лодыгин А.Д. – заведующий кафедрой прикладной биотехнологии  
Института живых систем СКФУ

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор *В.М. Юрин*;  
кандидат биологических наук *С.В. Ризевский*

**М 75 Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ (Нарочанские чтения - 11): материалы Международной научно-практической конференции (20–23 сентября 2017 г.). / БГУ, СКФУ, САФУ; составители: В.П. Курченко, А.Д. Лодыгин. – Минск – Ставрополь : Белорусский государственный университет, Северо-Кавказский федеральный университет, 2017. – 317 с.**

Сборник включает материалы научных исследований в области получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ и других приоритетных направлений.

ISBN 978-5-9596-1348-8

УДК 001.11: 57.08  
ББК 30.16

© ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», 2017  
Белорусский государственный университет, 2017

**Состав оргкомитета  
Международной научно-практической конференции  
«Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и  
применения синтетических и природных биологически активных  
веществ» (Нарочанские чтения - 11)**

*Сопредседатели:*

**Усанов Сергей Александрович** – член-корр. НАН Беларуси, профессор, д-р хим.наук.

**Решетников Владимир Николаевич** – академик НАН Беларуси.

**Лодыгин Алексей Дмитриевич** – профессор, д-р техн. наук, заместитель директора Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета (Россия).

**Морозова Людмила Владимировна** – профессор, д-р биол. наук, директор Высшей школы естественных наук Северного (Арктического) федерального университета (Россия).

*Заместитель сопредседателей:*

**Курченко Владимир Петрович** – канд. биол. наук, доцент, заведующий НИЛ прикладных проблем биологии Белорусского государственного университета.

*Члены оргкомитета:*

**Аксенов Андрей Сергеевич** – канд. техн. наук, заведующий кафедрой Северного (Арктического) федерального университета (Россия),

**Алиева Людмила Руслановна** – канд. техн. наук, начальник управления Северо-Кавказского федерального университета (Россия).

**Буга Сергей Владимирович** – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии Белорусского государственного университета.

**Варламов Валерий Петрович** – д-р хим.наук, профессор, Президент Российского хитинового общества (Россия).

**Евдокимов Иван Алексеевич** – д-р техн. наук, профессор, заведующий кафедрой Северо-Кавказского федерального университета (Россия).

**Жукова Татьяна Васильевна** – д-р биол. наук, директор УНЦ «Нарочанская биологическая станция» Белорусского государственного университета.

**Калиниченко Елена Николаевна** – д-р хим.наук, зав. отделом ИБОХ НАН Беларуси.

**Лысак Владимир Васильевич** – канд. биол. наук, доцент, декан биологического факультета Белорусского государственного университета.

**Мелентьев Александр Иванович** – д-р биол. наук, профессор, почетный директор Института биологии РАН (Россия).

**Новожилов Евгений Всеволодович** – д-р техн. наук, профессор, заведующий кафедрой Северного (Арктического) федерального университета (Россия).

**Шадыро Олег Иосифович** – профессор, заведующий кафедрой радиационной химии и химико-фармацевтических технологий Белорусского государственного университета.

**Юрин Владимир Михайлович** – профессор, д-р биол. наук, профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений Белорусского государственного университета.

***РАЗДЕЛ 1***  
***ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ***  
***БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЖИВОТНОГО,***  
***РАСТИТЕЛЬНОГО И ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ***

## RATIONALIZATION OF FISH OIL KINETICS TRANSPORT FROM ALGINATE CAPSULES

Aleksandr Evteev<sup>1</sup>, Kirill Pankin<sup>2</sup>, Olga Larionova<sup>1</sup>, Anna Bannikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Food and Biotechnology, Saratov State Agrarian University, Sokolovaya street 335, 410005, Saratov, Russia

<sup>2</sup>Faculty of Engineering and Environmental Engineering, Saratov State Agrarian University, Sovetskayast. 60, 410012, Saratov, Russia  
annbannikova@gmail.com

*We prepared alginate capsules with a wide range of fish oil loading in order to develop a delivery device that targets a specific part of the human digestive system. In-vitro studies demonstrated that alginate capsules can hold up to 40% (w/w) oil leading to a controlled diffusion process under simulated gastrointestinal conditions. A partial differential equation was solved successfully to monitor the entirety of fish oil release unveiling apparent diffusion coefficients that vary five orders of magnitude between gastric and intestinal stages.*

*Были сконструированы инкапсулированные формы рыбьего жира с высоким его содержанием в целях изучения контролируемой доставки в имитированных условиях желудочно-кишечного тракта человека. Исследования invitro показали, что капсулы альгината могут удерживать до 40% масла, что приводит к контролируемому диффузионному процессу при модельных желудочно-кишечных условиях. Уравнение с частными производными было успешно применено для контроля за контролируемым высвобождением рыбьего жира с раскрытием очевидных коэффициентов диффузии, которые варьируются на пять порядков между стадиями желудка и кишечника.*

Alginates are readily processable into three-dimensional scaffolding materials including hydrogels, microcapsules, sponges, foams and fibers for the design of tissue engineering and sophisticated drug-delivery devices [6]. Advanced technologies for successful utilization of bioactivity in food formulations require multifunctional encapsulating materials and sodium alginate, which is a water-soluble linear polysaccharide made of  $\alpha$ -L-guluronic and  $\beta$ -D-mannuronic acid residues, has found widespread application in this respect [5]. In terms of the encapsulated compound, essential fatty acids are popular since they cannot be synthesized in the body and must be obtained from food. These have been incorporated in product concepts using spray-drying, simple and complex coacervation, emulsion extrusion [2, 9] and supercritical fluid precipitation [3]. Given the above, this study aims to investigate the efficiency of fish oil encapsulation in Ca-alginate beads during the *in vitro* digestion. Partial differential equations of the Fickian mechanism were solved to yield an accurate estimate of the molecular process that controls diffusion in these preparations.

To pursue the level of alginate utility in product concepts, we need to rationalize and quantify the kinetics of fish oil diffusion within our polymeric matrices. In doing so, we employed UV-vis spectroscopy that determines the optical density of essential fatty acids in hexane. Smooth absorbance curves were obtained within the wavelength range of 260 - 300 nm, with maximum values being recorded at  $\lambda_{max} = 280$  nm. A combined experimentation was carried out, over 180 min of simulated gastric and intestinal conditions, showing an intense release of oil from the capsules in the latter stage. This relates to the oil content in capsules, and Figure 1 clearly demonstrates that preparations are stable at both oil loadings (20 or 40%, w/w) during the gastric stage. In contrast, there are signs of a substantial oil release from the alginate beads after 120 min of digestion, i.e. at the onset the intestinal phase, leaving only residual oil in capsules.

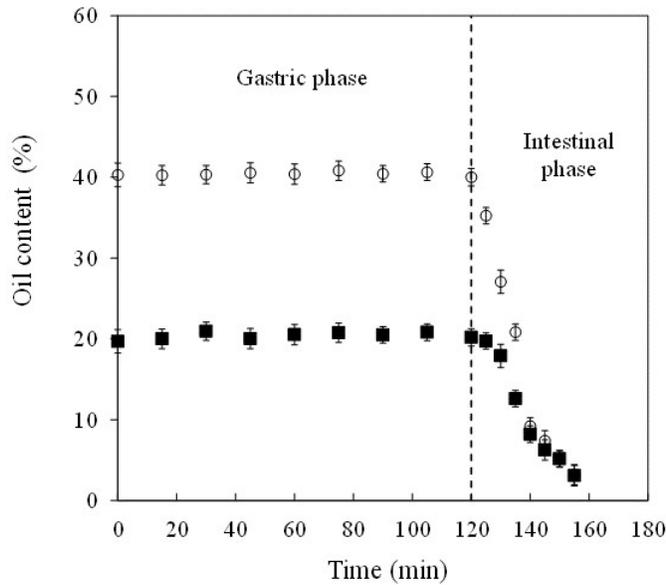


Figure 1 – Oil content as a function of time for alginate capsules in simulated gastrointestinal conditions with 20 (■) and 40 (○) % oil loading

To identify the transport rate of fish oil in the medium of this investigation, we considered concepts of the classic diffusion theory that elucidate the underlying transport mechanism and predict the resulting release kinetics as a function of the design (geometry and composition) of the device. The theory is epitomized in the following partial differential equation [7]:

$$\frac{\partial C_k}{\partial t} = \frac{1}{r} \left\{ \frac{\partial}{\partial r} \left( r \cdot D_k \frac{\partial C_k}{\partial r} \right) + \frac{\partial}{\partial \theta} \left( \frac{D_k}{r} \cdot \frac{\partial C_k}{\partial \theta} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left( r \cdot D_k \frac{\partial C_k}{\partial z} \right) \right\} \quad (1)$$

where,  $C_k$  and  $D_k$  are the concentration and diffusion coefficient of the diffusing species (bioactive component in our case),  $r$  denotes the radial coordinate,  $z$  is the axial coordinate,  $\theta$  is the angular coordinate, and  $t$  represents time.

Equation (1) can be solved analytically under perfect sink conditions, homogeneous initial drug distribution, and constant drug diffusivity for spheres of radius  $R_s$  yielding the below mathematical expression [8]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{D \cdot n^2 \cdot \pi^2 \cdot t}{R_s^2}\right) \quad (2)$$

where,  $M_t$  and  $M_\infty$  are the cumulative amounts of drug released at time  $t$  and  $t = \infty$ ,  $D$  is the apparent diffusion coefficient, and  $n$  is a dummy number.

Figure 2 reproduces the experimental observations and the outcome of employing equation (2) in the prediction of diffusion rates under model gastrointestinal conditions. Experimental release rates ( $M_t/M_\infty$ ) remained stable in the gastric environment but increased sharply in alkaline conditions, as reported for the percentage of released oil in Figure 5. These were modelled as a function of time of observation in Microsoft Visual Basic, and programming errors were minimised by considering a certain number of sequential layers ( $n = 50$ ). The theoretical function is verified by fitting the independent release rates with a very acceptable correlation coefficients ( $R^2 = 0.980-0.990$ ).

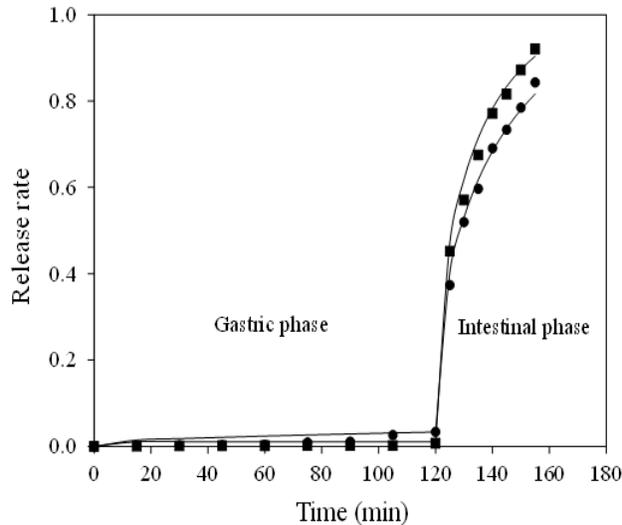


Figure 2 – Release rate of encapsulated oil in simulated gastrointestinal conditions for 20 (●) and 40 (■) % oil loading, and predictions of computerized modeling using a partial differential equation (solid lines)

As long as the differential equation is solved successfully, it has the advantage of following the entirety of experimental observations ( $M_t/M_\infty \leq 1.0$ ) in contrast to a body of empirical equations that provide valid solutions only for the early ( $M_t/M_\infty < 0.6$ ) or late ( $M_t/M_\infty > 0.6$ ) stages of data release [7]. It yields  $D$  values for both oil loadings of about  $1.0 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$  in the gastric phase and  $1.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  in the intestinal phase. Clearly, the effect of polymeric network swelling in the alkaline environment of this investigation is demonstrated by the high values of the apparent diffusion coefficient leading to rapid transport phenomena. Fish oil release from the “low-solid system” of sodium alginate is also rapid compared to transport phenomena of  $\alpha$ -linolenic acid diffusing from the “condensed matrix” of  $\kappa$ -carrageenan and polydextrose (85% total solids) at its network glass transition temperature ( $D = 1.0 \times 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) [4].

## References

1. Chang, C. P., Leung, T. K., Linc, S. M. & Hsu, C.C. (2006). Release properties on gelatin-gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 50, 136-140.
2. Gorbunova, N., Evteev, A., Evdokimov, I. & Bannikova, A. (2016). Kinetics of ascorbic acid transport from alginate materials during in-vitro digestion. *Journal of Food and Nutrition Research*, 55, 148–158.
3. Martín, A., Varona, S., Navarrete, A. & Cocero, M.J. (2010). Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *Open Chemical Engineering*, 4, 31-41.
4. Paramita, V.D., Bannikova, A. & Kasapis, S. (2015). Release mechanism of omega-3 fatty acid in  $\kappa$ -carrageenan/polydextrose undergoing glass transition. *Carbohydrate Polymers*, 126, 141-149.
5. Patel, A. R. & Velikov, K. P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: a general comparison with oral drugs delivery. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1958-1964.
6. Rayment, P., Wright, P., Hoad, C., Ciampi, E., Haydock, D., Gowland, P. & Butler, M.F. (2009). Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: In vitro characterization. *Food Hydrocolloids*, 23, 816–822.
7. Siepmann, F. Karrou, Y., Gehrke, M., Penz, F.K. & Siepmann, J. (2017). Limited drug solubility can be decisive even for freely soluble drugs in highly swollen matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 526, 280-290.
8. Siepmann, J. & Siepmann, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 328-343.
9. Yuliani, S., Torley, P.J., D'Arcy, B., Nicholson, T., Bhandari, B. (2006). Extrusion of mixtures of starch and d- limonene encapsulated with  $\beta$ -cyclodextrin: flavour retention and physical properties. *Food Research International*, 39, 318-331.

## EFFECT OF ULTRASOUND ON THE EXTRACTION AND CHARACTERISATION OF BIOACTIVES FROM PLANTS

Natalia Gorbunova<sup>1</sup>, Aleksandr Evteev<sup>1</sup>, Olga Larionova<sup>1</sup>, Ivan Evdokimov<sup>2</sup>,  
Anna Bannikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Food and Biotechnology, Saratov State Agrarian University, Sokolovaya street 335, 410005, Saratov, Russia

<sup>2</sup>Institute of Life Sciences, North-Caucasus Federal University, Pushkin street 1, 355099, Stavropol, Russia  
annbannikova@gmail.com

*Extracts from Beta Vulgaris cv. beet greens using conventional and ultrasound treatment were obtained. Amount of betacyanins, betaxanthins, polyphenols and antocians in the extracts obtained with different extraction methods was investigated. It was found that the extraction using ultrasound result*

*in improving of content of bioactive compounds and antioxidant activity in plant extracts.*

*Были получены экстракты из свекольной ботвы *Beta Vulgariscv.* с использованием обычной и ультразвуковой обработки. Было исследовано количество бетацианинов, бетаксантинов, полифенолов и антоцианов в экстрактах, полученных различными методами экстракции. Было установлено, что экстракция с использованием ультразвука приводит к увеличению содержания биологически активных соединений и антиоксидантной активности в растительных экстрактах.*

Sugar production leads to the formation of significant quantities of by-products such as beet pulp, sludge cake, lime, molasses and beet green which can be successfully applied for extraction of valuable essential components. In turn, the extracts can be widely used in different areas of industrial production, in particular in the food industry. Methods such as cold pressing, heating reflux, soxhlet and solvent extraction have been widely used to extract bioactive components from natural products [2, 3, 5, 8]. However, disadvantages including safety hazards, high energy input, low product quality, environment risk and toxicological effects were always found during extraction [2, 3, 1]. Therefore, improving the extraction methods in bioactives production is necessary and will be an advantage in food and pharmaceutical industry. Recently, novel extraction methods such as accelerated solvent, ultrasound-assisted, microwave-assisted, supercritical fluid and enzyme-assisted extraction have been developed [4, 6, 7]. Amongst them, ultrasound assisted extraction has been confirmed as a more economic, environmentally friendly and efficient techniques due to significant acceleration the transition process active substances from raw material to the medium. It is known that the effect of extraction methods of plant cells and tissues can result in significant changes in content of bioactive compounds such as antioxidants, polyphenols. For instance, changes in betacyanin/betaxanthins ratios and concentrations of betacyanins have been reported in various plant extracts depending on the extraction method [6, 7].

In the study reported here, extracts were obtained from 0.5 g of crushed beet green using different extraction conditions. The final extract was free from any unpleasant smell and possessed time-stable colour patterns. A graphical representation of the results on the effect of extraction method and different solvent on the content of betaxanthins, betacyanins, polyphenols and antocians in the extracts is presented in Figure 1.

On the basis of the obtained data, a direct correlation between the amount of biologically active compounds and method of extraction as well as the type of extractant is depicted. The most complete recoveries were observed in samples obtained using ethyl alcohol and alkali. It should be noted that ultrasonic treatment

can increase the amount of betaxanthins, betacyanins, polyphenols and antocians up to 45% in the final extract.

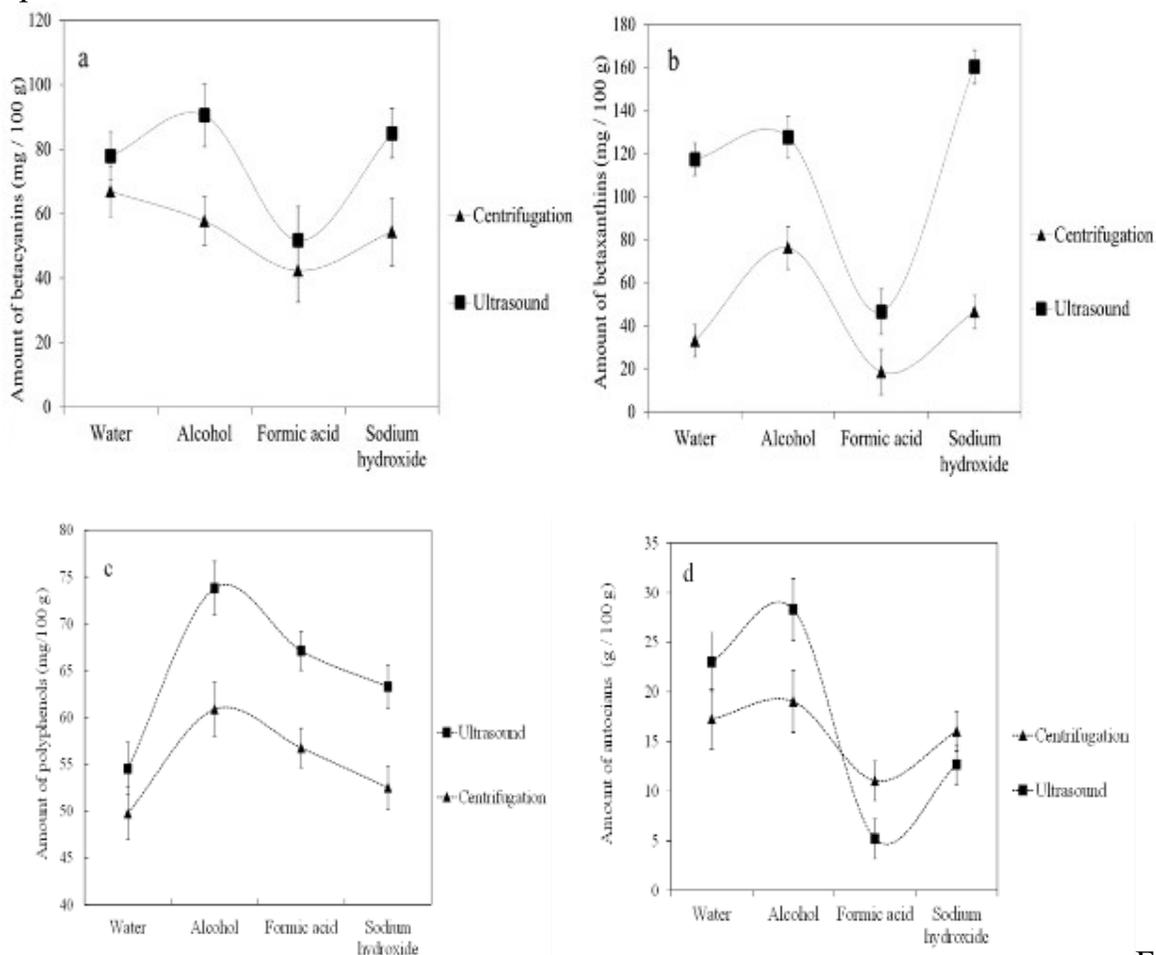


Figure 1 – Amount of (a) betacyanins, mg/100 g, (b) betaxanthins, mg/100 g, (c) polyphenols, mg/100 g, (d) antocians, g/100 g in the extracts obtained using centrifugation or ultrasound treatment depending on solvent

Analyses of betacyanins content (Figure 1a) in the extracts showed that there were substantial differences in the amount of their concentrations depending on the type of treatment (centrifugation or ultrasound) and solvent. Hence, the least amount of betacyanins ( $42.3 \pm 10.5$  mg/100 g) was obtained with centrifugation and using a formic acid as a solvent. The maximum content of betacyanins ( $90.5 \pm 7.5$  mg/100 g) was found in the ultrasound assisted extraction with alcohol. The maximum amount of betaxanthins (Figure 1b), polyphenols (Figure 1c) and antocians (Figure 1d) was obtained utilizing ultrasound and alcohol with revealing values of  $127.6 \pm 9.8$  mg/100 g,  $60.9 \pm 2.9$  mg/100 g and  $28.3 \pm 3.1$  g/100 g, respectively. These values were 1.5 times higher to those obtained with the same solvent (alcohol) and centrifugation, which shows the significance of ultrasound assisted extraction procedure.

Experimental data also reveal that the extraction performed using alcohol and ultrasonication resulted in increased antioxidant activity as compared to the centrifugation and other solvents (data not shown). Presumably, this difference in antioxidant activity can be explained by a greater degree of extraction resulting in increasing amount of antioxidants. Hence, it was confirmed that under the influence of ultrasonic vibrations there is a more rapid and active destruction of intracellular tissues of plant material, which leads to an intensification of the extraction process and increasing the content of biologically active compounds in solution.

## References

1. Chen, M., Zhao, Y., & Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, 543–550.
2. Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., & Anelli, G. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*, 110 (3), 659–669.
3. Du, F.-Y., Xiao, X.-H., & Li, G.-K. (2007). Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizoma Polygoni Cuspidati*. *Journal of Chromatography A*, 1140 (1), 56–62.
4. Luque de Castro, M., & Garcia-Ayuso, L. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369 (1), 1–10.
5. Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1 (1), 7–18.
6. Sporning, S., Bøwadt, S., Svensmark, B., & Björklund, E. (2005). Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil. *Journal of Chromatography A*, 1090 (1), 1–9.
7. Vilku, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9 (2), 161–169.
8. Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106 (2), 804–810.

ОСОБЕННОСТИ БИОДЕГРАДАЦИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА  
ПОЧВЕННЫМ МИКРОМИЦЕТОМ *PENICILLIUM GLABRUM* IB-37-2

Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Сафина В.Р.

Уфимский Институт биологии РАН, г. Уфа, gleakt@anrb.ru

Обнаружено, что штамм почвенного гриба *P. glabrum* IB-37-2, предварительно выделенный на среде с хитозаном (СД~85%), проявляет способность к интенсивному росту и быстрой деградации данного аминополисахарида при глубинном культивировании с активным перемешиванием. В аналогичных условиях гриб слабо гидролизует крабовый хитин, однако при этом он показывает сходный уровень продукции хитозан-деградирующих ферментов (1-1,5 ед/мл), как и в среде с хитозаном. Различная степень биodeградации хитина и хитозана штаммом *P. glabrum* IB-37-2 коррелирует с уровнем синтеза им хитиназ и хитозаназ. Гриб обнаруживает также способность к конститутивной продукции *N*-ацетил- $\beta$ -*D*-глюкозаминидазы. Данный фермент, вероятно, участвует в деградации обоих субстратов, поскольку его синтез существенно возрастает в присутствии коллоидного хитина. Выделенный гриб рассматривается как перспективный продуцент для биотехнологического получения хитозан-деградирующих ферментов и переработки хитин-содержащих отходов.

Хитин – один из наиболее распространенных биополимеров в природе, чья ежегодная мировая продукция составляет около  $10^{10}$ - $10^{11}$  т [2]. Микробная деградация хитина, активно протекающая в водных и почвенных экосистемах, является важнейшим звеном глобального круговорота углерода и азота. Хитозан, представляющий собой частично или полностью деацетилированный сополимер хитина, состоящий преимущественно из остатков *D*-глюкозамина, в естественных условиях встречается значительно реже, однако, считается, что биodeградация этого полисахарида составляет один из путей в едином процессе природной трансформации хитина, включающем участие хитиназ, хитиндеацетилаз, хитозаназ и других ферментов [2, 7, 9]. Хитозан и его олигомеры могут образовываться как промежуточные продукты расщепления хитина, а также встречается в виде естественного субстрата в остатках мицелия мукоровых грибов, биомассы некоторых одноклеточных водорослей и покровных тканей насекомых [9]. Это обуславливает довольно широкую распространенность хитозаназ у почвенных микроорганизмов [7]. Одними из наиболее активных деструкторов хитина и хитозана являются микромицеты, в особенности, представители родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* и др. [4, 7]. Некоторые виды характеризуются способностью к одновременной продукции хитиназ и хитозаназ, при этом синтез ферментов может носить как конститутивный, так и индуцибельный характер [4]. Хитин- и хитозан-деградирующие грибы, наряду с бактериями, могут найти широкое

применение в биоконверсии хитин-содержащих отходов переработки морепродуктов, в т.ч. для получения ферментных препаратов, биофунгицидов, хитоолигосахаридов и других биоактивных соединений [8]. В то же время, хитозаназы грибов изучены существенно меньше по сравнению с аналогичными ферментами бактерий. Целью настоящей работы была сравнительная оценка способности почвенного гриба *Penicillium glabrum* IB-37-2, а также его ферментного комплекса, осуществлять деградацию хитина и хитозана.

**Объекты и методы исследований.** Штамм *P. glabrum* IB-37-2 первоначально был выделен при 37°C и pH 4,0 из образца выщелоченного чернозема как активный деструктор хитозана. В дальнейшем гриб поддерживали при 28°C и pH 6,0 на картофельно-глюкозном агаре (КГА) или среде следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,5;  $\text{NaNO}_3$ , 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2;  $\text{CaCl}_2$ , 0,1; пептон, 3; дрожжевой экстракт, 1; кукурузный экстракт, 1; хитозан, 5; агар, 16. Хитозан стерилизовали отдельно от других компонентов среды. В работе использовали хитозан со степенью деацетилирования ~85% (“Sigma-Aldrich”). Динамику накопления биомассы гриба, синтеза ферментов и деградации хитина и хитозана изучали при его глубинном культивировании в жидких средах аналогичного состава с 0,5% коллоидного хитина и 0,5% хитозана, соответственно. Коллоидный хитин получали из очищенного крабового хитина («Биопрогресс») по модифицированному методу [6]. Культивирование осуществляли в течение 10 сут при 28°C и 220 об/мин на шейкере-инкубаторе Innova 40R. Степень деградации субстратов оценивали по убыли их сухого веса в % от исходного содержания. Хитиназную и хитозаназную активность гриба определяли методом, описанным в [3]. N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазную активность по скорости гидролиза 5 мМ п-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминида (“Sigma”) [1]. Эксперименты проводили в трехкратной повторности, статистическую обработку осуществляли с помощью программы ORIGIN SRO 7.0.

**Результаты и обсуждение.** Штамм *P. glabrum* IB-37-2, селективно выделенный из выщелоченного чернозема, характеризовался как преимущественный деструктор хитозана, осуществляющий быструю деградацию этого субстрата. Убыль хитозана уже в первые двое суток культивирования *P. glabrum* IB-37-2 достигала 50%, и к 4-м суткам субстрат исчерпывался почти полностью, тогда как эффективность конверсии хитина составляла менее половины в конце 10-суточного цикла культивирования (рисунок 1). В присутствии хитозана наблюдалось более быстрое и повышенное накопление грибной биомассы по сравнению с хитин-содержащей средой (рисунок 2, А, Б). Тем не менее, уровень продукции хитозан-деградирующих ферментов *P. glabrum* IB-37-2 был примерно одинаков в средах с обоими субстратами (рисунок 2, В). Замена хитозана коллоидным хитином не влияла на характер синтеза ферментов, - хитиназная

активность в культуральной среде оставалась на том же низком уровне при высокой хитозаназной активности (рисунок 2, В).

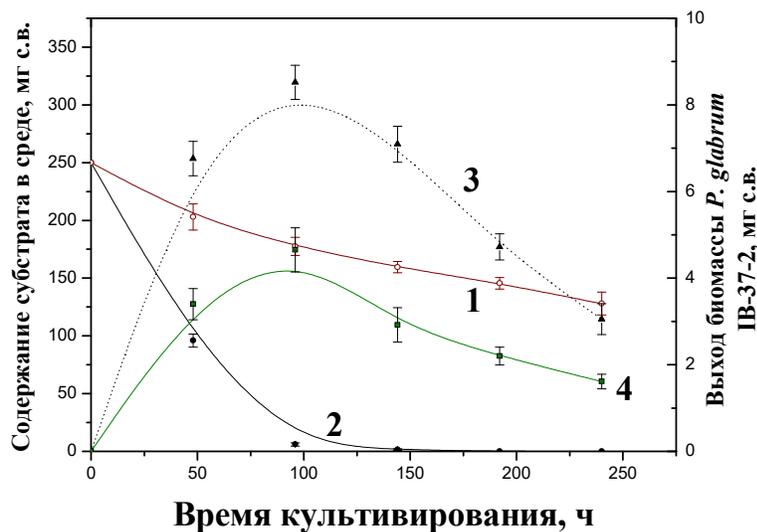


Рисунок 1 – Динамика деградации коллоидного хитина (1) и хитозана (2) штаммом *P. glabrum* ИВ-37-2, и накопление биомассы гриба при его глубинном культивировании в среде с хитином (3) и хитозаном (4)

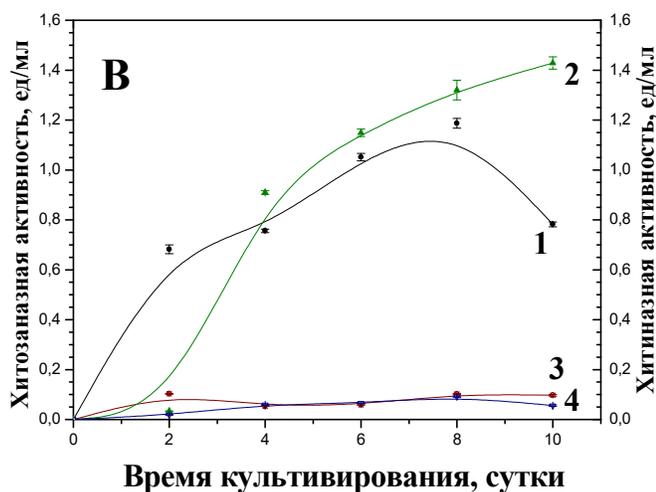
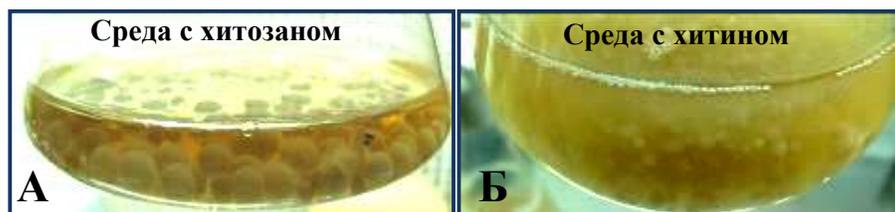


Рисунок 2 – Характер роста (А, Б) и динамика (В) хитозаназной (1, 2) и хитиназной (3, 4) активности (В) штамма *P. glabrum* ИВ-37-2 при глубинном культивировании в среде с хитозаном (1, 3) и коллоидным хитином (2, 4)

Таким образом, главной особенностью штамма *P. glabrum* IB-37-2 можно назвать его высокую хитозан-деградирующую активность при низком уровне деградации хитина. Эта специфика проявлялась и в интенсивности секреции грибом соответствующих ферментов, в том числе на среде с хитином. В этих условиях у гриба обнаруживалась также высокая N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазная активность (рисунок 3).

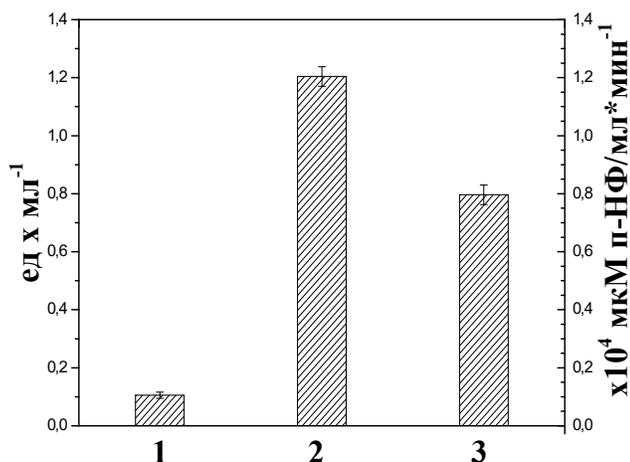


Рисунок 3 – Уровень продукции хитиназы (1), хитозаназы (2) и N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы (3) штаммом *P. glabrum* IB-37-2 в среде с коллоидным хитином (5-е сут)

Различие в хитозан- и хитин-деградирующей активности *P. glabrum* IB-37-2 подтверждалось действием его внеклеточного ферментного комплекса. Динамика расщепления хитозана ферментами гриба была значительно быстрее скорости ферментативной конверсии коллоидного хитина, при этом картина сравнительной деполимеризации обоих полисахаридов была одинаковой как при анализе скорости продуктов реакции, так и по оценке степени убыли субстрата (рисунок 4).

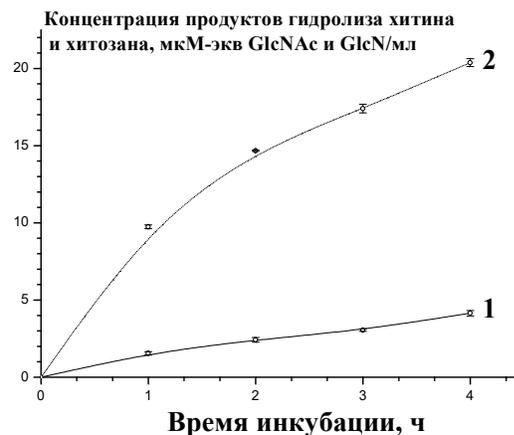


Рисунок 4 – Динамика деполимеризации коллоидного хитина (1) и хитозана (2) (5 мг/мл) ферментным комплексом *P. glabrum* IB-37-2, оцениваемая по накоплению продуктов расщепления

Полученные результаты показывают, что внеклеточный ферментный комплекс *P. glabrum* IB-37-2 представлен индуцибельными гидролазами, расщепляющими преимущественно хитозан, тогда как хитинолитическая активность гриба составляет не более 5-10% его хитозаназной активности. Незначительная деградация хитина грибом, по всей видимости, обусловлена его частичным гидролизом под действием хитозаназ и N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаз. Последний фермент синтезируется *P. glabrum* IB-37-2 конститутивно (данные не представлены), однако его продукция значительно возрастает в присутствии коллоидного хитина. Как известно, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы расщепляют хитиновые димеры до мономера, однако, некоторые из них могут действовать по экзо-механизму на более длинные олигомеры хитина, а также на сам хитин [5]. Способность *P. glabrum* IB-37-2 к активной продукции хитозаназ в присутствии хитина показывает перспективность применения этого штамма в биоконверсии хитин-содержащего сырья и получения ферментов для направленной деструкции хитозана.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ №16-14-00046.

#### **Список литературы:**

1. Актуганов, Г.Э. Хитинолитическая активность бактерий *Bacillus* Cohn – антагонистов фитопатогенных грибов / Г.Э. Актуганов, А.И. Мелентьев, Л.Ю. Кузьмина [и др.] // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 356-360.
2. Beyer S., Bertillsson S. Bacterial chitin degradation – mechanisms and ecophysiological strategies. Review // *Frontiers in Microbiology*. 2013. V. 4. P. 1-12: doi 10.3389/fmicb.2013.00149.
3. Helisto P., Aktuganov G., Galimzianova N., Melentjev A., Korpela T. Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: Isolation and purification of components // *J. Chrom. B Biomed Sci. Appl.* 2001. V. 758, No. 2. P. 197-205.
4. Jung W.-J., Park R.-D. Bioproduction of chitoooligosaccharides. Review // *Mur. Drugs*. 2014. V. 12. P. 5328-5356.
5. Patil R.S., Ghormade V., Deshpande M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration // *Enzyme Microb. Technol.* 2000. V. 26. P. 473-483;
6. Rodriguez-Kabana R., Godoy G., Morgan-Jones G., Shelby R. The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies // *Plant and Soil*. 1983. V. 75. P. 95-106.
7. Thadathil N., Velappan S.P. Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review // *Food Chem.* 2014. V. 150. P. 392-399.
8. Wang S.-L., Liang T.-W., Yen Y.-H.. Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. Review // *Carbohydr. Pol.* 2011. V. 84, No. 2. P. 732-742.

9. Zhao Y., Park R.-D., Muzzarelli R.A.A. Chitin Deacetylases: properties and applications. Review // Mur. Drugs. 2010. V. 8. P. 24-46.

СОРБЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ХИТОЗАН-ГЛЮКАНОВЫМ  
КОМПЛЕКСОМ ИЗ *ASPERGILLUS NIGER*

Буткевич Т.В., Сушинская Н.В., Курченко В.П.

Белорусский государственный университет, г. Минск, kurchenko@tut.by

*Предложена технология переработки мицелиальных отходов *Aspergillus niger*, получаемых при производстве лимонной кислоты. Исследованы сорбционные свойства выделенных хитина и хитозан-глюканового комплекса по отношению к тяжелым металлам: Cd, Co, Mn, Pb. Показана высокая эффективность использования полученных органических сорбентов.*

**Введение.** Техногенные нагрузки на окружающую среду привели к ее значительному загрязнению тяжелыми металлами, радионуклидами, нефтепродуктами и другими вредными для живой природы и человека веществами.

Особую опасность представляют тяжелые металлы, так как они не разлагаются и имеют тенденцию к накоплению. Они включаются в биологический круговорот веществ на длительные периоды времени. Природоохранные мероприятия не могут в полной мере защитить от губительного загрязнения тяжелыми металлами. Для их удаления необходимы активные действия на путях попадания их в организм человека. Особую опасность представляют такие металлы, как ртуть и кадмий, поскольку из биологических объектов они практически не выводятся. Не менее опасны и другие металлы: медь, никель, хром и цинк. Извлечение малых количеств этих металлов, концентрирование и дальнейшее безопасное хранение является сложной технологической задачей. Для ее реализации возможно использование сорбционных методов с использованием минеральных, синтетических и органических сорбентов [1].

Органические сорбенты обеспечивают эффективное компактирование металлов. Среди этих сорбентов особое место занимают природные полимеры, хитин и его производное - хитозан. Этот биополимер входит в состав экзоскелета членистоногих, клеточной стенки грибов, водорослей и др. Хитин представляет собой линейный полисахарид, состоящий из N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-Д-глюкопиранозы, связанной 1-4- гликозидными связями [2, 3].

Хитин нерастворим в воде, щелочах, разбавленных кислотах, спиртах, других органических растворителях, и растворим в концентрированных соляной, серной и муравьиной кислотах, а также в некоторых солевых

растворах при нагревании. Он способен образовывать комплексы с органическими веществами: холестерином, белками, пептидами, а также обладает высокой сорбционной способностью к тяжелым металлам, радионуклидам [2, 3].

Хитозан – деацетилированное производное хитина, представляющее собой полимер, состоящий из  $\beta$ -D-глюкозаминовых звеньев. В основе получения хитозана лежит реакция отщепления от структурной единицы хитина – ацетильной группировки. В настоящее время отсутствуют общепринятые критерии для различения хитозана и хитина в зависимости от содержания N-ацетильных групп. Для удобства эта условная граница может быть проведена по степени ацетилирования, которая у хитина составляет более 50%, а у хитозана менее 50%. В отличие от практически нерастворимого хитина, хитозан растворим в разбавленных неорганических кислотах и органических: муравьиной, уксусной, янтарной, молочной, яблочной, но нерастворим в лимонной и винной кислотах. Хитозан обладает разнообразной биологической активностью. За счет высокого положительного заряда он имеет большое сродство к сорбции молекул белков, пестицидов, красителей, липидов, хелатированию ионов металлов ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{VO}_2^{2+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$ ) и радионуклидов [2, 3].

Доступным источником получения хитина и хитозана являются грибы. Клеточная стенка почти всех грибов содержит хитин. Содержание хитина различно у грибов разных таксонов и подвержено значительным колебаниям в зависимости от условий культивирования и систематического положения организма, составляют 0,2% до 26% от сухой массы [2].

Высокие сорбционные свойства хитина и хитозана в наибольшей степени проявляются у грибов [4]. Особый интерес вызывают хелатирующие свойства хитозана из низших грибов. Существующие технологии позволяют получить хитозан из промышленных отходов микробиологической промышленности. При производстве лимонной кислоты используется *Aspergillus niger*, мицелиальные отходы которого достигают сотни тонн в год.

В связи с этим актуальным является разработка ресурсосберегающей технологии получения хитина и хитозана из мицелиальных отходов *Aspergillus niger* и их использование для сорбции тяжелых металлов.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования являлись хитин и хитозан полученные из мицелиальных отходов производства лимонной кислоты ОАО «Скидельский сахарный комбинат».

Технологическая схема комплексной переработки мицелия включает 3 стадии [5]. Из мицелия удалялись меланиновые пигменты путем их водной экстракции при температуре 80 °С в течение 1 ч. Фильтрацией меланиновая фракция отделяется и высушивается, а осадок идет на переработку для получения хитина и хитозана.

Хитин получали в результате депротонирования твердого осадка мицелия 10%-ным раствором NaOH при температуре 45–55 °С в течение 2 ч, и отделением его фильтрацией с последующей промывкой дистиллированной водой до рН промывных вод 7,0.

Высокомолекулярный хитин деацетилировали 50%-ным раствором NaOH при температуре 125–130 °С в течение 1–1,5 ч. По окончании процесса суспензию охлаждали до 50 °С и фильтровали для получения твердого остатка, который промывался до нейтральных рН промывных вод. Полученный продукт – высокомолекулярный хитозан-глюкановый комплекс, высушивали лиофильно.

Сорбцию тяжелых металлов Pb, Mn, Cd, Co хитином и хитозан-глюкановым комплексом исследовали с использованием рН-метрии. К 15мл бидистиллированной воды добавляли 15 мг хитина и при перемешивании вносили растворы солей порциями по 20мкл. Измеряли рН после стабилизации показаний прибора. Также проводили контрольный опыт, повторяя опыт без добавления хитина.

#### Результаты и обсуждение

Ранее показано, что выделить чистый хитозан из грибов обычными методами химической обработки не удастся, а в качестве продукта получается хитозан-глюкановый комплекс. Установлено, что хитозан-глюкановый комплекс, получаемый из низших грибов, может успешно использоваться для извлечения ионов переходных металлов из водных растворов. Однако на эффективность сорбции существенно влияет способ их получения [6]. Более высокие сорбционные характеристики хитозан-глюканового комплекса наблюдались у образцов из *A. niger*, полученных наиболее жесткой обработкой исходного сырья (40%-ный раствор щелочи при температуре кипения). В связи с этим для получения хитозан-глюканового комплекса из мицелия *A. niger* использовались жесткие условия деацетилирования хитина. При переработке мицелиальных отходов *Aspergillus niger* полученных от ОАО «Скидельский сахарный комбинат» был выделен хитин и хитозан-глюкановый комплекс (таблица 1).

Таблица 1 – Выход хитина и хитозан-глюканового комплекса из мицелия *Aspergillus niger*

| № п/п | Продукт        | Вес сырого/сухого вещества, г | Сырой продукт | Сухой вес | Выход, в % от сухого сырья |
|-------|----------------|-------------------------------|---------------|-----------|----------------------------|
| 1     | Исходное сырье | 22,0/3,44                     |               | 3,44      | 15,6                       |
| 2     | Хитин          | 155,0/24,2                    | 220,0         | 6,44      | 26,6                       |
| 3     | Хитозан        | 155,0/24,2                    | 220,0         | 5,22      | 21,5                       |

Механизм сорбции тяжелых металлов полученным хитином и хитозан-глюкановым комплексом определяются природой и валентным состоянием сорбируемого металла, а также химическим составом и рН среды. Сорбционные свойства хитина и его производных детально обобщены

Л.Ф. Горовой и В.Н. Косяковым [1]. Ими предложен подход систематизации имеющихся экспериментальных данных в порядке расположения этих металлов в Периодической Таблице Менделеева. Этот подход использовался при анализе сорбционных свойств полученного нами хитина и хитозан-глюканового комплекса из *A. niger*. Проведено сравнительное исследование эффективности сорбции металлов из IIb группы - Cd, IVa группы - Pb, VIIb группы - Mn, VIIIb группы - Co полученными сорбентами. В таблице 2 представлены результаты сорбции тяжелых металлов в расчете количество сорбированного металла(мг) на мг сорбента.

Таблица 2 – Результаты сорбции тяжелых металлов

| Сорбент, мг                 | IIb - Cd, мг | IVa - Pb, мг | VIIb - Mn, мг | VIIIb - Co, мг |
|-----------------------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| Хитин                       | 0,730        | 0,101        | 0,392         | 0,398          |
| Хитозан-глюкановый комплекс | 0,973        | 0,455        | 0,817         | 0,930          |

*Металлы второй группы.* Исследование сорбции основных представителей второй группы Периодической Таблицы, щелочноземельных элементов: Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra, показало, что они как и щелочные металлы, на хитине и хитозане сорбируются очень плохо, или не сорбируются вообще [7].

Вторая подгруппа: цинк, кадмий, ртуть, состоит из представителей переходных металлов - носителей d-электронов [4]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что хитин и хитозан-глюкановый комплекс эффективно связывает кадмий (Таблица 2). Хитин и хитозан-глюкановый комплекс гораздо лучше сорбируют ионы переходных металлов, обладающие d-электронами. При этом эффективность сорбции увеличивается в ряду: цинк-кадмий-ртуть [8], что полностью коррелирует с увеличением ионного радиуса сорбируемого металла.

*Металлы четвертой группы.* Из металлов основной подгруппы s,p-элементов: Ge, Sn, Pb достаточно хорошо изучена сорбция свинца, представляющего наибольшую опасность для окружающей среды и здоровья человека. Связывание свинца в сорбционных системах, использующих хитин или его производные, неоднозначно и в значительной степени зависит от типа модификации и химического состава растворов. В результате проведенных исследований нами показано что, хитин малоэффективно связывает свинец в то время как сорбционная емкость хитозан-глюканового комплекса в 4,5 раза выше (таблица 2). Ранее проведенные исследования свидетельствуют, что при сорбции чистыми хитином и хитозаном свинец извлекается довольно умеренно [7], располагаясь в конце ряда Cu, Zn, Сг, Cd, Pb, что связано с увеличением ионного радиуса металла.

*Элементы седьмой группы.* Элементы основной подгруппы - галогены - имеют большое разнообразие валентных состояний, но чаще

всего входят в состав анионов и принимают косвенное участие в процессах сорбции ионов металлов.

Из подгруппы d-элементов седьмой группы исследована сорбция практически только одного марганца, который на хитине и хитозане сорбируется относительно плохо, даже в хлоридной и сульфатной среде [7]. Обменная емкость хитозана по отношению к марганцу составляет всего лишь 0,2 ммоль/г [9]. Сорбционные свойства полученного нами хитина ионов ацетата марганца также показали его низкую обменную емкость. В результате дезацетилирования полученный хитозан-глюкановый комплекс в 2,1 раза эффективнее связывал марганец в двухвалентном состоянии, чем хитин (таблица 2).

*Восьмая группа.* Сорбируемости элементов восьмой группы хитином и хитозаном лучше всего изучены на триаде железо-кобальт-никель. Несмотря на значительное сходство химических свойств этих элементов, эффективность их сорбции на хитозане заметно отличается: хуже всего сорбируется двухвалентное железо и лучше всего - никель [7]. В таком же порядке увеличиваются и емкостные характеристики хитозана по отношению к этим элементам. Эффективность сорбции ионов Со полученным хитином сравнительно невелика в то время как обменная емкость хитозан-глюканового комплекса выше в 2,3 раза (таблица 2).

Закономерности сорбции элементов этой группы можно проследить на триаде ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) и последних элементах триад ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pd}^{2+}$ ,  $\text{Pt}^{4+}$ ). В первом случае увеличение числа d-элементов приводит к увеличению сорбируемости, несмотря на то, что ионный радиус при этом несколько уменьшается. Во втором - увеличение порядкового номера элемента сопровождается увеличением сорбируемости, хотя строго говоря, сравнивать можно только ионы никеля и палладия, имеющие одинаковый заряд, а здесь переход сопровождается увеличением ионного радиуса [1].

**Заключение.** Хитозан-глюкановый комплекс, выделенный из грибного мицелия, обладает более высокой сорбционной способностью, чем хитин, выделенный из клеточной стенки грибов. Об этом свидетельствует высокая сорбционная способность хитозана по отношению к ионам тяжелых металлов Cd, Co, Mn, Pb. Поскольку в составе хитина и его производных имеется несколько функциональных групп, механизм сорбции тяжелых металлов имеет сложный характер. В сорбционном процессе принимают участие, в основном, ацетиламидные и аминокгруппы, а также связеобразующие атомы кислорода. Имеющиеся данные по сорбции ионов различных металлов позволяют выявить некоторые закономерности. Так главной особенностью хитина и хитозана является проявление их сорбционной способности начиная с переходных металлов, обладающих d-электронами. Общим для элементов каждой из групп Периодической Системы являются: повышенная сорбируемость представителей d-элементов по сравнению с sp-элементами. Возрастание

сорбируемости, связано с увеличением порядкового номера элемента, что в свою очередь коррелирует с увеличением ионного радиуса. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования хитозан-глюканового комплекса выделенного из мицелия *A. niger* для переработки промышленных отходов с целью удаления опасных примесей и регенерации ценных металлов.

#### **Список литературы:**

1. Горовой, Л.Ф. Сорбционные свойства хитина и его производных. "Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение"/ Л.Ф Горовой, В.Н. Косяков; под.ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М: Наука, 2002. – С. 217–246.
2. Хитозан / под.ред. К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. – М.: Центр "Биоинженерия" РАН, 2013. – 593 с.
3. Курченко В.П. Технологические основы получения хитина и хитозана из насекомых/ В.П. Курченко, С.В. Буга, Н.В. Петрашкевич, Т.В. Буткевич, А.А. Ветошкин, Е.Л. Демченков, А.Д. Лодыгин, О.Ю. Зуева, В.П. Варламов, О.И. Бородин // Труды БГУ. – 2016. – Т. 11, ч. 1. – С. 110 – 126.
4. Seeger R. // Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 1977. – V. 73, N 5. – P. 160–162.
5. Курченко В.П. Физико-химические свойства биологически активных соединений из подмора пчел (*Apis mellifera* L.) / В.П. Курченко, Т.В. Буткевич, Н.В. Пушкина, О.Ю. Зуева, В.П. Варламов, В.М. Завальнюк, О.И. Бородин, С.В. Буга// Природные ресурсы – 2016. –№ 2 – С. 1–6.
6. Muzzarelli R.A.A., Tanfani F., Scarpini G., et al. // J. Appl. Biochem. – 1980. – V. 2. N 1. – P. 54–59.
7. Muzzarelli, R.A.A. Chitin. – Oxford: Pergamon Press, 1977. – 305 p.
8. Masri M.S., Reuter F.W., Friedman M. // J. Appl. Polym. Sci. – 1974. – V. 18. – P. 675–681.
9. Koshijima Tetsuo, Tanaka Ryutaro, Muraki Einosuke et al. // Gellulose Chem. Technol. – 1973. – V. 7. – P. 197–208.

#### **ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ РЕЦЕНТНЫХ ВИДОВ ТЛЕЙ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ**

Воробьева М.М., Воронова Н.В., Буга С.В.

Белорусский государственный университет, г. Минск

masch.89@mail.ru

*В результате выполненных исследований были расшифрованы и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности гена субъединицы 1 цитохромоксидазы с (COI) и гена субъединицы  $\alpha$  фактора элонгации 1 (EF1 $\alpha$ ) 15 видов тлей фауны Беларуси.*

**Введение.** Тли (Sternorrhyncha: Aphidoidea) – таксон гемиптероидных насекомых (Insecta: Hemipteroidea), объединяющий в своем составе около 5000 рецентных видов, имеющих как локальное, так и субкосмополитное распространение [1]. Поскольку многие виды тлей принадлежат к числу вредителей и переносчиков вирусов сельскохозяйственных и иных культур, необходимо осуществлять постоянный мониторинг их состава и численности в культурфитоценозах.

К настоящему времени корректная видовая диагностика является одним из важнейших аспектов контроля численности и распространения насекомых-вредителей. Безусловно, определение по морфологическим ключам было и остается основным методом идентификации большинства видов насекомых, однако, в связи с наличием у тлей большого числа морфологически сходных видов и форм, применимость классических методов морфологической диагностики внутри этого таксона во многих случаях ограничена. В этой связи возникает необходимость в поиске новых методов и подходов, позволяющих решать такого рода задачи.

На сегодняшний день наиболее точным методом, позволяющим проводить корректную диагностику труднодифференцируемых видов и подвидов насекомых и, в частности, тлей, признана ДНК-идентификация. Наиболее известным и широко применяемым среди методов ДНК-идентификации видов является ДНК-штрихкодирование (ДНК-баркодирование), концепция которого основывается на том, что каждый биологический вид может быть идентифицирован на основе коротких стандартизированных фрагментов ДНК [2]. В результате длительных и многочисленных исследований у тлей, как и у всех животных, в качестве ДНК-штрихкода было принято использовать последовательность гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI) [3, 4].

К настоящему времени в научные исследования в области ДНК-штрихкодирования вовлечено более сотни научных центров из многих стран мира. Как известно, разработчиком концепции и крупнейшим мировым лидером в области ДНК-штрихкодирования живых организмов выступает Институт биоразнообразия в Онтарио (Канада). Международный консорциум по ДНК-штрихкодированию жизни, который был организован в 2007 г., к настоящему времени включает крупные научные центры из 28 стран [5]. На базе Института биоразнообразия в Онтарио была создана и постоянно пополняется Глобальная база данных ДНК-штрихкодов живых организмов (BOLD), содержащая нуклеотидные последовательности для более чем 250000 видов живых организмов из всех регионов мира. По последним данным в BOLD представлено 39824 расшифрованных нуклеотидных последовательностей для 1264 видов тлей, коллектированных в 54 странах, что составляет, к сожалению, только 24,3 % от общего количества описанных видов [6].

Поскольку ДНК-идентификация, основанная на ДНК-штрихкодировании, как это было сказано выше, представляет собой наиболее эффективный способ проведения исследований, связанных с установлением таксономической принадлежности, очевидна необходимость получения ДНК-штрихкодов для тлей, характеризующихся высокой степенью вредоносности и до сих пор не представленных в Международных генетических базах данных (BOLD, GenBank и др.). В этой связи в рамках настоящего исследования нами были расшифрованы и депонированы в GenBank нуклеотидные последовательности гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *c* (COI) и гена субъединицы  $\alpha$  фактора элонгации 1 (EF1 $\alpha$ ) 15 видов тлей фауны Беларуси из числа вредителей сельскохозяйственных, лесных и декоративных культур, дополняющих ранее выполненные нами работы по ДНК-штрихкодированию животных организмов фауны Беларуси.

#### Методы исследования

Сбор энтомологического материала был выполнен на территории регионов Беларуси. Таксономическое положение охваченных исследованиями видов в соответствии с системой G. Remaudiere и M. Remaudiere [7] (для унификации с данными GenBank), представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Таксономическое положение охваченных исследованиями видов тлей фауны Беларуси в соответствии с системой G. Remaudiere и M. Remaudiere [7]

|                 |                |   |
|-----------------|----------------|---|
| Aphidinae       | Macrosiphini   | <i>Trichosiphonaphis corticis</i> (Aizenberg, 1935) |
| Aphidinae       | Aphidini       | <i>Aphis euphorbiae</i> Kaltenbach, 1843            |
| Aphidinae       | Aphidini       | <i>Hyalopterus pruni</i> (Geoffroy, 1762)           |
| Aphidinae       | Aphidini       | <i>Longicaudus thirhodus</i> (Walker, 1849)         |
| Aphidinae       | Macrosiphini   | <i>Uroleucon hypochoeridis</i> (Fabricius, 1779)    |
| Phyllaphidinae  | Phyllaphidini  | <i>Therioaphis tenera</i> Aizenberg, 1956           |
| Calaphidinae    | Calaphidini    | <i>Monaphis antennata</i> (Kaltenbach, 1843)        |
| Calaphidinae    | Panaphidini    | <i>Panaphis juglandis</i> (Goeze, 1778)             |
| Chaitophorinae  | Siphini        | <i>Sipha maydis</i> Passerini, 1860                 |
| Chaitophorinae  | Chaitophorini  | <i>Periphyllus aceris</i> (Linnaeus, 1761)          |
| Drepanosiphinae | Drepanosiphini | <i>Drepanosiphum platanoidis</i> (Schrank, 1801)    |
| Cinarinae       | Schizolachnini | <i>Schizolachmus pineti</i> (Fabricius, 1781)       |
| Eriosomatinae   | Eriosomatini   | <i>Colopha compressa</i> (Koch, 1856)               |
| Thelaxinae      | Thelaxini      | <i>Glyphina jacutensis</i> Mordvilko, 1931          |
| Anoeciinae      | Anoeciini      | <i>Anoecia corni</i> (Hartig, 1841)                 |

ДНК выделяли из единичных особей с использованием коммерческого набора DNA Purification Kit (Thermo scientific), внося необходимые изменения в протокол производителя. Для получения целевых фрагментов COI и EF1 $\alpha$  использовали праймеры, представленные в таблице 2.

Реакционная смесь для ПЦР содержала в 25 мкл: 3 мМ dNTP, 1 мМ каждого праймера, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1×Taq Buffer, 1U Taq-полимеразы, 0,5 мкг ДНК-матрицы.

Таблица 2 – Праймеры, использованные для получения целевых фрагментов ДНК тлей

| Ген          | Праймер            | Последовательность, 5'-3'                               | T <sub>a</sub><br>°C | Размер получаемого фрагмента, п.н. |
|--------------|--------------------|---|----------------------|------------------------------------|
| COI          | HCO2198<br>LCO1490 | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA<br>GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG | 50                   | 708                                |
| EF1 $\alpha$ | EF2<br>EF3         | ATGTGAGCAGTGTGGCAATCCAA<br>GAACGTGAACGTGGTATCAC         | 54                   | 1100                               |

Примечание: T<sub>a</sub> – температура отжига праймера

ПЦР проводили с использованием амплификатора Agilent Technologies Sure Cycler 8800 в режимах: 94 °C – 3 мин; 35 циклов по 94 °C – 20 с, отжиг праймера – 40 с, 72 °C – 1 мин 30 с; 72 °C – 5 мин (при работе с праймерами LCO/HCO) и 94 °C – 3 мин; 35 циклов по 94 °C – 20 с, отжиг праймера – 30 с, 72 °C – 90 с; 75 °C – 5 мин (при работе с праймерами EF3/EF2).

Электрофорез фрагментов COI и EF1 $\alpha$  проводили в 1,5 % агарозном геле в TAE-буфере и окрашивали 10000×ZUBRGreen-1 (Праймтех, Беларусь). Для оценки длин полученных фрагментов использовали маркер молекулярного веса MP1bp DNALadder (Thermo Scientific, Литва). Секвенирование ПЦР-продуктов выполнено компанией Macrogen (Нидерланды) с использованием праймеров LCO и EF3.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей провели по референсным генам модельного вида *Acyrtosiphon pisum* (Harris 1776) в программе MEGA8 с использованием алгоритма MUSCLE. Для визуализации последовательностей использовали программу BioEdit. Филогенетические деревья построены в системе BOLD с использованием приложения Identification. При этом помимо собственных сиквенсов использовали нуклеотидные последовательности, представленные в Международных генетических базах данных (информация об использованных последовательностях приведена на соответствующих рисунках).

### Результаты и обсуждение

В Международных базах нуклеотидных последовательностей к настоящему времени содержатся записи, касающиеся 12 из 15 видов тлей, охваченных настоящим исследованием. В частности, наиболее хорошо представлены последовательности гена COI (таблица 3). Нуклеотидные последовательности остальных трех видов тлей, а именно *T. corticis* C. *compressa* и *G. jacutensis*, в генетических базах данных отсутствовали.

Таблица 3 – Представленность в Международных генетических базах данных нуклеотидных последовательностей генов COI и EF1 $\alpha$  тлей, вовлеченных в настоящее исследование

| Вид тлей                | Маркер       | Количество сиквенсов в базах данных | Страна происхождения  |
|-------------------------|--------------|-------------------------------------|---|
| <i>T. corticis</i>      | COI          | –                                   | –   |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>A. euphorbiae</i>    | COI          | 1                                   | Франция   |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>H. pruni</i>         | COI          | 61                                  | Канада, Германия, Франция, США, Болгария, Китай, Индия, Пакистан, Греция, Великобритания, Южная Корея и Дания |
|                         | EF1 $\alpha$ | 2                                   | США, Корея  |
| <i>L. thirhodus</i>     | COI          | 8                                   | Канада, Беларусь  |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>U. hypochoeridis</i> | COI          | 17                                  | Франция, Греция и Италия  |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>A. corni</i>         | COI          | 3                                   | Нидерланды  |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>M. antennata</i>     | COI          | 2                                   | Канада  |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>S. maydis</i>        | COI          | 27                                  | США, Франция, Бразилия, Болгария  |
|                         | EF1 $\alpha$ | 1                                   | Польша  |
| <i>P. juglandis</i>     | COI          | 5                                   | Франция, Греция, США и Италия   |
|                         | EF1 $\alpha$ | 1                                   | Испания   |
| <i>P. aceris</i>        | COI          | 2                                   | Беларусь  |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>D. platanoidis</i>   | COI          | 213                                 | Канада, Новая Зеландия, Беларусь, Норвегия и США  |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>C. compressa</i>     | COI          | –                                   | –   |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>S. pineti</i>        | COI          | 56                                  | Канада, Норвегия, США, Гондурас   |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>T. tenera</i>        | COI          | 29                                  | Беларусь и Канада   |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |
| <i>G. jacutensis</i>    | COI          | –                                   | –   |
|                         | EF1 $\alpha$ | –                                   | –   |

Примечание: при отсутствии сиквенсов в Международных генетических базах данных в столбце ставили прочерк

В общей сложности нами было расшифровано 18 нуклеотидных последовательностей для 15 видов тлей. Для *C. compressa* ДНК-штрихкод был получен впервые в рамках настоящего исследования. Кроме того,

впервые были расшифрованы нуклеотидные последовательности гена EF1 $\alpha$  для 12 видов тлей (*T. corticis*, *A. euphorbiae*, *L. thirrhodus*, *U. hypochoeridis*, *A. corni*, *M. antennata*, *P. aceris*, *D. platanoidis*, *C. compressa*, *S. pineti*, *T. tenera* и *G. jacutensis*) фауны Беларуси.

При сравнительном анализе полученных нами нуклеотидных последовательностей гена EF1 $\alpha$  с последовательностями, представленными в Международных генетических базах данных другими исследователями, оказалось, что у тлей *H. pruni*, коллектированных в Беларуси и Корее [EU358930.1], отмечены замены в пяти сайтах (301A $\leftrightarrow$ C, 304A $\leftrightarrow$ T, 414G $\leftrightarrow$ A, 681C $\leftrightarrow$ T, 1040T $\leftrightarrow$ C при определении позиции замены по полноразмерному гену), в то время как у тлей из Беларуси и США [DQ005160], а также из Кореи [EU358930.1], – в трех сайтах (414G $\leftrightarrow$ A, 681C $\leftrightarrow$ T, 1040T $\leftrightarrow$ C) (рисунок 1). В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена EF1 $\alpha$  тлей *S. maydis*, коллектированных в Европе и Беларуси, нуклеотидных замен отмечено не было.



Рисунок 1 – Содержащий нуклеотидные замены участок последовательности EF1 $\alpha$  тлей *Hyalopterus pruni*, коллектированных в Корее, США и Беларуси

В рамках данной работы мы провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена COI образцов тлей *U. hypochoeridis*, коллектированных в географически удаленных регионах, – в частности было использовано 38 последовательностей из BOLD и 1 собственная последовательность, полученная для тлей данного вида. Для оценки сходства нуклеотидных последовательностей гена COI *U. hypochoeridis*, коллектированных на географически отдаленных территориях, построили дендрограмму (рисунок 2).

Всего у *U. hypochoeridis* было выявлено четыре гаплотипа COI. Эти гаплотипы не имели приуроченности к конкретной части ареала вида. У образцов тлей данного вида, коллектированных на территории Беларуси, был отмечен тот же гаплотип, что и у тлей из Италии и Франция, образовавших на филогенетическом дереве общий кластер (H3).

Аналогичным образом мы сравнили нуклеотидные последовательности гена COI тлей *P. juglandis* из географически удаленных регионов. Всего использовали 12 нуклеотидных последовательностей COI данного вида тлей (11 последовательностей из генетических баз данных, 1 – собственная).

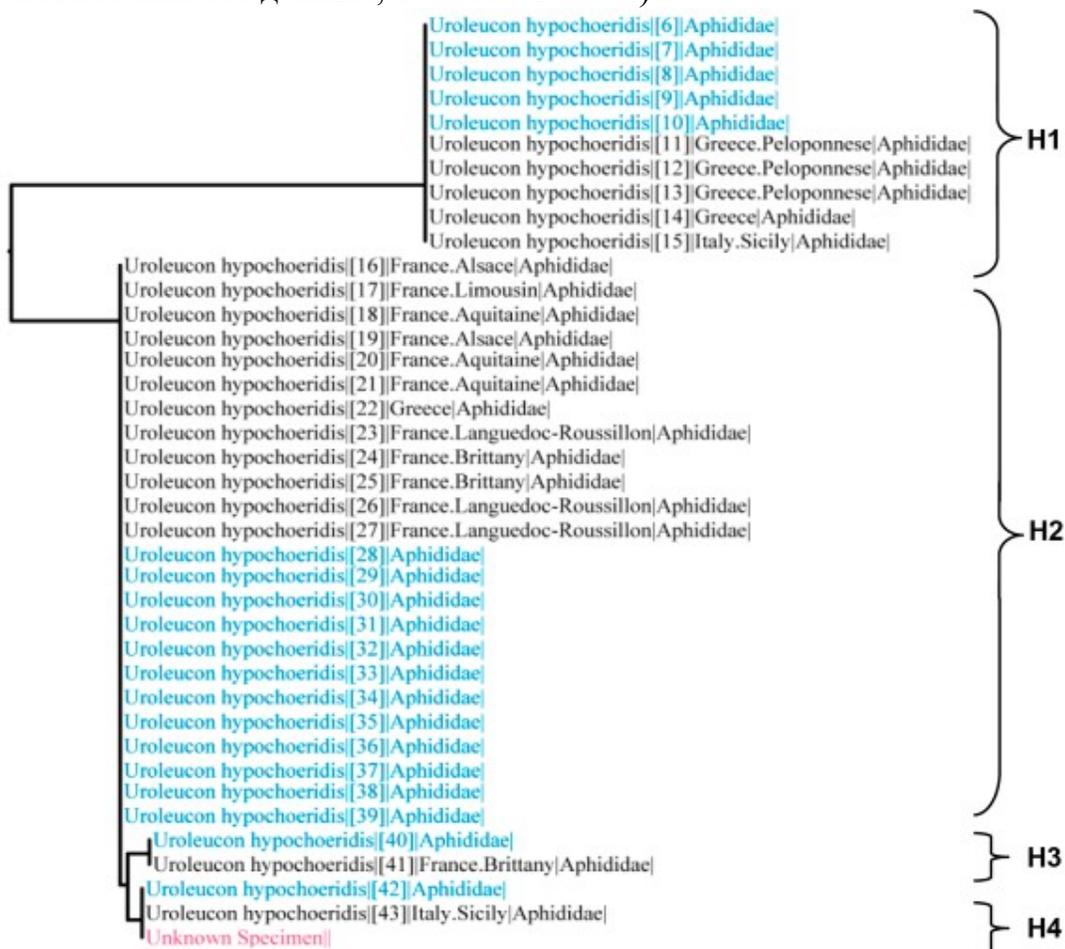


Рисунок 2 – Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей COI тлей *Uroleucon hypochoeridis*, коллектированных на разных территориях

Для визуализации сходства нуклеотидных последовательностей гена COI *P. juglandis*, коллектированных на географически отдаленных территориях, построили дендрограмму (рисунок 3).

У тлей *P. juglandis* было выявлено три гаплотипа COI, причем у «белорусских» образцов был выявлен уникальный гаплотип (H3). Также как и у *U. hypochoeridis*, у тлей *P. juglandis* географической приуроченности конкретных гаплотипов не наблюдалось.



Рисунок 3 – Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей COI тлей *Panaphis juglandis*, коллектированных на разных территориях

### Выводы

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что наполняемость Международных баз данных нуклеотидных последовательностей тлей недостаточна и требует доработки. В этой связи в рамках настоящего исследования нами впервые был получен ДНК-штрихкод для тлей *S. compressa*, а также расшифрованы нуклеотидные последовательности EF1 $\alpha$  12 видов тлей фауны Беларуси, которые в настоящее время депонированы в GenBank и находятся в открытом доступе.

*Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты Б17МС-025, Б17-081).*

### Список литературы:

1. Aphids on the World's Plants: An online identification and information guide [Electronic resource] / Ed. R. Blackman. – London : Natural History Museum, 2012. – Mode of access: <http://www.aphidsonworldsplants.info>. – Date of access: 25.08.2017.
2. Biological identifications through DNA barcodes / P.D.N. Hebert [et al.] // Proc. R. Soc. Lond., B. Biol. Sci. – 2003. – Vol. 270. – P. 313–321.
3. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. – 1994. – Vol. 3, n. 5. – P. 294–299.
4. Voronova, N.V. Subspecies identification in aphids (Homoptera: Aphididae) by application of partial sequence of cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene: a view on the potential of method / N.V. Voronova // American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences. – 2014. – Vol. 6, n. 1. – P. 1–6.
5. Воронова, Н.В. Barcoding of life: Беларусь – участник глобальной инициативы по ДНК-штрихкодированию / Н.В. Воронова [и др.] // Труды БГУ. – 2014. – Т. 9, ч. 1. – С. 167–171.
6. BOLD Systems v4 [Электронный ресурс] / BOLD Systems v4. – Ontario, 2017. – Режим доступа:

[http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser\\_Home](http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser_Home). – Дата доступа: 02.09.2017.

7. Remaudere, G. Catalogue of the world's Aphididae / G. Remaudiere, M. Remaudiere. – Paris: INRA, 1997. – 474 p.

СИНТЕЗ ХИТИНАЗ И ЦЕЛЛЮЛАЗ ГРИБАМИ РОДА *TRICHODERMA* –  
ДЕСТРУКТОРАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ  
РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф., Кузьмина Л.Ю.,  
Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э.

Уфимский Институт биологии РАН, г. Уфа, gleakt@anrb.ru

*Изучена хитинолитическая и целлюлозолитическая активность штаммов рода Trichoderma, выделенных из различных экосистем и характеризующихся способностью к эффективной деструкции труднорастворимых растительных остатков сплавины. При статическом глубинном культивировании индуцибельный синтез внеклеточных хитиназ наблюдался у штаммов T. koningii IB-9 и T. viride IB-33. В присутствии целлюлозы как единственного источника углерода в культуральной среде штаммов Trichoderma spp. IB-14 и IB-16, а также T. harzianum IB-15, наряду с 10-кратным увеличением продукции целлюлаз, отмечалось сопоставимое увеличение активности хитиназ. Способность к сравнительно высокой продукции внеклеточных целлюлаз/хитиназ, вероятно, обуславливает микопаразитические свойства и значительную антагонистическую активность некоторых исследованных штаммов, в частности, T. harzianum IB-15, что может быть использовано в разработке новых полифункциональных препаратов для защиты растений от фитопатогенов и биокомпостирования растительного сырья.*

Грибы рода *Trichoderma* являются одной из наиболее распространенных и изучаемых групп почвенных микромицетов, широко представленных также в экосистемах ризосферы многих растений и в составе гниющих растительных остатков [1, 7]. Являясь сапротрофами, активно развивающимися на субстратах растительного происхождения, многие представители этого рода находят применение в процессах биоконверсии отходов растительного сырья, в том числе для биокомпостирования и получения кормовых добавок для животноводства, в производстве биотоплива [1]. Среди грибов рода *Trichoderma* известны оппортунистические, авирулентные растительные симбионты, а также микопаразиты и антагонисты многих фитопатогенных грибов [7]. Род *Trichoderma/Hypocrea* является наиболее изученной группой грибов, используемых для защиты растений; многие из них применяются в составе коммерческих препаратов, в т.ч. биопестицидов, биоудобрений и

структурообразователей почвы [7]. Механизмы взаимодействия микопаразитических и антагонистических штаммов *Trichoderma* с другими микромицетами хорошо описаны и включают синтез гидролитических ферментов (хитиназ, глюканаз и др.) и антибиотиков [4, 6]. Многие штаммы рода используются как промышленные продуценты целлюлаз и гемицеллюлаз, применяемых в целлюлозно-бумажной индустрии, деревообработке и других отраслях [1, 5]. В работе были исследованы штаммы триходермы, отобранные как эффективные деструкторы для биокомпостирования трудноразлагаемого органического материала растительных остатков сплавины озера Чебаркуль (Республика Башкортостан) с целью получения органоминерального удобрения из местных возобновляемых ресурсов в комплексе мер противозерозионной защиты и повышения плодородия земель [2]. Целью работы являлась оценка хитинолитической и целлюлозолитической активности штаммов *Trichoderma*, как показателя их антагонистического потенциала.

**Объекты и методы исследований.** В качестве объектов исследований использовали штаммы *Trichoderma* spp. IB-14, IB-16, *T. harzianum* IB-15, *T. koningii* IB-9, *T. viride* IB-33 из коллекции Уфимского Института биологии РАН. Три первых штамма были выделены из различных образцов выщелоченного чернозема сельскохозяйственного назначения, *T. koningii* IB-9 – из гниющей древесины, *T. viride* IB-33 – из грунта пещеры Шульган-Таш (Республика Башкортостан). Продукцию целлюлаз и хитиназ грибами оценивали при их стационарном выращивании в жидкой среде с 1% масс. коллоидного хитина или 1% порошковой целлюлозы Sigmacell (“Sigma”) в качестве основного источника углерода. Основа среды включала (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,5;  $\text{NaNO}_3$ , 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5;  $\text{CaCl}_2$ , 0,2; пептон, 3; дрожжевой экстракт, 3; кукурузный экстракт, 1,5; pH 6,0-6,5. Культивирование проводили в течение 12 сут при 28°C. Хитиназную активность определяли по скорости гидролиза 0,5%-ной суспензии коллоидного хитина в фосфатно-цитратном буфере (pH 6) в течение 60 мин при 40°C. Аналогичным способом оценивали целлюлазную активность, используя в качестве субстрата 0,5%-ный раствор Na-КМЦ (“Sigma”). За единицу хитиназной и целлюлазной активности принимали количество фермента, катализирующее освобождение 1 мкМ-экв N-ацетил-D-глюкозамина или D-глюкозы, соответственно, за 1 мин в 1 мл реакционной смеси. Эндо-1,4-β-глюканазную активность грибов оценивали при таких же условиях по снижению кинематической вязкости 0,3%-ного раствора Na-КМЦ в фосфатно-цитратном буфере (50 мМ, pH 6) с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-4 («Экохим»). Расчет активности проводили согласно [3]. Уровень микопаразитизма и антагонистический потенциал штаммов *Trichoderma* оценивали методом «конфронтационного» анализа встречного роста в двойной культуре грибов в чашках Петри [4]. Эксперименты проводили в трехкратной повторности, статистическую обработку

осуществляли с помощью программы ORIGIN SRO 7.0. Достоверными считали различия между сравниваемыми выборками при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Для оценки способности к продукции внеклеточных хитиназ и целлюлаз нами были отобраны штаммы триходерм, демонстрирующие эффективность при биокомпостировании грубого органического материала растительных остатков сплавнины. При глубинном статическом культивировании в жидкой среде с коллоидным хитином более высокую хитинолитическую активность показывали штаммы *T. koningii* IB-9 и *T. viride* IB-33, выделенные из особых экологических ниш (рисунок 1, А). Однако при использовании вместо хитина частично аморфизированной целлюлозы в культуральной среде штаммов IB-14, IB-15 и IB-16 резко повышалась активность хитиназ, тогда как у остальных грибов синтез этих ферментов оставался на следовом уровне (рисунок 1, Б).

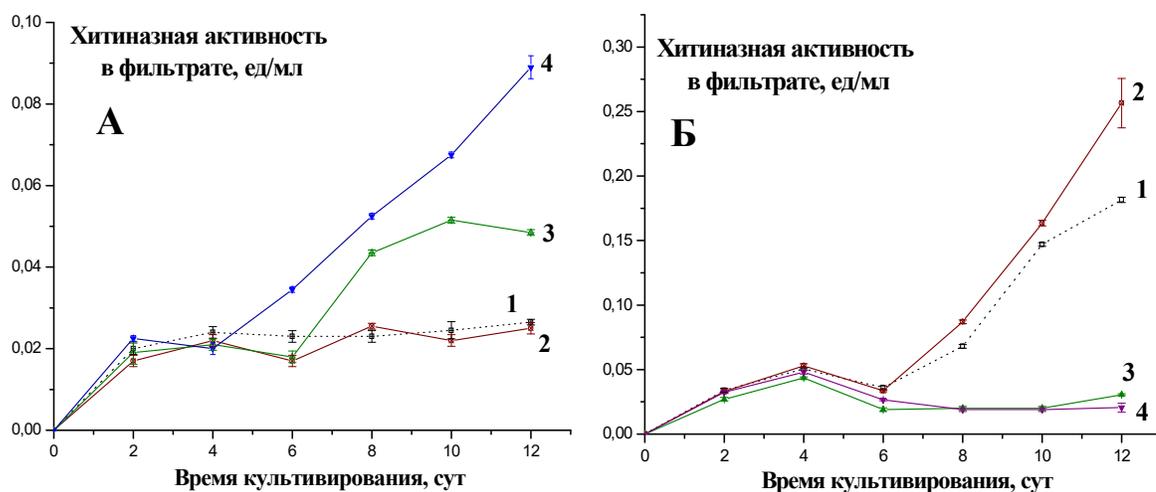


Рисунок 1 – Динамика накопления хитинолитических ферментов при глубинном культивировании штаммов рода *Trichoderma* в среде с коллоидным хитином (А) и целлюлозой (Б). 1 – *Trichoderma* sp. IB-14; 2 – *Trichoderma* sp. IB-16; 3 – *T. viride* IB-33; 4 – *T. koningii* IB-9

Интересно, что высокая хитиназная активность штаммов IB-14, IB-15 и IB-16 в присутствии целлюлозы коррелировала со значительным увеличением их целлюлазной активности (рисунок 2, Б). В то же время, в присутствии хитина синтез целлюлаз у этих грибов практически не наблюдался (рисунок 2, А).

Накопление ферментов в среде заметно возрастало после 6 сут культивирования, достигая максимума к 12-м суткам (рисунки 1, 2). Наибольшей продуктивностью в присутствии целлюлозы характеризовался штамм IB-16 (около 0,25 и 0,65 ед/мл для хитиназ и целлюлаз, соответственно).

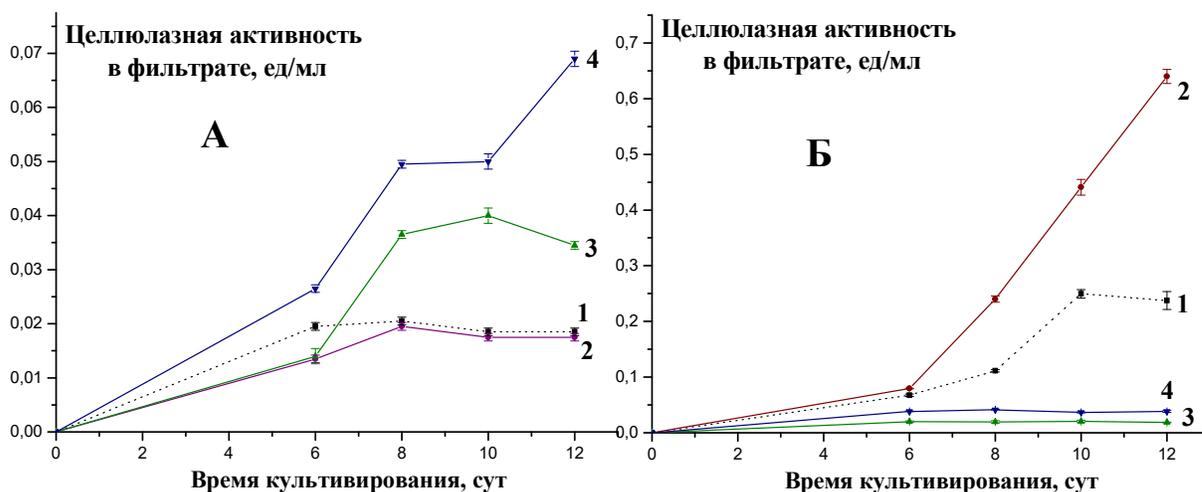


Рисунок 2 – Динамика накопления целлюлаз в культуральной среде штаммов рода *Trichoderma* при их глубинном культивировании в среде с коллоидным хитином (А) и целлюлозой (Б). Обозначения те же, что на рисунке 1

Вискозиметрический анализ эндо-1,4-β-глюканазной активности тех же препаратов показал наибольшую скорость снижения вязкости раствора Na-КМЦ в начальной стадии инкубации (0,040 и 0,125 мкМ/мл·мин<sup>-1</sup> для штаммов ИВ-14 и ИВ-16, соответственно). Полученные результаты свидетельствуют, что повышение хитиназной активности вышеупомянутых штаммов в присутствии целлюлозы может быть обусловлено неспецифической активностью целлюлаз в отношении хитина.

Широко известно, что многие целлюлазы, продуцируемые микромицетами рода *Trichoderma* являются бифункциональными ферментами и способны активно гидролизовать хитин и хитозан [8]. В отличие от штаммов ИВ-14, ИВ-15 и ИВ-16, культуры *T. koningii* ИВ-9 и *T. viride* ИВ-33, по всей видимости, продуцируют настоящие хитиназы, для индукции синтеза которых необходимо присутствие специфического субстрата. Однако, продукция хитиназ этими штаммами была сравнительно невелика даже в среде с коллоидным хитином. Среди исследованных грибов наибольшую антагонистическую активность проявлял штамм *T. harzianum* ИВ-15, подавляющий широкий спектр фитопатогенных грибов (таблица 1). Таблица 1 – Антагонистическая активность штамма *T. harzianum* ИВ-15 к различным видам фитопатогенных микромицетов в двойной культуре

| Тест-культура                | Степень подавления роста, % | Тест-культура             | Степень подавления роста, % |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <i>Alternaria alternata</i>  | 61,8±5,3                    | <i>F. graminearum</i>     | 41,2±4,5                    |
| <i>Bipolaris sorokiniana</i> | 71,4±5,9                    | <i>F. nivale</i>          | 55,9±6,1                    |
| <i>Botrytis cinerea</i>      | 100,0±4,5                   | <i>F. oxysporum</i>       | 49,3±5,2                    |
| <i>Fusarium avenaceum</i>    | 82,4±3,9                    | <i>F. solani</i>          | 55,9±5,3                    |
| <i>F. culmorum</i>           | 70,6±3,2                    | <i>Rhizoctonia solani</i> | 71,4±6,2                    |

У данного штамма, наряду с *T. koningii* ИВ-9 обнаруживались также микопаразитические свойства в отношении некоторых микромицетов

(рисунок 3, А, Б). Таким образом, по оценке совокупности свойств, в т.ч. продукции целлюлаз/хитиназ и антагонистического потенциала, штамм *T. harzianum* IB-15 может быть перспективен для разработки на его основе средств для интенсификации процессов биокомпостирования растительных остатков и защиты сельскохозяйственных растений от болезней, вызываемых фитопатогенными грибами.

Штамм *Trichoderma* sp. IB-16, исходя из его сравнительно более высокой ферментативной активности, помимо биоконверсии трудноразлагаемого растительного сырья, может быть использован в качестве продуцента ферментных препаратов для неспецифической деполимеризации хитина и хитозана.

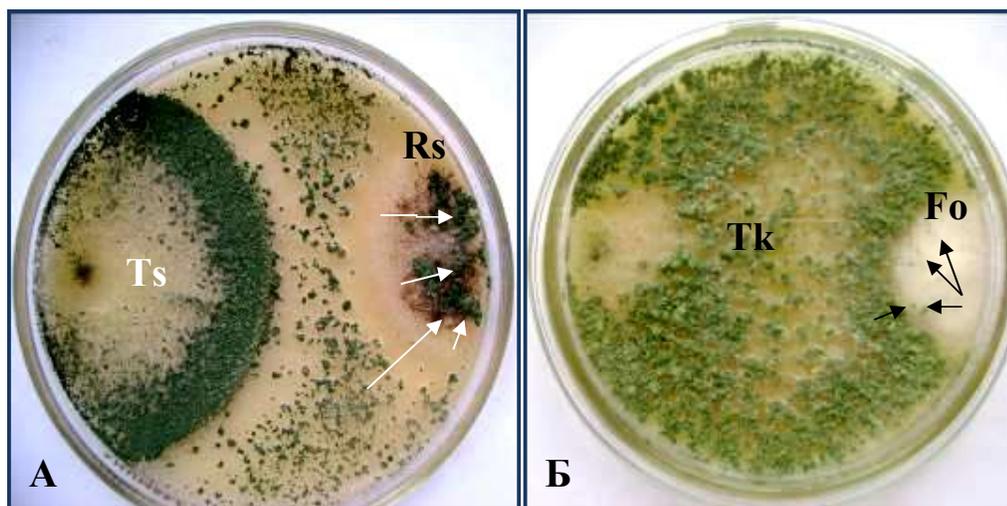


Рисунок 3 – Проявление микопаразитизма *Trichoderma* sp. IB-15 (Ts) к *Rhizoctonia solani* (Rs) (А) и *T. koningii* (Tk) к *Fusarium oxysporum* (Fo) (4) (Б). 10-е сутки совместной инкубации (КГА, 28°С). Стрелками указаны колонии триходерм, развивающиеся на поверхности мицелия грибов-мишеней

#### Список литературы:

1. Алимова, Ф.К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф.К. Алимова. – Казань: Изд-во КГУ, 2006. – 209 с.
2. Габбасова, И.М. Использование удобрения на основе сплавнины для повышения плодородия эродированного чернозема типичного / И.М. Габбасова, Т.Т. Гарипов, Н.Ф. Галимзянова [и др.] // Агрехимия. – 2014. – № 6. – С. 35-42.
3. Сеницын, А.П. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов / А.П. Сеницын, В.М. Черноглазов, А.В. Гусаков. Под ред. С.Д. Варфоломеева. – М.: ВИНТИ, 1993. – 152 с.
4. Atanasova L., Le Crom S., Gruber S., Couplier F., Seidl-Seiboth V., Kubicek C.P., Druzhinina I.S. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism // BMC Genomics. – 2013. – V. 14. – P. 121-135.

5. Bishof R.H., Ramoni J., Seiboth B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei* // Microb. Cell Fact. – 2016. – V. 15. – P. 106-118.
6. Gruber S., Seidl-Seiboth V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma* // Microbiology. – 2012. – V. 158. – P. 26-34.
7. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. *Trichoderma* – plant – pathogen interactions . Review // Soil Biol. Biochem. – 2008. – V. 40. – P. 1-10.
8. Xia W., Ping L., Jing L. Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases. Review // Bioresource Technol. – 2008. – Vol. 99. – P. 6751-6792.

**ДИАТОМОВАЯ ВОДОРОСЛЬ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM*  
 (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК  
 ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И КАРОТИНОИДОВ.**

Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г., Кравченко В.А , Рябушко В.И.,  
 Нехорошев М.В., Бобко Н.И.

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

*Показано, что морская диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* (ehrenb.) Reimann et Lewin — возобновляемый и перспективный источник полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и в частности эйкозапентаеновой кислоты. Концентрация эйкозапентаеновой кислоты в начале стационарной фазы роста в биомассе *C. Closterium* при оптимальных условиях культивирования составляет 23% от всех ПНЖК, а концентрация фукоксантина составила в начале стационарной фазы роста 5 мг·г<sup>-1</sup> сухой массы.*

**Введение.** Микроводоросли являются продуцентами биологически ценных веществ, таких как пигменты, жирные кислоты, витамины и т.д.[1, 2, 3]. На сегодняшний день полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) получают из рыбьего жира, однако микроводоросли могут использоваться как альтернативный быстро возобновляемый источник их получения. Из всех микроводорослей, содержащих ПНЖК, можно выделить диатомовые [5, 6, 7]. Потому, что доля общих липидов в диатомовых водорослях составляет 25-35% в расчете на сухую биомассу, среди которых преобладают полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) [3, 6]. ПНЖК снижают риск развития сердечно – сосудистых заболеваний и атеросклероза, играют исключительно важную роль в формировании нервной системы и зрительного аппарата ребенка в течение первых лет жизни [9].

Одной из самых важных и преобладающих ПНЖК, содержащихся в биомассе данных водорослей, является эйкозапентаеновая кислота (ЭПК), которая нашла свое применение в медицине [4, 8, 9]. Среди всех диатомовых

водорослей особый интерес представляет морская диатомея *Cylindrotheca closterium*, уникальная своим биохимическим составом.

Содержание липидов достигает 20 - 22 % в расчете на сухую биомассу, при этом 40 % от общего содержания липидов составляют ПНЖК [3, 7, 8]. Среди всех жирных кислот *C. closterium* преобладают кислоты С16, при низком содержании кислот С18. Доминирующей полиненасыщенной жирной кислотой является эйкозапентаеновая 20:5 (n-3), которая может достигать 25% от суммы жирных кислот, что значительно больше, чем у других рассматриваемых микроводорослей [1, 7, 8].

Известно, что количество ПНЖК изменяется в процессе роста и развития диатомовых водорослей. Зафиксировано, что у многих диатомовых в конце экспоненциальной фазы роста соотношение полиненасыщенных жирных кислот резко увеличивается и концентрация ЭПК возрастает в два-три раза [8]. Поэтому мы определяем концентрацию ЭПК в начале стационарной фазы роста [8, 9].

**Цель:** количественно определить концентрацию эйкозопентаеновой кислоты и фукоксантина в начале стационарной фазы роста культуры *C. closterium*.

#### **Материалы и методы:**

В работе использовали диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin из коллекции культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИМБИ им. А.О. Ковалевского РАН.

Культуру *C. closterium* выращивали на питательной среде RS при соотношении азот/ фосфор равном 12, в режиме накопительного культивирования в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объемом 3 л, слоем 5 см, при постоянной температуре  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  и круглосуточном освещении 13 клк. В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (0,5 л воздуха на 1 л культуры) .

Концентрацию ПНЖК определяли в начале стационарной фазы роста (на третьи сутки стационарной фазы), так как известно, что в конце экспоненциальной фазы роста большинство ПНЖК достигают своих максимальных значений. Их количество более чем в два раза превышают концентрацию насыщенных жирных кислот.

Для определения жирных кислот выделяли липидную фракцию из биомассы микроводоросли *C. closterium* с помощью смеси Фолча. Хлороформную липидную фракцию упаривали и добавляли 5 мл. метанольного раствора NaOH, смесь кипятили в течении двух часов и добавляли несколько капель фенолфталеина. Затем проводили экстракцию гексаном (3 раза), собирали водно-спиртовую фазу, затем ее подкисляли соляной кислотой (добавляли 0,3 мл.) и проводили повторную экстракцию гексаном (3-4 раза). Гексановую фракцию собирали и упаривали на роторе , добавляли 5 мл. метанола насыщенного соляной кислотой .

После добавления этой смеси пробу нагревали в течении двух часов и

заново экстрагировали гексаном 3 раза, гексановую фракцию фильтровали и определяли жирные кислоты на хроматографе.

Спектры жирных кислот снимались на хроматографе «Кристалл 5000» (производство Россия) с пламенно-ионизационным детектором; капиллярная колонка с поли этиленгликолем 100м x 0,25мм x 0,2 мкм. В качестве стандарта использовали Supelco 37 Component FAME Mix, 1 ml, Varied conc.in dichloromethane.

### Результаты

По нашим данным видно, что у диатомовой водоросли *C. closterium* по кислотному составу жиры представляют собой смесь, состоящую из ненасыщенных и насыщенных кислот с C<sub>14</sub> 3%, C<sub>16</sub> 32%, C<sub>18</sub> 20 %, и C<sub>20</sub> 32%.

Основными жирными кислотами диатомовой водоросли *C. closterium* являются: пальмитолеиновая C16:1, пальмитиновая (C16:0) и эйкозапентаеновая (20:5 n-3) и эландиновая (C18:1n9t) кислоты, суммарное содержание которых достигает 70-80% от суммы всех кислот (таблица 1). Основная масса кислот представлена ненасыщенными. Количество эйкозапентаеновой кислоты в биомассе диатомовой водоросли *C. closterium* на третьи сутки после наступления стационарной фазы (в начале стационарной фазы) при данных условиях культивирования составила 23,9%, а концентрация фукоксантина — 5мг/г сухой массы.

Таблица 1 – Состав главных жирных кислот диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (в % от суммы жирных кислот)

| Главные жирные кислоты | <i>Cylindrotheca closterium</i>                                    |                      |                                   |                              |
|------------------------|--|----------------------|-----------------------------------|------------------------------|
|                        | Данные, полученные в институте морских биологических исследований. | Dunstan et al., 1994 | G. P. Serrazanetti et al., 2006г. | Keerthi Suman et al., 2012г. |
| 14:0                   | 2,87±0.9   | 8,2                  | 8,7                               | 9,36                         |
| 16:0                   | 13,72±0.1  | 7,2                  | 20,3                              | 17,76                        |
| 16:1 (n-7)             | 17,95±0.8  | 22,8                 | 21.5                              | 12,52                        |
| 18:0                   | 1,08±0.8   | 0,1                  | 4.8                               | 3,03                         |
| 18:1 (n-9)             | 17,16±1  | 0,1                  | 4,5                               | 1,56                         |
| 18:2 (n-6)             | 2,20±0.1   | 0,5                  | 4,1                               | -                            |
| 20:4 (n-6)             | 8,36±0.1   | 4,0                  | 2,7                               | 3,78                         |
| 20:5 (n-3)             | 23,91±0.5  | 24,2                 | 9,3                               | 23,65                        |
| 22:6 (n-3)             | 1,26±0.1   | 2,4                  | 4,8                               | -                            |

### Выводы

Таким образом, в биомассе *C. closterium* при данных условиях

культивирования содержание ПНЖК примерно составило 60% от общего содержания липидов, содержание липидов достигло 18% от сухой биомассы. При этом, доминирующей полиненасыщенной жирной кислотой является эйкозапентаеновая 20:5 (n-3), которая достигала в начале стационарной фазы роста 23,91% . Концентрация арахидоновой кислоты ( 20:4 (n-6)) - 8,36% от общего количества ПНЖК.

Некоторые различия с литературными данными обусловлено тем, что на концентрацию эйкозапентаеновой кислоты 20:5 (n-3) и ПНЖК в целом влияют световой и температурный режимы, изменение концентрации питательных веществ в среде [5,8].

Следовательно, *C. closterium*, обладая высокой продуктивностью и следовательно высоким выходом биомассы, может служить сырьем для получения ЭПК.

### Список литературы:

1. Alonso D.L., Belarbi E.-H., Fernandes Sevilla J.M., Rodrigues-Ruiz J., Grima E.M. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornerutum* // *Phytochemistry*. - 2000. - V. 54.- P. 461- 471.
2. d'Ippolito G., Sardo A., Paris D., Vella F. M., Adelfi M. G., Botte P., Gallo C., Fontana A. Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production // *Biotechnol. Biofuels*. - 2015. - V. 8. - P. 28.
3. Dunstan G. A., Volkman J. K., Barrett S. M., Leroil J.-M., Jeffrey S. W. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae) // *Phytochemistry*. -1994.- V. 35. - P. 155-161.
4. Igbal G., Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications // *Tibtech October*. - 1997. - V. 15. - P. 401-409.
5. Li H. Y., Lu Y., Zheng J. W., Yang W. D., Liu J.S. Biochemical and genetic engineering of PUFA 156 biosynthesis in diatom // *Mar. Drugs*. - 2014. - V. 12, № 1. - P. 153-166.
6. Meiser A., Schmid-Staiger U., Trösch W. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornerutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor // *J. Appl. Phycol.* - 2004. - V. 16. P. 215–225.
7. Serrazanetti G. P., Folicaldi A., Guerrini F., Monti G., Pistocchi R., Boni L. Microalgal lipid markers for paleoclimatic research // *Clim Res*. - 2006. - V. 31. - P. 145–150.
8. Suman K., Kiran T., Devi U. K., Sarma N. S. Culture medium optimization and lipid profiling of *Cylindrotheca*, a lipid- and polyunsaturated fatty acid-rich pennate diatom and potential source of eicosapentaenoic acid // *Bot. Mar.* - 2012. - V. 55. - P. 289–299.
9. Yi Z., Xu M., Di X., Brynjolfsson S., Fu W. Exploring valuable lipids in diatoms // *Front Mar Sci*. - 2017. - P. 4. - P. 1–10.

# ФУНГИСТАТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКТОВ РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЕЙ ИНВАЗИВНЫХ ВИДОВ РОДА *SOLIDAGO* В ОТНОШЕНИИ НЕКОТОРЫХ ЗНАЧИМЫХ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Иванов О.А., Домаш В.И.

ГНУ «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича  
НАН Беларуси», г. Минск, protlife1984@gmail.com

*Для подземных вегетативных частей и травы осеннего и весеннего периодов заготовки из комплекса инвазивных видов рода *Solidago* определены концентрации экстрактов, при которых наблюдается угнетение развития комплекса фитопатогенных видов сельскохозяйственных культур *Fusariumavenacium*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*. Обнаружены фунгистатические эффекты экстрактов инвазивных видов в отношении *Botrytis cinerea* и *Colletotrichum gloeosporioides*.*

**Введение.** Для объяснения причин и механизмов инвазий чужеродных видов растений в сообщества предложено множество объяснений, среди которых отдельную группу составляют гипотезы, основанные на предположении о повышенной конкурентоспособности инвазивных видов за счет совокупности аллелопатических эффектов на другие виды растительного сообщества и (или) успешного противодействия вредителям и патогенным микроорганизмам, естественным для данного местообитания [1]. Во многих работах продемонстрировано, что соединения различной природы, вырабатываемые инвазивными видами и активно экскретирующиеся в окружающую среду или поступающие в нее пассивно при разложении отмерших частей инвазивных растений, способны подавлять ростовые процессы (например, прорастание семян) аборигенных видов сообщества, но так же, одновременно, частично или полностью угнетать развитие патогенных организмов. В частности, показано, что корневые выделения *Solidago canadensis* L. изменяют видовой состав грибов, формирующих арбускулярную микоризу и замедляют образование микоризы на корнях аборигенных видов [2, 3]. Так же ризодепоненты *S. canadensis* способны активно ингибировать развитие некоторых распространенных фитопатогенных грибов – *Pythium ultimum* и *Rhizoctonia solani* [4].

Как известно, такие представители рода *Solidago* как *S. canadensis* и *S. gigantea*, являются высокоинвазивными видами во многих странах Европы и Азии, и, в частности, одними из ключевых инвазивных видов растений на территории Беларуси. В различных частях растений видов рода *Solidago* широко представлены разнообразные соединения (ди-, три- и сесквитерпены, сапонины, полифенолы), по видимому, играющие существенную роль в обеспечении устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды [4]. Наряду с этими соединениями в растениях различных видов рода в значительных количествах накапливаются ингибиторы протеиназ–

полифункциональная группа белков, выполняющая в растении, помимо прочего, и функцию PR-(pathogenesis-related) белков[5] и тоже, по всей видимости, играющая определенную роль в инвазивном успехе представителей рода.

Сочетание имеющихся литературных данных и широкого распространения *S. canadensis* и *S. gigantea* подводит к мысли о возможности использования растительного сырья этих инвазивных видов в качестве источника биологически активных соединений, обладающих фунгицидными или фунгистатическими эффектами в отношении хозяйственно значимых фитопатогенов.

Было проведено исследование влияния комплексов биологически активных веществ (БАВ), полученных из различных частей инвазивных растений рода *Solidago*, на рост и развитие распространенных фитопатогенных грибов *Fusarium avenacium*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*. Получали водные и водно-спиртовые экстракты, содержащие комплексы БАВ, из корневищ с корнями и травы *S. canadensis* и *S. gigantea* различных сроков вегетации: осеннего и весеннего периодов (до начала активной вегетации), а так же периода после возобновления активной вегетации при достижении высоты побегов 20-25 см. Все растения собирались в окрестностях г. Минска в одних и тех же популяциях для всех исследуемых периодов вегетации. Фунгицидную/фунгистатическую активность экстрактов тестировали в опытах *in vitro*. Фитопатогенные грибы выращивали на агаризованной среде Чапека. В опытных вариантах в среду вводили стерильные экстракты *S. canadensis* или *S. gigantea* различных концентраций (в пересчете на сухое вещество экстракта). Определяли интенсивность подавления роста мицелия тестируемых культур фитопатогенов в присутствии растительных экстрактов по сравнению с контролями путем измерения радиуса мицелиев грибов через 24 ч, 48 ч, 72 ч, а в некоторых случаях и через 96 ч.

Было установлено, что наибольшую биологическую активность проявляли водные экстракты из различных частей *S. canadensis* или *S. gigantea*, полученные при соотношении сырья :экстрагент, равном 1:3. При этом биологическая активность всех типов экстрактов для обоих инвазивных видов была равнонаправленной.

Экстракты из корневищ с корнями *S. canadensis*, собранных до возобновления активной вегетации, в концентрациях 19 мг/мл среды Чапека (СЧ) и 32 мг/мл СЧ практически не влияли на развитие *F. avenacium*. Слабые фунгистатические эффекты исследуемых экстрактов отмечены и в отношении *C. gloeosporioides*. К третьим суткам инкубации рост мицелия *C. gloeosporioides* в присутствии всех исследованных экстрактов угнетался в сравнении с контролем в среднем на 23%. К четвертым суткам инкубации фунгистатические эффекты экстрактов обоих видов *Solidago* проявлялись более выражено. Лучшие значения фунгистатической активности

(угнетение роста мицелия гриба в среднем на 38%) соответствовали экстрактам из *S. gigantea* в сравнении с *S. canadensis*. Различия в эффективности экстрактов с концентрациями 19 мг/мл среды Чапека (СЧ) и 32 мг/мл СЧ практически отсутствовали.

Наибольшая фунгистатическая активность экстрактов *S. gigantea* и *S. canadensis* проявлялась в отношении *B. cinerea*. В данном случае все исследованные экстракты действовали однонаправленно и к четвертым суткам инкубации *B. cinerea* в опытных средах скорость роста его мицелия отставала в среднем на 49 % в сравнении со скоростью роста гриба в контроле.

Поскольку ни в одном из проведенных опытов в серии не было отмечено прекращение роста мицелия модельных фитопатогенных грибов, а отмечалось лишь угнетение их роста различной степени выраженности, можно утверждать, что проанализированные экстракты, а так же компоненты, содержащиеся в этих экстрактах, обладают фунгистатическими, но не фунгицидными эффектами, по крайней мере в отношении модельных фитопатогенов.

Еще в одной, серии опытов были протестированы возможные фунгистатические или фунгицидные эффекты экстрактов из травы *S. canadensis* в отношении тех же фитопатогенов. Тестировали экстракты из травы *S. canadensis*, полученные путем экстрагирования измельченной травы водой в отношении сырья :экстрагент, равном 1:3. В опытные СЧ вносили объемы стерильных экстрактов, соответствующие итоговой концентрации экстрагируемых веществ 5,5 мг/мл.

В опытной концентрации экстракты травы *S. canadensis* практически не угнетали развитие мицелия *F. avenacium*. Более выраженные, фунгистатические эффекты проявлялись в отношении *B. cinerea* и *C. gloeosporioides*. В обоих случаях к третьим суткам инкубации грибов в средах, содержащих экстракты, угнетение роста мицелия составляло 52-64 %. Как и в случае с экстрактами из подземных вегетативных частей, экстракты из травы как минимум одного инвазивного вида в примененных концентрациях не эффективны в отношении *F. avenacium* и обладают умеренной фунгистатической активностью по отношению к *B. cinerea* и *C. gloeosporioides*.

Таким образом, комплекс водорастворимых БАВ, содержащихся в различных частях *S. canadensis* и *S. gigantea*, способен угнетать развитие ряда фитопатогенных грибов. Полученные результаты являются основой для изучения возможностей вовлечения растительного сырья инвазивных видов рода *Solidago* в качестве источников природных фунгицидов/фунгистатиков.

### Список литературы

1. The invasive plant *Solidago canadensis* L. suppresses local soil pathogens through allelopathy / S. Zang [et al] // App. soil ecol. – 2009. – Vol. 41. – P. 215–222.

2. Некоторые биохимические и биологические особенности инвазионных видов *Solidagocanadensis* L. и *S. gigantea* Ait. / Ю.К. Виноградова [и др.] // Бюлл. Гл. бот.сада. – 2014. - № 4. – С. 46-51.

3. Do allelopathic compounds in invasive *Solidagocanadensis* L. restrain the native European flora? / D. Abhilasha [et al] // J. Ecol. – 2008. – Vol. 96. – P. 993 – 1001.

4. Secondary metabolites from the invasive *Solidagocanadensis* L. accumulation in soil and contribution to inhibition of soil pathogen *Pythium ultimum* / S. Zang [et al] // App. soil ecol. – 2011. – Vol. 48. – P. 280–286.

5. Ингибитор трипсина из золотарника канадского (*Solidagocanadensis* L.): активность физико-химических свойства / О.А. Иванов, В.И. Домаш, Е.Л. Гвоздева, Е.В. Иевлева, Т.А. Валуева // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – № 3. – С. 33–37.

## ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ В ПРОЦЕССЕ ЭЛЕКТРОДИАЛИЗА ПЕРМЕАТА МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ

Куликова И.К., Анисимов Г.С., Карасева А.В., Евдокимов И.А.  
Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь,  
kik-st@yandex.ru

*В статье приведены результаты исследований активности фермента β-галактазидазы при проведении процесса гидролиза лактозы совместно с электродиализной обработкой пермеата.*

Пермеат молочного сырья уже нашел довольно широкое применение в пищевой промышленности: в технологии хлебобулочных изделий, мороженого, молочных консервов, в супах и соусах для придания текстуры, в колбасных изделиях в качестве заменителя солей-фиксаторов окраски [4]. Одним из путей [1] улучшения органолептических показателей пермеатов молочного сырья является их обессоливание и ферментативная обработка. Глюкозо-галактозные сиропы повышают питательную ценность продуктов, улучшают технологические свойства. Сиропы рентабельны для внутризаводского использования в качестве альтернативного подслащивающего вещества, например, в сливочном мороженом или йогуртах [2, 3].

Для проведения процессов электродиализа и гидролиза в промышленных условиях обычно используется периодический способ, требующий затрат времени и поддержания температурного режима. Комбинированием процессов можно сократить время цикла и сэкономить энергоресурсы предприятия.

Целью проведения данных исследований являлось изучение каталитической активности β-галактозидазы при различных температурах в

пермеате творожной и подсырной сыворотки при совмещении процессов электродиализа и ферментативной обработки.

При проведении исследований использовалась электродиализная установка ED mini производства АО MEGA (Чешская Республика), пермеат творожной и подсырной сыворотки, препарат  $\beta$ -галактозидазы «Биолактазы Л20», Kerry Ingredient. Первый этап гидролиза был совмещен с процессом электродиализа и проводился в течение 2 ч при следующих условиях: доза внесения фермента 1 мл/л, температура  $(20,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  или  $(30,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ , до достижения уровня деминерализации около 70 %. Второй - без электродиализной обработки, температура  $(40 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  в течение 4 ч до достижения степени гидролиза лактозы около 90 %.

В качестве контроля использовались образцы пермеата, гидролизованные при  $(40,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ , доза внесения фермента 1 мл/л. В процессе гидролиза контролировались остаточное содержание лактозы и точка замерзания пермеата (рисунки 1 - 3).

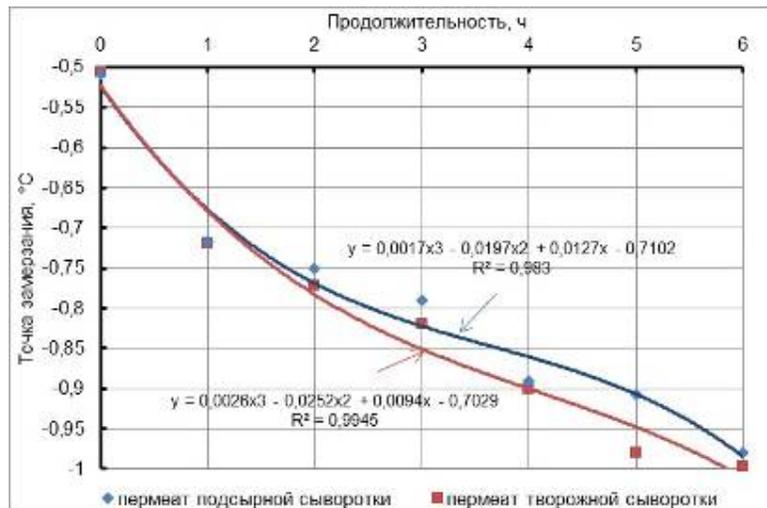


Рисунок 1 – Динамика точки замерзания образцов в течение электродиализной обработки  $(20,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$  и ферментативной обработки

Сравнительный анализ полученных данных показывает, что динамика ферментативного гидролиза лактозы в контрольных образцах (рисунок 3) и в образцах с электродиализной обработкой (рисунки 1, 2) отлична. При температуре  $(20 \pm 2,0)^\circ\text{C}$  точка замерзания в течение 6 часов понижается равномерно и достигает максимального значения  $(-0,98 \pm 0,01)^\circ\text{C}$  в пермеате подсырной сыворотки и  $(-0,996 \pm 0,01)^\circ\text{C}$  в пермеате творожной сыворотки.

В образцах с электродиализной обработкой при температуре  $(30 \pm 2,0)^\circ\text{C}$  точка замерзания значительно быстрее понижается после 2-х часовой электродиализной обработки и имеет максимальное значение  $(-0,99 \pm 0,01)^\circ\text{C}$  в пермеате подсырной сыворотки и  $(-1,001 \pm 0,01)^\circ\text{C}$  в пермеате творожной сыворотки.

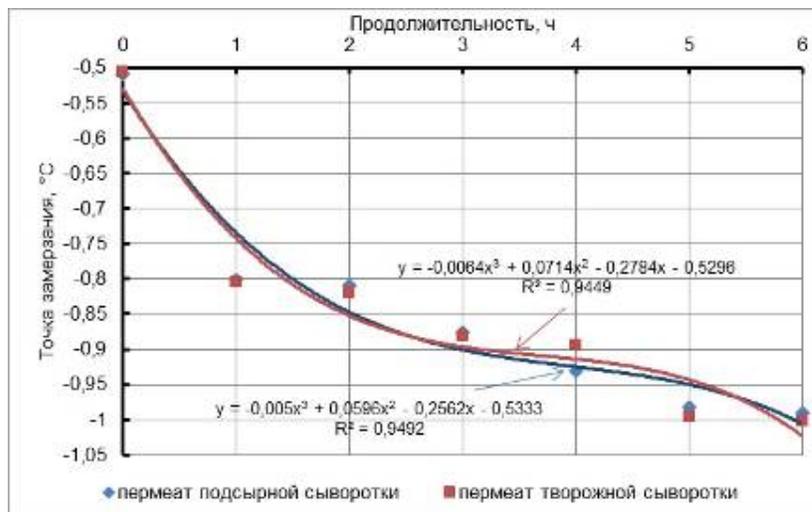


Рисунок 2 - Динамика точки заморозания образцов в течение электродиализной ( $t = (30,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ ) и ферментативной обработки

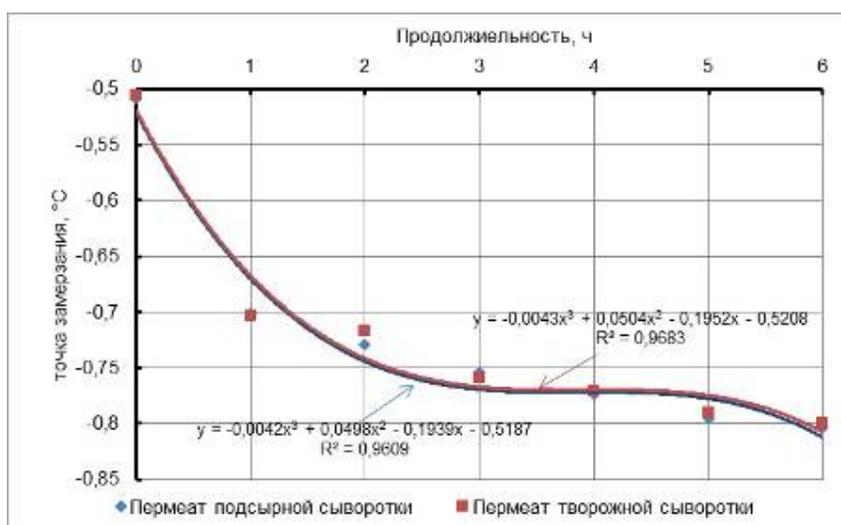


Рисунок 3 - Динамика точки заморозания контрольных образцов в течение ферментативной обработки с применением ферментного препарата «Биолактаза Л20»

Скорость гидролиза лактозы после 2-х часов электродиализной обработки ускоряется (рисунок 4 а, б). Вероятнее всего это связано с тем, что при электродиализе происходит частичное удаление одновалентных катионов и анионов, что способствует повышению активности фермента  $\beta$ -галактозидазы [5, 6]. Следовательно, можно утверждать, с повышением уровня деминерализации пермеата до 70% увеличится степень гидролиза лактозы во вторичном молочном сырье.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что для наиболее максимального достижения степени гидролиза эффективным является одновременный процесс гидролиза и электродиализа, при температуре  $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , с применением ферментного препарата «Биолактаза Л20» в течение 6 часов.

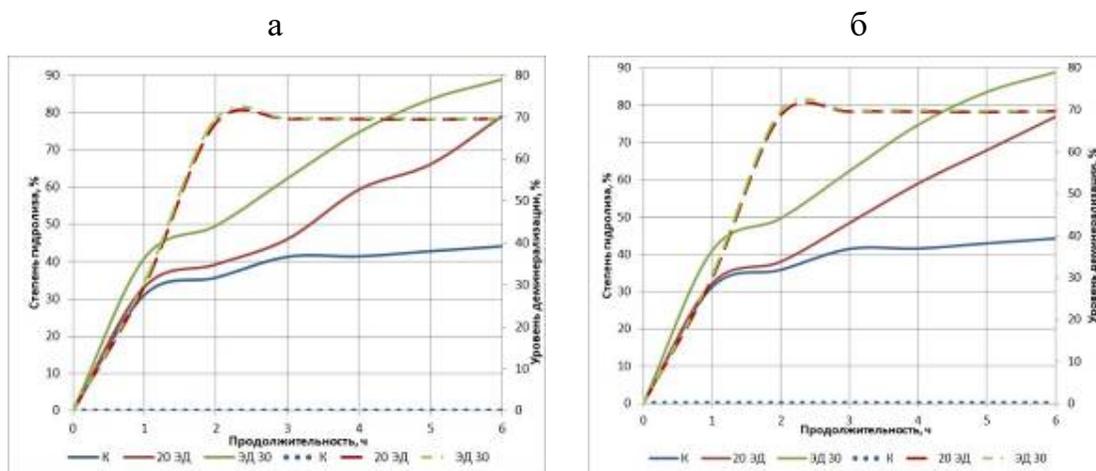


Рисунок 4 – Влияние уровня деминерализации на степень гидролиза лактозы в пермеате подсырной (а) и творожной (б) сыворотки с применением фермента «Биолактаза Л20»

#### Список литературы:

1. Евдокимов, И.А. Деминерализованный пермеат как альтернатива молочному сахару / И.А.Евдокимов, Д.Н.Володин, В.К.Топалов, В.А.Михнева // Молочная промышленность. – 2013 – №2.
2. Михнева, В.А. Гидролизаты лактозы для молочных продуктов с фруктово-ягодными наполнителям/В.А. Михнева, И.А. Евдокимов, В.С. Сомов // Молочная промышленность. 2012. - №7. – С. 58-59.
3. Сомов, В.С. Разработка технологии фруктовых добавок с использованием глюкозо-галактозных сиропов [Текст] : дис. ... канд. техн. наук.: 05.18.04 / Сомов Виталий Сергеевич; [Место защиты: Сев.-Кавказ. федер. ун-т].- Ставрополь, 2013. - 151 с.
4. Alak Kumar Singh and Karunakar Study on Hydrolysis of Lactose in Whey by use of Immobilized Enzyme Technology for Production of Instant Energy Drink Advance Journal of Food Science and Technology 4(2): 84-90, 2012.
5. Archana Parashar. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry/ Archana Parashar, Yiqiong Jin, Beth Mason, Michael Chae, David C. Bressler// Journal of Dairy Science. March 2016, P. 1859–1867
6. Wail-Alomari, Malik Hadadin, Ali K. Alsaed and Khalid Al-Ismail Optimization of Acidic Labneh Whey Lactose Hydrolysis with Immobilized Beta-Galactosidase Enzyme from Kluyveromyces lactis Jordan Pakistan Journal of Nutrition 10 (7): 675-679, 2011.

## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА В КОРЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СИРЕНИ

Курченко В.П.<sup>1</sup>, Ризевский С.В.<sup>1</sup>, Эсауленко М.А.<sup>1</sup>, Цыганков В.Г.<sup>2</sup>,  
Бондарук А.М.<sup>2</sup>, Филонюк В.А.<sup>3</sup>, Спиридович Е.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет, г. Минск, e-mail:  
kurchenko@tut.by

<sup>2</sup> РУП «Научно-практический центр гигиены», г. Минск

<sup>3</sup> Центральный аппарат Министерства здравоохранения Республики  
Беларусь, г. Минск

<sup>4</sup> Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск

*Изучен состав вторичных метаболитов из коры 14 видов сирени с использованием ГХ-МС. В метанольных экстрактах из коры идентифицированы более 60 различных веществ, значительную часть которых составляют оксикислоты, фенольные и фенилпропаноидные соединения. Показано значительные видовые отличия в составе и содержании ряда фенольных веществ.*

Потребности фармацевтического рынка, реализуются путем разработки новых лекарственных препаратов на основе растительного сырья. Предпосылкой для создания таких препаратов является изучение химического состава лекарственных растений, в том числе и представителей рода *Syringa* L. Органы и ткани растений рода *Syringa* используются в качестве лекарственных средств для лечения ревматоидного артрита, астмы, тахикардии и стенокардии. Из этих растений, получают эфирные масла, пищевые добавки и бактерицидные средства. Проведенные фитохимические исследования показали присутствие в цельных экстрактах из сырья растений различных видов рода *Syringa* разнообразных соединений: иридоидов, лигнанов, фенилпропаноидов и фенилэтаноидов, обладающих противоопухолевой, гипотензивной, антиоксидантной и противовоспалительной активностями. Иридоиды, лигнаны и фенилэтаноиды являются основными компонентами экстрактов и, вероятно, обуславливают независимо друг от друга или синергично основные виды биологической активности [1-4].

В Центральном ботаническом саду НАН Беларуси коллекция представителей рода *Syringa* L. по видовому, сортовому и гибриднему разнообразию составляет более 250 таксонов, а видовая коллекция представлена 35 таксонами. Возраст растений в среднем 40–50 лет. Для практического использования в фармацевтике интродуцированных видов сирени ЦБС требуется проведение фитохимических исследований направленных на сравнительный анализ состава и содержания в экстрактах из коры биологически активных веществ.

Целью работы являлось изучение состава биологически активных веществ в экстрактах коры сирени различных видов из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

#### **Материалы и методы**

Объектом исследования служили побеги 2-годичной вегетации 14 видов сирени: сирень Вольфа (*Syringa Wolfi*), сирень юньнаньская (*Syringa yunnanensis*), сирень волосистая (*Syringa villosa*), сирень амурская (*Syringa amurensis*), сирень гималайская (*Syringa emodi*), сирень Звегинцова (*Syringa sweginzonii*), сирень Комарова (*Syringa komarowi*), сирень тонковолосистая (*Syringa tomentella*), сирень пекинская (*Syringa pekin*), сирень венгерская (*Syringa josikae*), сирень настоящая (*Syringa rhodopea*), сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris*), сирень пушистая (*Syringa pubescens*), сирень сетчатая (*Syringa reticulata*), которые были предоставлены Национальным ботаническим садом НАН Беларуси. Сбор растительного сырья проводили в период массового цветения от здоровых, хорошо развитых, не поврежденных растений. Сушку растительного сырья проводили воздушно-теневым способом. Для экстракции кору измельчали и просеивали через сито. Полученный материал хранили в закрытых стеклянных емкостях. Навеску коры 0,5 г помещали в колбу объемом 150 мл, прибавляли 6 мл 70 % спирта и нагревали с обратном холодильником на кипящей водяной бане 30 минут. Полученные экстракты охлаждали до комнатной температуры, фильтровали, доводили объем фильтрата 70 %-ым спиртом до 12,5 мл и хранили при 4 °С без доступа света.

Исследования состава вторичных метаболитов проводилось на газовом хроматографе Agilent 6850, оснащенный масс-детектором Agilent 5975В. Процентный состав вторичных метаболитов вычислялся по площадям пиков без использования поправочных коэффициентов. Качественный анализ основан на сравнении масс-спектров компонентов эфирного масла с соответствующими данными библиотеки масс-спектров NIST0.5a.

Представленная в статье дендрограмма получена в результате кластерного анализа в программе «Statistika 7». Исходные данные предварительно стандартизировали. Ветви дендрограммы соединялись по правилу *single linkage*. Расстояние между объектами на дендрограмме вычисляли по методу *Euclidean distances*.

#### **Результаты и обсуждения.**

Из литературных данных следует [1-6], что кора сирени является важным источником биологически активных соединений. Фитохимические исследования с использованием ВЭЖХ-МС различных видов рода *Syringa* позволили обнаружить более 140 вторичных метаболитов. Иридоиды в растениях рода *Syringa* представлены 46 соединениями, среди которых секоиридоиды являются наиболее распространенными [5, 6]. Лигнаны образуют еще одну группу соединений, которые представлены 34 простыми и гликозилированными соединениями [1,2]. Они преобладают в составе

экстрактов, полученных из таких видов, как *S. komarowii*, *S. pubescens*, *S. reticulata*, *S. velutina*, *S. patula*, *S. vulgaris*, *S. pinnatifolia* [5]. Кроме этого в экстрактах обнаружен ряд минорных соединений: фенилпропаноиды и их аналоги, флавоноиды, сесквитерпены и другие [1].

Проведенные нами исследования позволили существенно дополнить количество описанных вторичных метаболитов в коре сирени (таблица).

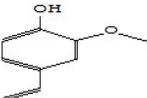
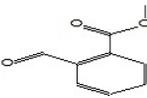
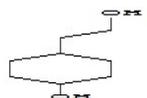
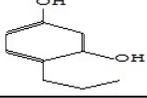
По результатам анализа с использованием ГХ-МС, определены наиболее часто встречающиеся вещества в экстрактах коры сирени различных видов: Dihydroxyacetone; Glycerin, 2-Methoxy-4-vinylphenol; Benzeneethanol; (E)-4-(3-Hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenol; 2(3H)-Naphthalenone,4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4a-methyl-; Levodopa; trans-Sinapylalcohol; Hexadecanoicacid; 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethylester; Benzenamine, N,3-dimethyl; gamma-Sitosterol; 1,2,3-Propanetriol, 1-acetate; Benzoicacid, 4-formyl-, methylester. В экстрактах было обнаружено более 60 соединений, среди которых синтез сиренью иридоидов и др. соединений связан с борьбой с растительноядными животными или микробами. Необходимо отметить, что в экстрактах показано высокое относительное содержание синапового спирта и других фенилпропаноидных соединений и большого ряда фенольных веществ. Высокое содержание лигнанов в стеблях и корнях представителей *Syringa* определяет жесткость вегетативных органов этих растений. Исследования активности этих соединений были проведены *in vivo*. Различия в составе и содержании биологически активных веществ в коре сирени определяются их видовой принадлежностью.

На основании кластерного анализа вторичных метаболитов экстрактов из коры сирени различных видов установлено, что по составу исследованных веществ они составили два условных кластера (рисунок). В один из которых входят виды: сирень Комарова (*Syringa komarowii*), сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris*), сирень венгерская (*Syringa josikae*), сирень сетчатая (*Syringa reticulata*). Установлено, что по составу вторичных метаболитов эта группа наиболее удалена от других видов сирени.

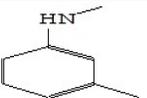
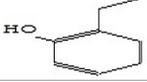
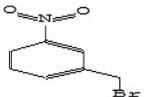
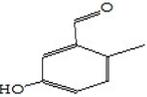
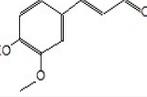
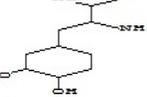
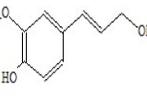
Таким образом, проведенные исследования состава и относительного содержания вторичных метаболитов в экстрактах коры сирени 14 видов позволили выявить новые, ранее не описанные вещества, которые могут проявлять различную фармакологическую активность.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории интродукции древесных растений ЦБС: к.б.н., доценту И.М. Гарановичу, С.Е. Булыко и В.Г. Гринкевичу за предоставленный растительный материал сиреней и Ю.С. Полякову за выполнение хроматографического анализа.

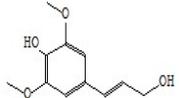
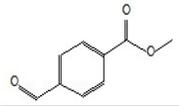
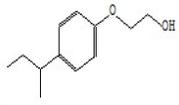
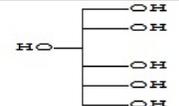
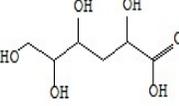
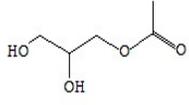
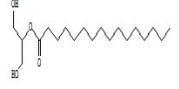
Таблица – Состав и содержание основных биологически активных веществ в экстрактах коры сирени

| Наименование вещества                 | Формула   | Относительное % содержание в экстрактах сирени |                 |                    |                    |                 |                   |                    |                  |                  |                        |                 |                   |                     |                 |      |
|---------------------------------------|---|--|-----------------|--------------------|--------------------|-----------------|-------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------------|-----------------|-------------------|---------------------|-----------------|------|
|                                       |   | сирень Вольфа                                  | сирень пушистая | сирень юньнаньская | сирень Звездицкова | сирень амурская | сирень волосистая | сирень гималайская | сирень настоящая | сирень пекинская | сирень тонковолосистая | сирень сетчатая | сирень венгерская | сирень обыкновенная | сирень Комарова |      |
| 1                                     | 2   | 3  | 4               | 5                  | 6                  | 7               | 8                 | 9                  | 10               | 11               | 12                     | 13              | 14                | 15                  | 16              |      |
| 2-Methoxy-4-vinylphenol               |    | 0,75   | 0,67            | 0,99               |                    |                 | 0,96              | 1,04               |                  |                  | 0,96                   | 1,15            | 0,41              | 1,18                | 0,54            | 0,52 |
| Benzoic acid, 2-formyl-, methyl ester |   |  |                 | 1,86               |                    | 2,35            |                   |                    |                  |                  |                        | 1,32            |                   |                     |                 |      |
| Benzeneethanol, 4-hydrox-             |  | 5,11   | 7,22            | 4,53               | 9,42               | 2,96            | 5,44              | 3,26               | 2,85             | 2,86             | 10,06                  | 1,94            | 5,33              | 0,83                |                 |      |
| 1,3-Benzenediol, 4-propyl-            |  |  | 0,84            | 0,41               |                    |                 |                   |                    |                  | 1,88             |                        | 3,99            |                   | 0,18                |                 |      |

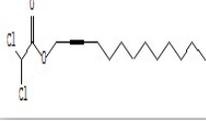
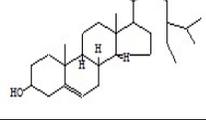
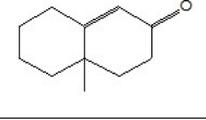
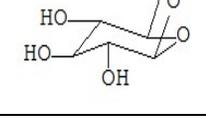
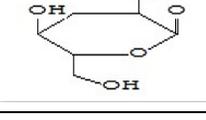
Продолжение таблицы

|   |   |       |       |       |       |       |       |      |       |       |      |      |      |      |      |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|------|------|------|------|
| Benzenamine, N,3-dimethyl-                      |    | 1,38  | 1,62  | 1,46  | 0,85  |       | 4,31  | 1,08 | 4,26  | 0,61  | 1,9  |      | 1,57 | 3,21 | 41   |
| Phenol, 2-propyl-                               |    | 1,04  |       |       | 1,95  |       |       | 1,18 |       |       |      |      |      |      |      |
| Benzene, 1-(bromomethyl)-3nitro-                |    | 5,5   |       | 7,6   |       |       |       |      |       |       |      |      | 4,71 |      |      |
| 5-Hydroxy-2-methylbenzaldehyde                  |    |       | 1,44  | 0,91  |       | 0,93  | 2,16  |      |       |       |      |      | 1,11 |      | 1,84 |
| Coniferyl aldehyde                              |    | 0,29  | 0,21  |       | 0,48  |       |       |      |       |       |      |      |      |      |      |
| Levodopa  |   | 14,64 | 15,99 | 13,48 | 13,11 | 23,63 | 12,01 | 9,02 | 10,03 | 10,59 | 8,93 | 8,69 |      |      | 3,61 |
| (E)-4-(3-Hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenol |  | 0,46  | 5,41  | 0,45  | 3,1   | 2,48  | 4     | 4,26 | 3,58  | 0,4   | 4,72 | 0,36 | 0,5  | 4,32 | 0,64 |

Продолжение таблицы

|   |   |      |      |       |      |      |      |      |       |      |       |       |      |       |       |      |
|---|---|------|------|-------|------|------|------|------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|
| trans-Sinapyl alcohol                                     |    | 4,68 | 2,46 | 5,65  | 0,51 | 1,66 | 4,38 | 3,84 | 3,74  |      | 0,52  | 0,63  | 3,9  | 10,26 | 0,42  |      |
| Benzoic acid, 4-formyl-, methyl ester                     |    | 2,5  | 2,74 |       | 1,87 |      | 2,42 | 1,85 | 2,57  |      | 1,84  | 0,57  |      | 2,81  | 1,26  | 3,94 |
| Ethanol, 2-[4-(1-methylpropyl)phenoxy]                    |    | 0,71 |      |       | 1,64 | 0,58 |      |      |       |      |       |       |      |       | 1,1   |      |
| DL-Glucitol   |    | 7,88 | 8,01 | 10,79 |      | 7,63 |      |      | 15,95 |      | 18,81 | 15,79 | 6,98 |       | 22,15 |      |
| 3-Deoxy-d-mannonic acid                                   |   | 2,03 | 1,33 | 2,19  | 1,82 |      | 3,76 | 2,21 |       |      |       | 2,24  |      | 1,93  |       |      |
| 1,2,3-Propanetriol, 1-acetate                             |  | 0,46 | 0,74 | 0,36  | 1,51 | 1,28 |      |      | 0,81  | 0,86 | 0,84  | 1,22  | 0,35 | 0,4   | 0,61  |      |
| Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester |  | 0,47 | 0,28 | 0,53  | 0,41 | 0,37 | 0,4  | 2,96 | 0,19  | 0,3  | 0,48  | 0,32  | 0,24 |       |       |      |

Продолжение таблицы

|   |   |      |      |      |      |      |       |       |      |       |      |      |      |       |      |
|---|---|------|------|------|------|------|-------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
| n-Hexadecanoic acid   |    | 0,93 |      | 0,62 | 0,7  | 0,64 |       |       | 0,97 |       | 0,75 |      | 0,6  | 0     | 0,69 |
| Dichloroacetic acid, tridec-2-ynyl ester                          |    | 1,45 |      |      |      | 0,49 |       |       |      |       | 0,98 |      | 0,68 |       |      |
| .gamma-Sitosterol   |    | 0,48 |      | 1,23 | 1,79 | 1,23 | 0,48  |       |      | 0,79  | 0,35 | 0,72 | 0,27 | 1,02  | 0,63 |
| 2(3H)-Naphthalenone,4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4 <sup>a</sup> methyl- |    | 9,7  | 8,41 | 1,52 | 3,18 | 2,96 | 12,04 | 17,89 | 7,32 | 12,54 | 4,15 | 1,66 | 5,07 | 14,17 | 2,77 |
| .beta.D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-                               |   | 0,63 | 1,07 | 2,37 |      | 0,61 | 2,91  | 2,67  |      |       | 0,51 | 1,18 | 1,25 | 2,67  |      |
| 3Deoxy-d-mannoic lactone  |  | 5,26 |      | 3,42 |      | 2,22 | 5,58  |       | 3,1  |       | 4,57 |      |      |       |      |

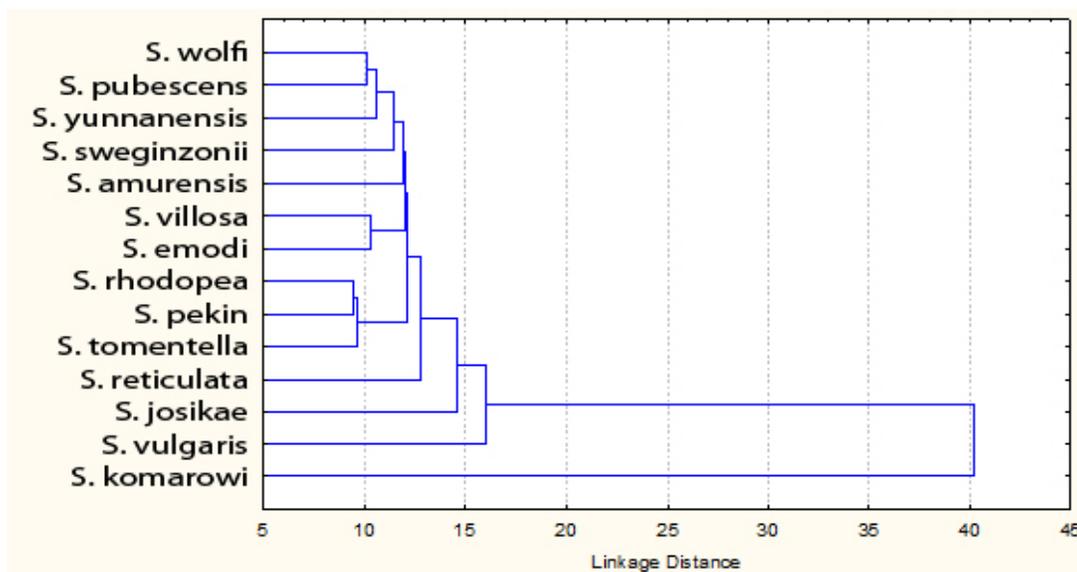


Рисунок – Дендрогрaмма на основе компонентного состава вторичных метаболитов представителей рода *Syringa*

### Список литературы

1. Куркин, В.А. Фармакогнозия / В.А. Куркин. – Самара: ООО "Офорт", 2004. – 1180 с.
2. Vrugtman F. Lilacs: A Gardener's Encyclopedia by John L. Fiala; Oregon. Timber Press. – 416 p.
3. Zhang JF, Zhang SJ. An overview of the genus *Syringa*: phytochemical and pharmacological aspects. *Nat Sci J Hainan Univ.* 2007;2:201–5.
4. Deng RX, Yuan H, Liu P, Yin WP, Wang XS, Zhao TZ. Chemical constituents from *Syringa pubescens* Turcz. *Biochem Syst Ecol.* 2010;38:813–5.
5. Dinda B, Debnath S, Harigaya Y. Naturally occurring iridoids. a review, part 1. *Chem Pharm Bull.* 2007;55:159–222.
6. Ghisalberti EL. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine.* 1998;5:147–63.

### ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ФЛАВОНОИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ КОЛЛЕКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ

Леонтьев В.Н.<sup>1</sup>, Феськова Е.В.<sup>1</sup>, Игнатовец О.С.<sup>1</sup>, Титок В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет», Минск, leontiev@belstu.by

<sup>2</sup> ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск

*Подобраны условия экстракции флавоноидов из лекарственных растений. Определено общее содержание флавоноидов в образцах растений коллекции ЦБС НАН Беларуси по методу Фолина-Чокальтеу. Методом*

*ВЭЖХ-МС в экстрактах цмина песчанного (Helichrysum arenarium) и воробейника лекарственного (Lithospermit officinale) идентифицированы флавоноиды (кемпферол и изокверцитрин), играющие ключевую роль в регенерации нервной ткани.*

**Введение.** Флавоноиды, принадлежащие к классу полифенольных соединений растительного происхождения, относятся к вторичным продуктам метаболизма растений. Они участвуют в пигментации растений, играют важную роль в сигнальных клеточных системах и служат мессенджерами химических сигналов в процессах экспрессии генов, изменяя активность регуляторных белков, эффективно защищают растения от различных неблагоприятных факторов окружающей среды (УФ-излучения, температурного стресса, повышенных концентраций тяжелых металлов и др.), а также от бактериальной, грибковой или вирусной инфекции и повреждения насекомыми. Антирадикальные и антиоксидантные свойства флавоноидов обуславливают их участие в защите растений от окислительного стресса и ряда патологий.

Данные природные вещества не синтезируются млекопитающими, и их поступление в организм зависит от потребления в пищу растительных продуктов. Клинические и лабораторные исследования выявили у флавоноидов антиоксидантные, кардиотропные, капилляропротективные, гепатопротекторные, противогипоксические и другие свойства [1]. Природные флавоноиды не проявляют токсического действия, не являются кумулятивными и в больших дозах обычно не вызывают каких-либо побочных отрицательных эффектов.

В связи с перспективами использования флавоноидов в медицине, число исследований в этой области за два десятилетия выросло более чем в десять раз. Описание флавоноидов и предполагаемые их лекарственные свойства присутствует в большинстве работ, в которых анализируется химический состав растений традиционной медицины [2]. Одним из этапов научных исследований при изучении биологической активности отдельных флавоноидов и их комплексов, является разработка методов экстракции и количественного определения указанных соединений. На базе кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ и лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» проводятся научные исследования с целью разработки фитопрепарата, стимулирующего регенерацию нервных тканей. Американскими учеными установлено, что ключевыми флавоноидами, отвечающими за данный процесс являются кемпферол, фисетин и изокверцитрин [4].

Целью настоящей работы явилось изучение общего содержания флавоноидов в различных растениях, а также их идентификация с помощью метода хромато-масс-спектрометрии. Объектами исследования являлись

лекарственные растения из коллекции ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» (буквица лекарственная (*Betonica officinalis* L.), монарда дудчатая (*Monarda fistulosa* L.), шалфей мускатный (*Salvia sclarea*), репешок аптечный (*Agrimonia eupatoria* L.), цмин песчаный (*Helichrysum arenarium*), пустырник сердечный (*Leonurus cardiaca*), чернушка дамасская (*Nigella damascena*), шалфей луговой (*Salvia pratensis*), душица обыкновенная (*Origanum vulgare* L.), воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale*).

**Экспериментальная часть.** Для выделения флавоноидов из растений навеску сухого растительного сырья массой 0,1 г измельчали с добавлением 10 мл 70%-ного этилового спирта в фарфоровой ступке. Экстракцию проводили в течение 1 часа. Затем спиртовое извлечение количественно переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали 5000-6000 об/мин в течение 10 мин. Определение суммарного содержания флавоноидов проводили методом Фолина-Чокальтеу в модификации Синглетона и Росси, который основан на реакции фенолов с реактивом Фолина-Чокальтеу [3].

Водно-спиртовые экстракты анализировали при помощи хромато-масс-спектрометра (Waters, США) с использованием колонки BDS HYPERSIL C<sub>18</sub> 250×4,6 мм, 5мкм (Thermo Electron Corporation, США). Регистрацию хроматографического разделения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200–700 нм и масс-детектора с электроспреей ионизацией (ESI). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил : вода с 1% муравьиной кислоты в соотношении 20 : 80 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин.

Регистрацию масс-спектров осуществляли в области отрицательных и положительных ионов. Параметры масс-спектрометрии были следующими: напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 20 В, напряжение на экстракторе – 3 В, температура десольватации – 350°C, температура источника – 130°C, общий расход инертного газа (азота) – 480 л/час.

Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения «Mass Lynx». Для качественного и количественного определения флавоноидов в экстрактах лекарственных растений использовали стандартные растворы коммерческих препаратов кемпферола, фисетина, изокверцетрина, кверцетрин гидрата, резвератрола, гесперидина, 4-аллилализолола, нарингина и рутина.

**Обсуждение результатов.** При подборе условий экстракции флавоноидов из лекарственных растений были установлены следующие параметры: время экстракции – 1 час, температура экстракции – 20°C, соотношение массы навески и экстрагента 1:100, в качестве экстрагента был выбран раствор этилового спирта (70:30). Результаты измерений концентрации флавоноидов в растительных экстрактах представлены в таблице. Анализ представленных данных показал, что большое количество флавоноидов содержится в репешке, монарде, буквице, шалфее, воробейнике

и душице (таблица). Перечисленные растения могут культивироваться в Республике Беларусь, при этом, суммарное содержание флавоноидов указывает на перспективность их применения для фармацевтической промышленности с целью производства фитопрепаратов с разной биологической активностью.

Таблица – Результаты измерений концентрации флавоноидов в растительных экстрактах

| Название растения        | Часть растения | Концентрация фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/л | Содержание фенольных соединений в экстракте, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса |
|--------------------------|----------------|--|--|
| Пустырник сердечный      | Листья         | 76,7   | 7,58   |
| Монарда дудчатая         | Цветы          | 187,9  | 14,72  |
| Монарда дудчатая         | Листья         | 19,2   | 1,79   |
| Цмин песчаный            | Цветы          | 120,1  | 9,62   |
| Цмин песчаный            | Листья         | 43,2   | 3,50   |
| Буквица лекарственная    | Цветы          | 156,9  | 13,83  |
| Буквица лекарственная    | Листья         | 160,5  | 14,66  |
| Шалфей мускатный         | Листья         | 181,4  | 31,97  |
| Шалфей мускатный         | Цветы          | 181,4  | 14,46  |
| Репешок аптечный         | Цветы          | 66,5   | 6,08   |
| Репешок аптечный         | Листья         | 85,2   | 43,63  |
| Чернушка дамасская       | Семена         | 93,5   | 8,03   |
| Воробейник лекарственный | Листья         | 144,2  | 18,25  |
| Душица обыкновенная      | Цветы          | 156,1  | 23,63  |

Дальнейшим этапом явилось изучение компонентного состава образцов лекарственных растений. Для решения указанной задачи применяют различные физико-химические методы: тонкослойную хроматографию, спектрофотометрию с предварительными цветными реакциями отдельных компонентов, высокоэффективную жидкостную хроматографию и другие. Нами был выбран метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии, так как указанный метод позволяет не только количественно оценить содержание отдельных флавоноидов, но и подтвердить их структуру при отсутствии стандартных веществ. Практически для всех экстрактов лекарственных растений было характерно наличие большого числа компонентов.

На рисунке 1 а) представлена хроматограмма экстракта флавоноидов цмина песчаного (цветочная часть).

Масс-спектр компонента хроматографического пика с временем удерживания 26,63 мин (рисунок 1 б) соответствует 3-β-D-глюкопиранозиду кемпферола. Количественный анализ показал, что содержание указанного соединения составило 2,72 мг на 1 г с.в. цветков цмина песчаного.

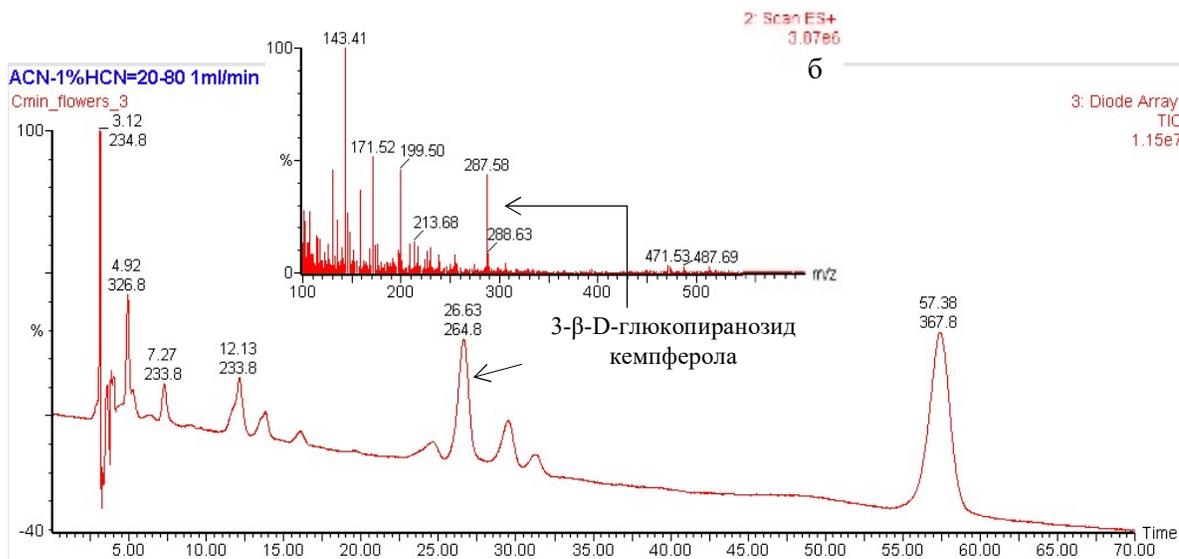


Рисунок 1 – Хроматограмма экстракта флавоноидов цмина песчаного (цветочная масса) (а) и масс-спектр компонента хроматографического пика с временем удерживания 26,63 мин в области положительных ионов (б)

Хромато-масс-спектрометрический анализ экстракта флавоноидов воробейника лекарственного (рисунок 2) показал, что компонент хроматографического пика с временем удерживания 12,39 мин соответствует изокверцитрину, содержание которого в его фитомассе составило 3,43 мг/г с.в.

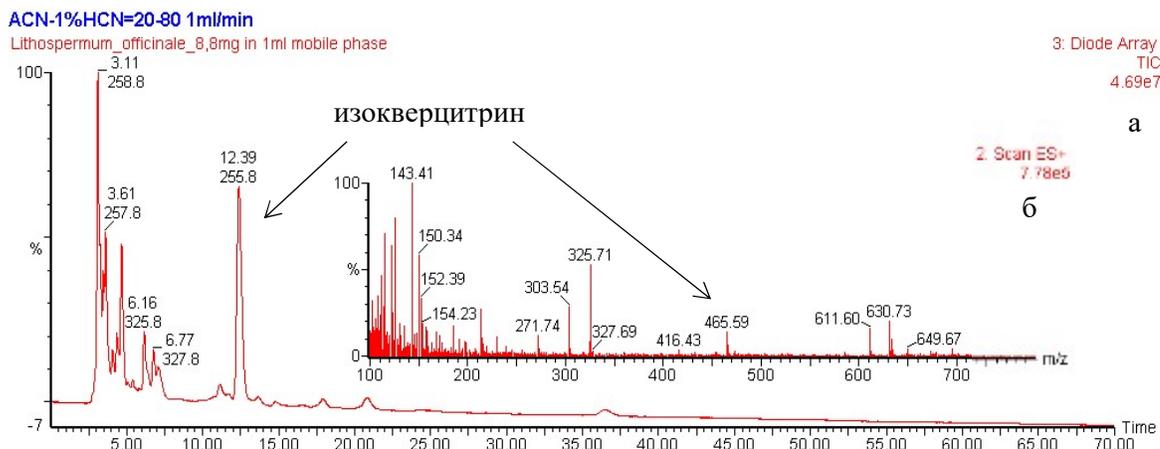


Рисунок 2 – Хроматограмма экстракта флавоноидов воробейника лекарственного (а) и масс-спектр компонента хроматографического пика с временем удерживания 12,39 мин в области положительных ионов (б)

**Выводы.** В ходе выполнения научно-исследовательской работы подобраны условия экстракции (концентрация экстрагента, соотношение сырье : экстрагент, температура экстракции, время экстракции) флавоноидов, позволяющие получить максимальное содержание веществ в экстракте;

разработаны методы выделения комплексов флавоноидов из отобранных видов растений; определено общее содержание флавоноидов методом Фолина-Чокальтеу в 10 образцах. Наибольшее содержание фенольных соединений, в пересчете на мг-экв.галловой кислоты, выявлено в экстрактах монарды дудчатой, буквице лекарственной, шалфее мускатном, репешке аптечном, душице, воробейнике лекарственном; определено содержание кемпферола в экстракте цветков цмина песчанного и изокверцитрина в экстракте плодоножек воробейника лекарственного.

### Список литературы:

1. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications / J. E. Brown [et al.]; eds. M. Andersen, K. R. Markham. – Boca Raton: CRC Press, 2006. –1197 p.
2. Matei A.O. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC–MS / A.O. Matei, F. Gatea, G.L. Radu // Journal of Chromatographic Science. – 2015. – Vol. 53, Issue 7. – P. 1147–1154.
3. Singleton V.L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin–ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, L.R. Rosa M. // Methods in Enzymology – 1999. – Vol. 299. – P. 152-178.
4. Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides [Electronic resource]. – Mode of access: [www.google.com/patents/US20120087980](http://www.google.com/patents/US20120087980). – Date of access: 21.02.2016.

### УНИКАЛЬНЫЙ ПРИРОДНЫЙ ШТАММ RAENIBACILLUS ENIMENSISIB-739

Мелентьев А.И., Логинов О.Н., Бойко Т.Ф., Актуганов Г.Э.  
Уфимский Институт биологии РАН, [mlnt@anrb.ru](mailto:mlnt@anrb.ru)

*Представлены данные, характеризующие редкие свойства природного штамма, позволяющие его использовать в качестве продуцента биологически активных веществ, полисахарида альгинатного типа, гидролитических ферментов и циклизующих глюканотрансфераз, а также биопрепаратов для растениеводства и животноводства.*

Аэробные спорообразующие бактерии хорошо известны как продуценты разнообразных продуктов микробиологического синтеза или основы биопрепаратов ростстимулирующего или фунгицидного действия. Их практическое использование обусловлено способностью продукции разнообразных экстрацеллюлярных гидролитических ферментов или низкомолекулярных вторичных метаболитов, проявляющих биологически активные свойства. Однако, выделяемые из природных местообитаний изоляты бактерий, как правило, проявляют невысокую целевую активность или продуктивность. Для повышения продуктивности используют разнообразные методы селекции или генетической модификации с целью

создания суперпродуцента того или иного продукта. Однако при этом, все энергетические и метаболические ресурсы генетически модифицированных клеток перестраиваются на исключительный синтез заданного продукта, а генетическая информация о других разнообразных веществах и продуктах находится в отключенном или приглушенном состоянии или вообще элиминируется. Безусловно, методами направленной селекции и генетической трансформации были получены многие бактериальные сверхпродуценты разнообразных продуктов, что способствовало развитию биотехнологического синтеза. Преимущества такого подхода в промышленной селекции неоспоримы, но возникает биотехнологическая проблема, – привязанность продукта к продуценту. Т.е., один продуцент – один продукт. Как избежать такой зависимости и можно ли получить универсальный штамм микроорганизмов, способный переключаться на преимущественный синтез того или иного продукта? Этот вопрос пока остается без ответа. Но есть примеры «счастливого случая» и ниже будет представлен один из них.

В лаборатории прикладной микробиологии Уфимского Института биологии РАН с середины 80-х годов прошлого века интенсивно осуществлялся скрининг микроорганизмов, как возможных продуцентов ряда ферментных препаратов и биологически активных веществ и возможных агентов биоконтроля распространения болезней растений, среди почвенных изолятов, выделяемых из различных местообитаний. Среди множества выделенных изолятов наше внимание привлек штамм, отличавшийся некоторыми биохимическими характеристиками, не встречавшимися у других, а именно, способностью подавлять развитие возбудителей обыкновенной корневой гнили, способностью к росту на безазотистой среде, способностью на средах с крахмалом образовывать кристаллы циклодекстринов, способностью к синтезу экзополисахаридов в жидкой среде вплоть до гелеобразования. В результате тщательного исследования его физиолого-биохимических, морфологических и культуральных признаков была установлена принадлежность штамма к аэробным спорообразующим бактериям, но в соответствии с существовавшими в то время таксономическими ключами, видовую принадлежность штамма установить не удавалось. Тем не менее, с целью депонирования и других протокольных мероприятий, штамм был определен как *Bacillus* sp. 739. В результате изучения спектра антигрибного действия данного штамма, было установлена способность угнетать развитие возбудителей обыкновенной корневой гнили *Bipolaris sorokiniana* ряда видов *Fusarium* [7], а также возбудителей твердой головни *Tilletiacaries*, бурой ржавчины *Puccinia recondita*, желтой ржавчины *Puccinia striiformis* [6]. По результатам многолетних лабораторных и полевых испытаний штамм был рекомендован в качестве основы биопрепарата для борьбы с возбудителями болезней злаковых культур [8].

Дальнейшее изучение механизмов антагонистического действия штамма на микроскопические грибы позволило обнаружить его способность к секреции ряда гидролаз [1, 4] и низкомолекулярных белков, пептидов [15].

Среди гидролаз следует выделить способность штамма к секреции хитиназы (КФ 3.2.1.14) и хитозаназы (КФ 3.2.1.132). Хитиназа была представлена белками с молекулярными массами 78 и 87 кДа, хитозаназа одним – 47 кДа. Температурный и pH-оптимумы обоих ферментов находились в интервале 45-55°C и 6,0-6,5 соответственно. С помощью данного ферментного комплекса удалось осуществить гидролиз хитозана с преимущественным получением низкомолекулярных форм хитозана (3-6 кДа) [3].

Предполагалось, что эти два фермента, могут участвовать в процессах лизиса клеточных стенок микроскопических грибов. Действительно, исследование неочищенных препаратов ферментов выявило связь между хитиназной активностью и способностью подавлять рост микромицетов. Однако, в результате поэтапной очистки фермент утрачивает способность ингибировать рост грибов [5]. Выяснилось, что миколитическая активность штамма обусловлена присутствием в хитинолитическом комплексе фермента ламинариназы (КФ 3.2.1.6) [9], а антагонистическая активность проявляется веществами, содержащимися в низкомолекулярной фракции культуральной жидкости [15]. Из низкомолекулярной фракции были выделены термолабильные вещества, способные ингибировать рост *Helminthosporium sativum*. Один из них оказался белком с молекулярной массой 14 кДа, а еще два вещества являлись пептидами с массами менее 6 кДа.

Как отмечалось выше, штамм в определенных условиях был способен к трансформации амилозы в циклические декстрины. Однако он не отличался высоким уровнем продукции циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТ-аза, КФ 2.4.1.19), поэтому не рассматривался нами, как потенциальный продуцент данного фермента. Тем не менее, при более тщательном исследовании физико-химических и каталитических свойств ЦГТ-азы данного штамма обнаружилось, что он пригоден для получения циклодекстринов с большим содержанием альфа- и гамма форм, но при превалировании бета- циклодекстрина [12]. Максимальная каталитическая активность проявляется в интервале температур 40 – 45 °С, фермент стабилен в интервале pH от 5,5 до 8,5. Также были подобраны условия предподготовки крахмальных растворов высокой концентрации для ферментализации и определены оптимальные параметры для получения циклодекстринов с постоянным соотношением гомологов. Таким образом, штамм может быть использован при организации производства циклодекстринов полифракционного состава [13].

Следующим полезным (по мере обнаружения) свойством штамма является его способность образованию экзополисахаридов [14]. При

определенных условиях, а именно при отсутствии минеральных источников азота в среде, штамм образует экзополимер, вплоть до гелеобразного состояния культуральной среды. Детальное изучение химической природы и структуры этого экзополимера подтвердило его принадлежность к полисахаридам. Молекулярная масса определена около 350 кДа. Определение мономерного состава методами ИК-спектроскопии, ЯМР  $^1\text{H}$  и ЯМР  $^{15}\text{C}$  выявило наличие D-маннурановой и L-гиалуроновой кислот. Соотношение маннурановая : гиалуроновая кислоты составило 0,32. По совокупности физико-химических свойств данный экзополисахарид отнесен к полимерам альгинатного типа с преобладанием гиалуроновой кислоты. Поскольку данный полимер обладает полиэлектролитной природой взаимодействия с солями в водных растворах, способностью в малых концентрациях резко воздействовать на реологические свойства водных систем, а также высокой склонностью к гелеобразованию у него есть перспективы применения в легкой, пищевой и нефтедобывающей промышленности. В этой связи штамм был запатентован и как продуцент экзополисахарида [10].

Выше отмечалось, что существовавшими в начале 90-х годов методами видовую принадлежность штамма установить не удалось. Однако современное состояние молекулярно-генетических методов предоставило возможность установить таксономическое положение штамма. По результатам секвенирования нуклеотидной последовательности гена ДНК, кодирующего 16SpPHK и на основании филогенетического анализа штамм был идентифицирован как *Paenibacillus ehimensis* IB-739 [13]. Последовательность гена зарегистрирована в базе GenBank за номером FN582329.1.

Совокупность вышеперечисленных свойств и качеств штамма *Paenibacillus ehimensis* IB-739 инициировала неожиданную идею его использования как основы для получения кормовой добавки. Предпосылками для этого послужили способность к продукции комплекса ферментов:  $\beta$ -1,3-глюканазы, ЦГТ-азы, протеазы, хитиназы и хитозаназы, а также выраженная антагонистичность к микроскопическим грибам, что должно способствовать улучшению разложения компонентов кормов, подавлению развития патогенных микромицетов и инактивации токсичных соединений. Все это, по нашему мнению, должно обеспечить повышение продуктивности животных и птицы за счет увеличения перевариваемости кормов, увеличение конверсии корма и усиление метаболических процессов в организме, снижение уровня заболеваемости животных и птицы, повышение сохранности поголовья. Предварительные исследования по применению водной суспензии бактерий *Paenibacillus ehimensis* IB-739, состоящая из жизнеспособных клеток штамма и его метаболитов, или лиофилизированной культуры для в качестве добавки к рациону для вскармливания птицы и поросят дали положительные результаты, которые изложены в заявке на изобретение [2].

Более детальное исследование влияния препарата Бациспектин БМ на морфо-биохимические показатели крови, состояние желудочно-кишечного тракта, а также показатели живой массы молодняка и поросят подтвердили положительное влияние его использования как кормовой добавки [11]. Введение препарата в основной рацион молодняка гусей приводило к снижению холестерина в крови, увеличению общего белка, количества эритроцитов, концентрации гемоглобина. Отмечено подавление патогенной микробиоты в желудочно-кишечном тракте. При этом дополнительный привес у гусей составил от 7,7 до 17,7 %, у свиней 13,3 – 14,4%.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о значительном потенциале природных штаммов для целей биотехнологического получения разнообразных продуктов и препаратов. К сожалению, зачастую это дело случая.

### Список литературы:

1. Актуганов, Г.Э. Выделение и свойства хитозаназы штамма *Bacillus* sp. 739 / Г.Э. Актуганов, А.В. Широков, А.И. Мелентьев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. Т.39, №5. – С. 536-541.
2. Заявка на изобретение РФ № 2017106190/10. Штамм *Raenibacillusehimensis* IB-739 (ВКМ В-2680D) для получения мультиэнзимной кормовой добавки. / Г.Ф. Рафикова, Е.В. Логинова, А.И. Мелентьев, О.Н. Логинов / Заявл. 22.01.2017.
3. Ильина, А.В. Деполимеризация хитозана хитинолитическим комплексом бактерии рода *Bacillus* sp. 739 / А.В. Ильина, В.П. Варламов, А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т.37, № 2. – С. 160-163.
4. Мелентьев, А.И. Выделение, очистка и характеристика хитиназы *Bacillus* sp. 739 / А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 6. – С. 624-628.
5. Мелентьев, А.И. Роль хитиназы в проявлении антигрибной активности штаммом *Bacillus* sp. 739 / А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов, Н.Ф. Галимзянова // Микробиология. – 2001. – Т.70, №5. – С.636-641.
6. Мелентьев, А.И. Бактерии-антагонисты фитопатогенных грибов / А.И. Мелентьев // Агро XXI. – 2001. – № 11. – С. 10-11.
7. Мелентьев, А.И. Изучение антагонизма между почвенными бациллами и микромицетами рода *Fusarium* LK: Fr. / А.И. Мелентьев, А.М. Еркеев // Микробиологический журнал. – 1990. – т. 52, № 1. – С. 53-56.
8. Патент РФ № 1743019, Штамм бактерий *Bacillus* sp. для получения препарата против грибных возбудителей болезней злаковых культур. / А.И. Мелентьев, Н.Г. Усанов, О.Н. Логинов / Опубл. 1994.
9. Патент РФ № 2213773, Продуцент комплекса хитинолитических ферментов и ламинариназы / А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов, Н.Г. Усанов, Л.Ю. Кузьмина / Опубл. 2003.

10. Патент РФ № 2460780 Продукт полисахарида. / Г.Г. Худайгулов, Г.Э. Актуганов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев, Н.Г. Усанов, Н.Н. Силищев / Оpubл. 2012.
11. Рафикова, Г.Ф. Эффективность кормовой добавки Бациспецин БМ при выращивании молодняка гусей и свиней / Г.Ф. Рафикова, М.Д. Бакаева, Е.В. Логинова [и др.] // Зоотехния. – 2017. – № 7. – С. 22-26.
12. Федорова, П.Ю. Биотехнология получения циклодекстриновополифракционного состава на основе продуцента *Raenibacillusehimensis* IB-739 : Автореф. дисс... канд. биол. наук. – Уфа, 2012. – 23 с.
13. Федорова, П.Ю. Бактерии *Raenibacillusehimensis* – новый источник циклодекстринглюканотрансфераз / П.Ю. Федорова, Е.А. Гильванова, Г.Э. Актуганов, А.И. Мелентьев // В сб. Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. – М.: ВНИИПБТ, 2012. – С. 49-52.
14. Худайгулов, Г.Г. Экзополисахаридальгинатного типа *Raenibacillus ehimensis* 739 / Г.Г. Худайгулов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук.– 2011. – Т.13, №5(3). – С. 214–217.
15. Широков, А.В. Белковые и пептидные факторы *Bacillus* sp.739 - ингибиторы роста фитопатогенных грибов / А.В. Широков, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев, Г.Э. Актуганов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т.38, № 2. – С. 161-165.

#### LED-ОСВЕЩЕНИЕ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССАМИ БИОСИНТЕЗА И МОРФОГЕНЕЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ *INVIVO* и *INVITRO*

Молчан О.В.<sup>1</sup>, Петринчик В.О.<sup>1</sup>, Запрудская Е.В.<sup>1</sup>,

Шабуня П.С.<sup>2</sup>, Фатыхова С.А.<sup>2</sup>, Лешина Л.Г.<sup>3</sup>, Булко О.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь, olga\_molchan@mail.ru

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup> Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина

*Установлен спектральный состав и интенсивность света, стимулирующего накопление биомассы и биосинтез фармакологически ценных вторичных метаболитов в *Catharanthus roseus* G.Don. Определены основные требования к LED-освещению при выращивании *C. roseus* и получении лекарственного сырья с повышенным содержанием фармакологически ценных противоопухолевых терпеновых индольных алкалоидов винбластин и винкристина, а также аймалицина – алкалоида с гипотензивной активностью. Изучена регуляция физиолого-биохимических*

параметров микроклонально размноженных растений-регенерантов *Digitalis purpurea* L., *Aervalanata* L и *C. roseus* in vitro с помощью различных режимов LED-излучения.

**Введение.** В условиях, когда необходимо постоянно увеличивать долю лекарственных субстанций отечественного производства, представляется важным развивать подходы к созданию сырьевой базы лекарственных растений. Поэтому сегодня особое значение имеет разработка и внедрение современных технологий, позволяющих получать на основе биомассы культивируемых растений сырье, содержащее необходимые фармакологически активные вещества в достаточном количестве независимо от климатических условий. Одной из таких технологий является культивирование растений с использованием светодиодного (LED (Light Emission Diodes)) излучения. Малая ширина спектра излучения полупроводниковых светодиодов является фактором, позволяющим использовать энергосберегающее освещение с оптимальным для конкретного вида растений спектральным составом, а также регулировать плотность потока фотонов (ППФ) и продолжительность излучения в пределах каждой спектральной составляющей.

Одним из наиболее фармакологически ценных растений является *C. roseus*, содержащий около 150 индольных алкалоидов, среди которых - соединения, обладающие противоопухолевой (винбластин, винкристин), гипотензивной (аймалицин, серпентин), диуретической (катарантин, виндолин) активностью [1]. Димерные алкалоиды винбластин и винкристин до сих пор не получены химическим синтезом, их выделяют только из растительного сырья, либо экстрагируют из растений предшественники – мономеры – катарантин и виндолин и используют их для синтеза димеров. Применяют при химиотерапии лимфогранулематоза, гематосарком и других онкологических заболеваниях. Содержание этих алкалоидов в растении крайне мало и варьирует в пределах 0,001-0,0001 %, стоимость достигает млн.\$/кг.

*Aervalanata* L. (эрва шерстистая), на родине двухлетняя трава, используется как антигельминтное и диуретическое средство, а корни - при лечении головных болей, в терапии заболеваний почек, мочевого пузыря, печени и ряда других заболеваний. Трава эрвы шерстистой содержит индольные алкалоиды, фенольные кислоты, флавоноиды и др.

*Digitalis purpurea* L. (наперстянка пурпурная) Надземная часть растения содержит стероидные гликозиды (дигитоксин, β-ацетилдигитоксин, дигитонин, гитоксин, гитонин), а также ряд органических кислот, сапонины, флавоноиды, холин и другие соединения.

В условиях восточно-европейского климата сырье данных видов растений не заготавливают и необходимые лекарственные препараты ввозят исключительно из-за рубежа. Следует также отметить, что изучение

регуляции биосинтеза фармакологически ценных вторичных метаболитов, а также роста и развития лекарственных растений *in vivo* и *in vitro* с помощью различных режимов LED-излучения является сегодня одним из перспективных направлений исследований. При этом число работ, посвященных влиянию света различного спектрального состава на растения и культуры *in vitro* крайне ограничено. В основном, проводили сравнительный анализ биосинтетических процессов в клетках гетеротрофных и фотомиксотрофных (на белом свете с использованием люминесцентных ламп) каллусных и суспензионных культур. При этом разными группами авторов получены весьма противоречивые данные [1, 2]. Только в последние несколько лет появилась возможность использовать в работах сверхъяркие светодиоды, позволяющие получать световой поток высокой интенсивности, необходимый для длительного культивирования растений при определенных режимах освещения [3-5]. Поэтому к настоящему времени очень мало информации о реакции лекарственных растений в т.ч. *C. roseus*, на LED-освещение [3-5]. При этом в литературе отсутствуют сведения об оптимальных режимах LED-освещения для активации биосинтеза ТИА и накопления винбластина и винкристина.

Целью данной работы было изучение влияния различных режимов LED-освещения на биосинтез вторичных метаболитов и физиолого-биохимические параметры растений при длительном культивировании в условиях закрытого грунта. Основные направления работы украинской стороны в данном проекте были связаны с изучением влияния LED-освещения на микроклонально-размноженные растения-регенеранты *in vitro*.

**Материалы и методы.** Растения *C. roseus* культивировали при люминесцентном (контроль) и LED-освещении различного спектрального состава и интенсивности, с фотопериодом – 16/8 часов (свет/темнота). Были использованы три специализированные системы LED-освещения с определенными спектральными характеристиками, изготовленные в Центре светодиодных и оптоэлектронных технологий НАН Беларуси. Конструкция систем позволяла обеспечить освещение с соотношением квантов синего (С) и красного (К) света С/К – 1/1,3; 1/2,5 или 1/4 и ППФ– 200 либо 500 мкмоль квантов\*м<sup>-2</sup> \*с<sup>-1</sup> на уровне верхней точки роста растений. Таким образом, было организовано 6 вариантов LED-освещения растений (LED 1-6). Высушенную до абсолютно сухой массы растительную ткань измельчали до состояния пудры и использовали для экстракции вторичных метаболитов. Определение аймалицина, виндолина, катарантина, винбластина и винкристина проводили методом ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 и тандемного масс-спектрометра Agilent 6410 TripleQuard. Содержание фенольных соединений и фотосинтетических пигментов, активность антиоксидантных ферментов определяли общепринятыми методами.

**Результаты и обсуждение.** Проиллюстрировать возможности применения светодиодов для направленного синтеза вторичных метаболитов можно на примере растений *C. roseus*. В результате проведенных исследований были установлены спектры и уровни плотности потока фотонов LED-освещения, оптимальные для ростовых процессов, а также синтеза и накопления алкалоидов. Так, например, определены режимы освещения, приводящие к увеличению высоты растений, площади венчика и интенсивности цветения. Накопление сухой массы листьев стимулировало LED-освещение с повышенным содержанием красного света в спектре излучения (рисунок 1А). Для образования корневой системы наиболее эффективными были варианты освещения с высоким уровнем ППФ (рисунок 1Б). Максимальным суммарным накоплением сухой массы характеризовались растения при высоком уровне ППФ и, особенно, с высоким соотношением в спектре красного света к синему.

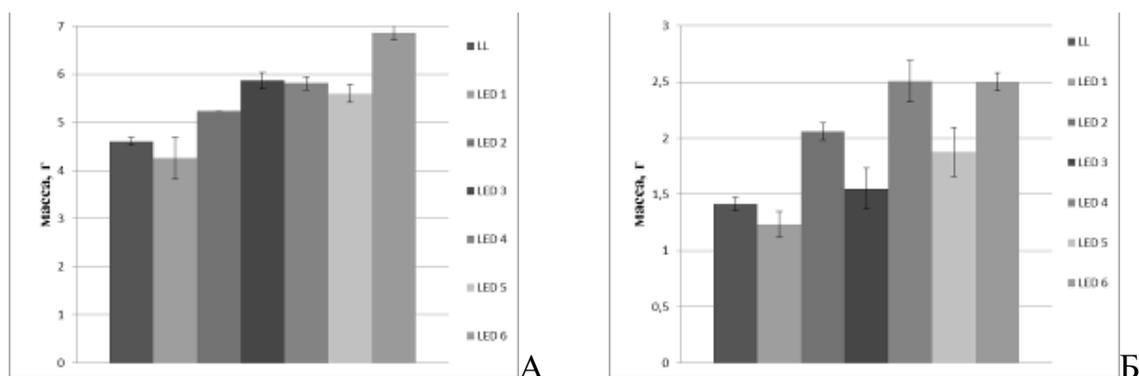


Рисунок 1 - Влияние различных типов освещения на сухую массу листьев (А), корневой системы (Б) *C.roseus*

Согласно хорошо известной схеме биосинтеза терпеновых индольных алкалоидов *C.roseus* в клетках растения функционируют два основных пути их образования из общего предшественника (рисунок 2). Первый – цепочка биосинтеза аймалицина и серпентина. Второй – путь биосинтеза мономерных алкалоидов катарантина и виндолина, их димеризация с образованием винбластина и винкрстина.

Нами были определены режимы LED-излучения, стимулирующие некоторые ключевые ферменты биосинтеза и, таким образом, цепочку биосинтетических процессов, приводящих к образованию аймалицина или димерных индольных алкалоидов. Исследования содержания алкалоидов подтвердили, что режим LED 3 стимулирует синтез и накопление виндолина, катарантина и винбластина, а режим LED 6 – аймалицина.

Можно заключить, таким образом, что представляется возможным культивирование растений *C. roseus* в условиях LED-освещения для получения высокоценных ТИА. А специализированные системы LED-освещения целесообразно использовать для проведения исследований по

регулируемому биосинтезу первичных и вторичных метаболитов хозяйственно ценных растений в закрытом грунте.

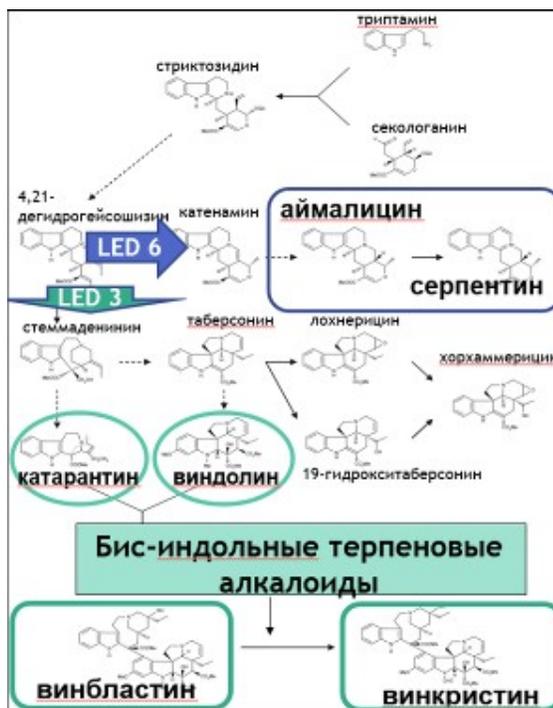


Рисунок 2 – Упрощенная схема биосинтеза ТИА *Catharanthus roseus* G. Don.

Сравнивая результаты, полученные при культивировании трех видов микроклонально размноженных растений *Digitalis purpurea* L. (трансформант *A. rhizogenes* (штамм 15834)), *A. valanata* L. и *C. roseus* при LED-освещении тремя комбинациями длин волн (К/С - 1,3/1; 2,3/1; 4/1) установили корреляционную связь ряда исследуемых показателей. Показано, что количество каротиноидов имеет обратную зависимость с отношением суммы хлорофиллов к каротиноидам. В растениях, где повышено содержание каротиноидов, обнаруживаются высокие показатели активности СОД. А у растений с высокими показателями- усилено побегообразование. Важным результатом оказалось обнаружение различий в конститутивном уровне компонентов антиоксидантной системы. Так, параметры общей антиоксидантной активности не коррелировали с другими показателями низкомолекулярных антиоксидантов и уровнем активности СОД. Это указывает на то, что в условиях *in vitro* вклад компонентов в антиоксидантную защиту не равнозначен. При сопоставлении морфологических характеристик с остальными результатами наблюдали прямую зависимость между некоторыми величинами. А именно, у более интенсивно развивающихся растений (с увеличенными размерами корня, листьев и побегообразования) отмечено более высокое содержание каротиноидов, флавоноидов и общей активности СОД. Установлено, что для

*D.purpurea* и *C.roseus* оптимальным является LED-освещение с соотношением К/С 2,3/1, а для *A.lanata*- 1,3/1.

Таким образом, LED-излучение может стать инструментом, позволяющим управлять и процессами биосинтеза вторичных метаболитов и ростом и развитием растений *invivo* *invitro*.

Работа выполнена при поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант №Б16К-050) и Украинского фонда фундаментальных исследований (грант №F73/65-2016)

### Список литературы:

1. *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques / A. Pietrosiuk [et al.] // *Phytochemistry reviews*. – 2007. – Vol. 6. – P. 459–473.
2. Loyola-Vargas V.M. Serpentine accumulation during greening in normal and tumor tissues of *Catharanthus roseus* / V.M. Loyola-Vargas [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 1992. – Vol. 140. – P. 213–217.
3. Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures / J. Zhao [et al.] // *Plant Growth Regulation*. – 2001. – Vol. 33. – P. 43–49.
4. Ohashi K.K. Growth and alkaloids production in Madagascar periwinkle plants grown under red LED: 2013 IFAC Bio-Robotics Conference / Sakai, Japan: K.K. Ohashi [et al.]. – Vol. 1 (1). – P. 274–277.
5. Demotes-Mainard S. Plant responses to red and far-red lights, application in horticulture / S. Demotes-Mainard [et al.] // *Environmental and experimental Botany* - 2016 – Vol. 121. - P. 4-21.

### БОТАНИКО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЧЕРЕДЫ СРОСТНОЙ (*BIDENSCONNATUS* WILLD., ASTERACEAE) – ИНВАЗИОННОГО ВИДА ФЛОРЫ БЕЛАРУСИ

Молчан О.В.<sup>1</sup>, Ханько А.В.<sup>2</sup>, Джус М.А.<sup>2</sup>, Скуратович Т.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН  
Беларуси», г. Минск, olga\_molchan@mail.ru

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет, dzhus\_maxim@mail.ru

Приводятся сведения о характере распространения, фитоценотической приуроченности и биохимическом составе инвазионного вида череды сростной (*Bidensconnatus* Willd.) на территории Беларуси. В настоящее время *Bidensconnatus* зарегистрирована во всех административных областях, но наиболее часто встречается в южных и центральных районах страны. В Беларуси вид морфологически однороден и относится к наиболее распространенной в Европе *var. fallax* (Warnst.) Sherff. Исследовано содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов в траве и различных органах растений. Наибольшая концентрация

фенольных соединений и флавоноидов отмечается в листьях и соцветиях.

**Введение.** Сырье растений рода Черёда (*Bidens*L.) активно используется в качестве лекарственного во многих странах мира. Наибольшее значение в этой связи имеет черёда трёхраздельная (*Bidenstripartitus*L.), включенная в Государственную фармакопею Республики Беларусь. Травя ч. трёхраздельной обладает выраженными противовоспалительными, антикоагулянтными, гепатопротекторными свойствами, применяется при лечении заболеваний мочеполовой, сердечной и дыхательной систем[1, 2]. В народной медицине используется как противоаллергенное средство, для лечения диатезов и экзем [1, 2]. Наряду с ч. трёхраздельной на территории Беларуси встречаются и другие аборигенные виды рода – ч. поникшая (*B. cernuus*L.) и ч. лучистая (*B. radiatus* Thuill.). Помимо дикорастущих видов в республике отмечено и 3 чужеродных представителя рода. Среди них активно спонтанно распространяются и обладают высоким потенциалом инвазивности ч. олиственная (*B. frondosus*L.) и ч. сросная (*B. connatus* Willd.) [2, 3]. Быстрые темпы их расселения в местах вторичного ареала приводят к вытеснению аборигенных видов череды[1-4]. К настоящему времени имеется крайне мало информации о возможности заготовки и применения чужеродных видов в качестве лекарственного сырья, а также исчерпывающих характеристик у них состава ценных метаболитов. Недостаточно исследованы распространение, фитоценотическая приуроченность, амплитуда и активность, внутри- и межпопуляционный полиморфизм этих видов в пределах вторичного ареала. Таким образом, геоботанические и биохимические исследования чужеродных представителей рода *Bidens* могут оказаться достаточно перспективными с точки зрения их дальнейшего хозяйственного использования.

Целью данной работы было изучение характера распространения, морфологической изменчивости, фитоценологических особенностей и содержания биологически активных соединений в траве и различных органах *B. connatus*.

**Материалы и методы.** Распространение *B. connatus* изучалось с 2000 года в ходе полевых флористических исследований в различных административных областях и районах республики. Всего за период исследований было обследовано более 130 локалитетов вида, заколлектировано около 200 гербарных листов. Учтены также литературные указания и гербарные материалы, собранные другими исследователями и хранящиеся в Белорусском государственном университете (MSKU), ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН (LE), Московском государственном университете (MW), региональных Гербариях ВУЗов г. Витебска, Гродно, Бреста, Гомеля, а также в институте экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича (MSK) (только предоставленные для исследования материалы). Картирование распространения *B. connatus*

проводилось точечным методом. Фитоценотическая приуроченность отмечалась при выполнении геоботанических описаний в местах произрастания вида. Объектами биохимических исследований являлись собранные в фазу бутонизации, цветения и начала плодоношения надземные побеги (трава), а также отдельно корни, стебли, листья и соцветия *V. connatus*. Сбор сырья был произведён в различных геоботанических подзонах Беларуси в трёх административных областях – Витебской (Шарковщинский район), Минской (Вилейский район) и Брестской (Берёзовский район) в 2015 и 2016 годах. Экстракты растительного сырья на основе 80% этанола были получены нагреванием при температуре 80<sup>0</sup>С в течение 30 мин трехкратно. Количественное определение суммы фенольных соединений и флавоноидов проводили общепринятыми методами с использованием реактива Фолина-Дениса и хлорида алюминия, соответственно.

**Результаты и обсуждение.** Черда сrostная – однолетнее травянистое растение североамериканского (США и Канада) происхождения. В Европе вид впервые был отмечен в 1890-х годах в Германии [1]. Ранее считалось, что первая регистрация *V. connatus* в Беларуси относится к 1991 г. (окрестности г. Туров, Житковичский район) [2], однако изучение гербарных материалов позволило нам обнаружить более ранние сборы вида в Мозырском районе Гомельской области («д. Стрельск, правый берег р. Припять. Рудеральное сообщество с преобладанием *Xanthium strumarium*. 24.08.1973. Вынаев Г.В. № 196» IN 180531. MSK). В данном локалитете ч. сrostная, по-видимому, была впервые отмечена для территории Восточной Европы. Анализ современного распространения вида показал, что в настоящее время его расселение в Беларуси носит характер экспансии. Начало этого процесса, приурочено к началу 2000-х годов. С этого времени количество известных местонахождений и спектр местообитаний значительно возрастают. На 2017 г. нами учтено более 150 локалитетов вида во всех административных областях республики, однако наибольшей встречаемостью ч. сrostная характеризуется в южных и центральных районах Беларуси (рисунок 1).

В Белорусском Полесье ч. сrostная в настоящее время является довольно обычным, широко распространенным, высокоактивным видом и встречается, помимо рудеральных сообществ, преимущественно по берегам естественных и искусственных водоемов и водотоков (рек, озер, водохранилищ, каналов и т.п.). Важно отметить, что *V. Connatus* нередко также в естественных и малонарушенных заболоченных лесных сообществах, таких как черноольшанники, пушистовоберезняки и пойменные дубравы, в том числе в значительной степени удаленных от населенных пунктов. В северной части Беларуси ч. сrostная пока редкий вид, а в Витебской области известны единичные местонахождения, приуроченные, в основном, к западным административным районам.

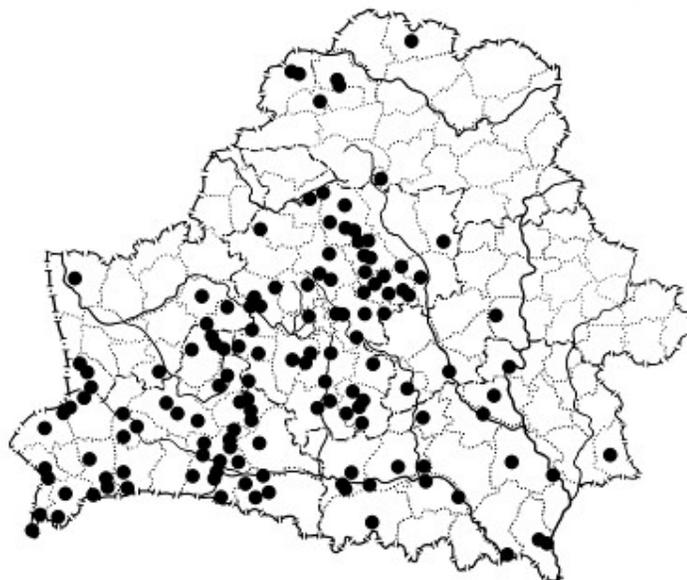


Рисунок 1 -Распространение *Bidens connatus* на территории Беларуси

*B. connatus* является полиморфным видом, в пределах первичного ареала у которого описано более 10 разновидностей и форм, отличающихся опушением и размерами семян, формой листьев, длиной листочков обертки и другими признаками. В Беларуси вид характеризуется морфологической однородностью и, как в других странах Европы, представлен var. *fallax* (Warnst.) Sherff, для которой характерно наличие длинных листовидных наружных листочков обертки, превышающих корзинки в 3 и более раз.

Содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов было определено в траве, а также отдельно в корнях, стеблях, листьях и соцветиях (рисунок 2, таблица 1). Наибольшая концентрация фенольных соединений отмечается в листьях и соцветиях, наименьшая – в стеблях. Максимальное количество флавоноидов характерно для листьев и соцветий, минимальное – для корней.

Распределение содержания фенольных соединений и флавоноидов *B. connatus* проиллюстрировано на рисунке 2 (А и Б) на примере сырья, собранного в Шарковщинском районе.

Содержание фенольных соединений и флавоноидов варьирует для растений, собранных в разных локалитетах (таблица 1). Эти различия, предположительно, определяются условиями произрастания.

Таким образом, изучены характер распространения, фитоценотическая приуроченность, а также содержание суммы фенольных соединений и флавоноидов в траве и различных органах растений инвазионного вида череды сростной (*Bidens connatus* Willd.) на территории Беларуси.

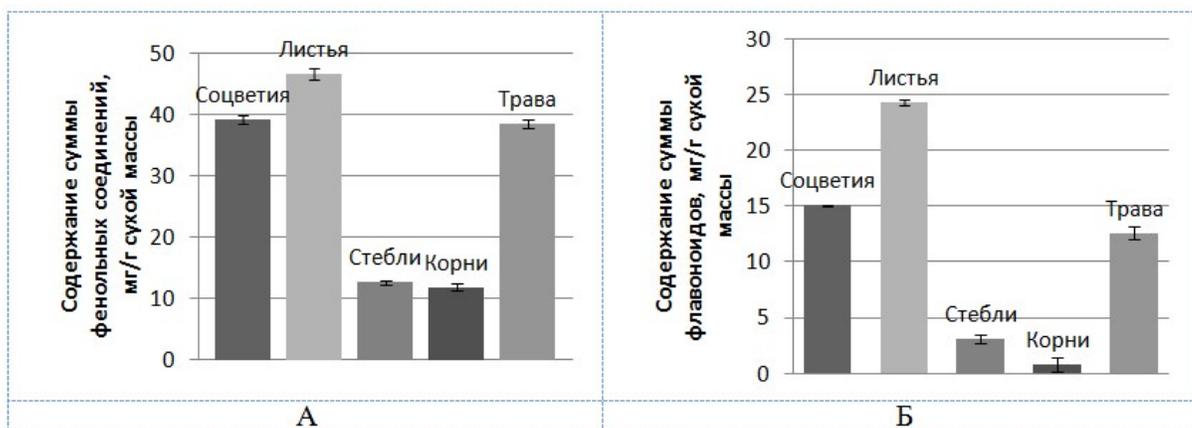


Рисунок 2 – Содержание суммы фенольных соединений (А) и флавоноидов (Б) в траве и отдельных органах *B. connatus* (Витебская обл. Шарковщинский район)

Таблица 1 – Содержание сумм фенольных соединений и флавоноидов в траве и различных органах растений череды сростной из различных административных районов

| Исследуемые органы и части растений | Шарковщинский район               |                              | Вилейский район                   |                              | Берёзовский район                 |                              |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
|                                     | Фенольные соед., мг/г сухой массы | Флавоноиды, мг/г сухой массы | Фенольные соед., мг/г сухой массы | Флавоноиды, мг/г сухой массы | Фенольные соед., мг/г сухой массы | Флавоноиды, мг/г сухой массы |
| Соцветия                            | 39,13±0,74                        | 15,04±0,10                   | 34,05±1,62                        | 11,26±1,12                   | 35,37±1,41                        | 17,12±0,88                   |
| Листья                              | 46,60±0,92                        | 24,26±0,25                   | 23,33±0,95                        | 10,45±1,08                   | 34,99±1,45                        | 14,32±0,54                   |
| Стебли                              | 12,58±0,28                        | 3,12±0,37                    | 5,12±0,42                         | 0,29±0,31                    | 6,42±0,25                         | 1,94±0,18                    |
| Корни                               | 11,84±0,56                        | 0,80±0,25                    | 6,19±0,24                         | 0,12±0,43                    | 8,45±0,19                         | 0,43±0,18                    |
| Трава                               | 38,36±0,70                        | 12,58±0,61                   | 27,23±2,82                        | 12,16±0,44                   | –                                 | –                            |

Работа выполнялась в рамках подпрограммы 2 «Противодействие экспансии чужеродных видов организмов, минимизация ущербов для природного биоразнообразия, экономики и здоровья человека» (Инвазии и экобезопасность) отраслевой научно-технической программы ОНТП «Интродукция, озеленение, экобезопасность» на 2016-2020 гг.

### Список литературы:

1. Галкина, М. А. Биоморфологические особенности инвазионных видов рода *Bidens* L. в европейской части России: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.01 / М. А. Галкина; ГБС РАН. – М., 2014. – 21 с.
2. Джус, М.А. Черда сростная (*Bidens connata* Muehl. ex Willd., Asteraceae) инвазионный вид во флоре Беларуси // Материалы II Международной науч.-практ. конференции «Биологическое разнообразие Белорусского Поозерья: современное состояние, проблемы использования и охраны», Витебск, 19–21 ноября 2008 г. / Вит. гос. ун-т; редкол.: А.М. Дорофеев (гл. ред.) [и др.]. –

Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2008. – 291 с. – С. 89–91.

4. Корожан, Н.В. Фармакогностическое обоснование применения нового источника череды травы и комбинированного средства на ее основе: дис. на соис. уч. ст. канд. фарм. наук: 14.04.01 / Н.В. Корожан; УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». – Витебск, 2016. – 174 с.

5. Молчан, О.В. Распространение череды олиственной (*Bidensfrondosus* L., Asteraceae) в Беларуси и содержание биологически активных соединений в сырье растений / О.В. Молчан [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т.11, Ч. 2. – С. 123–131.

### ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ЛИНИЙ КУЛЬТУР *IN VITRO* ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ – ОДНО ИЗ НАПРАВЛЕНИЙ РАЗВИТИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОЭКОНОМИКИ

Молчан О.В.<sup>1</sup>, Шабуня П.С.<sup>2</sup>, Фатыхова С.А.<sup>2</sup>, Юрин В.М.<sup>3</sup>,

<sup>1</sup> ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси» Минск, Республика Беларусь,

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup> Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь.

*Получены несколько высокопродуктивных каллусных линий: F4 – устойчивая к p-флуорофенилаланину, характеризующаяся повышенными уровнями накопления фенольных соединений и флавоноидов; метилтриптофан-устойчивые каллусные линии V4, 7, 11, 17 с повышенными уровнями активности ключевого фермента биосинтеза ТИА – триптофандекарбоксилазы, содержанием триптамина и основного алкалоида барвинка малого – винкамина. Отобранные линии характеризовались также достаточно высокими скоростями роста, сравнимыми с показателями первичной каллусной линии, а также стабильностью ростовых и биосинтетических процессов в течение 3-х пассажей.*

Независимо от определения сути биоэкономики, ее неотъемлемой частью являются биотехнологии, которые подразумевают модификацию и изменение живых организмов для создания способов их практического применения в различных областях производства, т.е. биоэкономика основана на системном использовании биотехнологии.

Одной из составляющих биоэкономики является разработка, освоение и использование клеточных технологий и интеграция знаний и приложений в различных секторах экономики и бизнеса [1].

Развитие фармацевтической промышленности тесно связано с получением природных препаратов из растительного сырья. С позиций

биоэкономики в данной отрасли биотехнология должна решить экологические и социальные проблемы, связанные с повышением эффективности производства, качеством и количеством получаемых препаратов из растительной биомассы, сохранением редких и исчезающих видов и т.д. С целью импортзамещения фармацевтических субстанций не последнюю роль должно сыграть введение в культуру не произрастающих в умеренной зоне лекарственных растений.

Поэтому необходимо разработать биотехнологические приемы получения линий культур растительных клеток *in vitro* с высоким содержанием ценных физиологически активных соединений.

Постановка такой задачи диктуется тем, что во многих случаях выход целевого продукта из культуры растительных клеток, выращенных *in vitro*, ниже, чем из травы нативного растения [2, 3].

Эта задача, в известной степени, ранее решалась нами путем подбора условий выращивания, воздействия различных физико-химических факторов и т.д. [4, 5] Особые надежды в этом направлении связывают с химическим мутагенезом [6].

Продемонстрируем эффективность используемых нами приемов химического мутагенеза на каллусной культуре *Vinca minor* L.

Для культивирования каллусных культур использовали агаризованную среду Мурасиге и Скуга (МС) [7], содержащую 30 г/л сахарозы, 1 мг/л НУК и 1 мг/л кинетин, 8 г/л агара. Культивирование проводили при 25 °С в темноте. Пересадку осуществляли каждые 25-30 суток. В качестве мутагена использовали этил-метансульфонат (EMS). Обработку клеток EMS проводили согласно [8]. Каллусные ткани обрабатывали стерильным раствором мутагена в течение 1 часа, затем трижды промывали неагаризованной средой культивирования. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что для каллусной ткани барвинка малого эффективная концентрация EMS составляла 1% [8, 9].

Отбор линий проводили, культивируя клетки на селективных средах, содержащих р-флуорофенилаланин (PFP - аналог фенилаланина) и 4-метилтриптофан (4МТ – аналог триптофана) согласно [8, 9], и определяя индекс роста, активность триптофан декарбоксилазы (ТДК), содержание фенольных соединений (ФС), флавоноидов, триптамина и винкамина, а также по морфологическим признакам.

#### *Отбор клеточных линий на селективной среде, содержащей PFP*

Прежде всего, для отобранных каллусных линий оценивали интенсивность ростовых процессов. Индекс роста исходной каллусной линии составлял в среднем 5,6 отн.ед. Для линий F1 и F3 данный показатель был равен 4,5-4,7 отн.ед. Некоторые каллусные линии отличались значительным замедлением ростовых процессов по сравнению с контрольной. Так, индекс роста линии F2 составлял 2,1-3,1 отн.ед. Была также выделена каллусная линия (F4) с более высоким индексом роста –  $7,0 \pm 0,6$  отн.ед. Кроме того, в

линии F4 было отмечено появление клеток, характеризующихся специфическим окрашиванием. Эти клетки отбирали и субкультивировали в течение нескольких пассажей. При этом достоверных изменений скорости роста данной каллусной линии в течение длительного субкультивирования отмечено не было. Клетки линии F4 сохраняли высокую интенсивность ростовых процессов и после 90 сут. субкультивирования. В то же время, для линий F1-3, отмечено некоторое снижение (в среднем на 10%) скорости роста клеток каллуса при последующих пассажах.

Исследование накопления ФС показало, что в одной из выделенных линий (F1) содержание данных вторичных метаболитов несколько снизилось по сравнению с контролем. Следует отметить, что эта же линия характеризовалась уменьшением интенсивности накопления биомассы (табл. 1). В то же время, отмечено увеличение накопления ФС клетками линий F2 и F3 и, в особенности, линии F4. Как было установлено, в тканях данной каллусной линии сумма ФС возрастала в среднем в 4 раза и сохранялась стабильной в течение 3-х пассажей. В то время как линии F2 и F3 постепенно теряли способность накапливать повышенное количество.

В выделенных каллусных линиях определяли также содержание флавоноидов. В результате было обнаружено, что в линиях F1 и F3 содержание суммы флавоноидов было ниже предела определения, как и в исходной каллусной линии, даже несмотря на увеличение суммы ФС, как в клетках линии F3. В то же время, возможно, существенное снижение скорости ростовых процессов линии F2 приводило к стимуляции накопления флавоноидов. Так, сумма флавоноидов в каллусе линии F2, характеризующейся минимальным индексом роста, составляла  $1,43 \pm 0,11$  мг/г сухой массы. Самым высоким, как и следовало ожидать, оказалось содержание флавоноидов в клетках каллусной линии F4, достигая в среднем величин  $5,56 \pm 0,19$  и  $7,25 \pm 0,12$ , через 30 и 90 сут. субкультивирования после отбора на селективной среде, соответственно. Важно, что в течение 3-х пассажей (90 сут.) клетки каллусной линии F4 не только сохраняли способность к синтезу и накоплению флавоноидов, но и характеризовались повышением уровня содержания этих вторичных метаболитов.

#### *Отбор клеточных линий на селективной среде, содержащей 4MT*

Основной целью данной работы было получение клеточных линий с повышенным содержанием винкамина, основного алкалоида, определяющего фармакологическую ценность растений *Vinca minor* L. В результате для субкультивирования были отобраны несколько МТ-устойчивых мутантных каллусных штаммов. В отобранных каллусных штаммах в течение 3-х пассажей (90 сут) оценивали индекс роста и содержание винкамина. Результаты представлены в таблице 1.

Большинство отобранных каллусных линий характеризовались либо отсутствием изменений индекса роста, либо незначительным снижением интенсивности ростовых процессов по сравнению с первичной каллусной

линией. Только в вариантах V2 и V10 индекс роста был снижен существенно - в среднем до 2,5 отн. ед., а в варианте V12 – увеличился до 7,3±0,6. Содержание винкамина в контрольной, необработанной мутагеном каллусной ткани составляло в среднем 7 мкг/г сухой массы. Значительное увеличение содержания винкамина было отмечено только для 4-х из отобранных линий - V4, V7, V11 V17 (таблица 1). При этом в варианте V17 содержание винкамина в каллусе снижалось в течение 3-х пассажей, в линии V11 – оставалось неизменным, в линиях V4 и V7 – увеличивалось.

Таблица 1 – Индекс роста и содержание винкамина в каллусных линиях *Vinca minor* L. (отбор на устойчивость к 4МТ)

| Линия каллусной культуры | Индекс роста, отн. ед. | Содержание винкамина, мкг/г |                   |
|--------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------|
|                          |                        | 30 сут                      | 90 сут            |
| первичная                | 5,6±0,3                | 7,25±0,11                   |                   |
| V1                       | 4,8±0,2                | 2,45±0,15                   | 1,87±0,49         |
| V2                       | 2,4±0,3                | 8,25±0,08                   | 9,45±0,24         |
| V3                       | 4,5±0,1                | 0,44±0,09                   | 0,37±0,07         |
| V4                       | 4,3±0,1                | <b>17,57±0,84</b>           | <b>21,45±1,02</b> |
| V5                       | 3,7±0,2                | 5,41±0,18                   | 5,16±0,28         |
| V6                       | 3,6±0,5                | –                           | –                 |
| V7                       | 5,0±0,6                | <b>14,57±0,38</b>           | <b>17,45±1,33</b> |
| V8                       | 4,0±0,6                | –                           | –                 |
| V9                       | 3,7±0,2                | 3,28±0,11                   | 2,99±0,34         |
| V10                      | 2,6±0,5                | 1,45±0,23                   | 1,56±0,35         |
| V11                      | 5,3±0,4                | <b>11,75±0,91</b>           | <b>12,17±1,08</b> |
| V12                      | 7,3±0,6                | –                           | –                 |
| V13                      | 4,8±0,2                | 2,39±0,51                   | 2,63±0,43         |
| V14                      | 4,7±0,6                | 0,45±0,09                   | 0,65±0,07         |
| V15                      | 4,6±0,5                | –                           | –                 |
| V16                      | 4,5±0,1                | –                           | –                 |
| V17                      | 4,7±0,9                | <b>18,23±0,62</b>           | <b>12,11±1,58</b> |

“–” – ниже предела определения

Таким образом, мы предположили, что перспективными для дальнейшего субкультивирования являются каллусные линии V4, 7, 11, 17, характеризующиеся достаточно высокими индексом роста и уровнями содержания винкамина.

Одной из причин устойчивости культур к аналогам триптофана может быть сверхпродукция свободного триптофана, повышенный уровень активности ферментов его трансформации в клетках и, таким образом, лучшая детоксификация по сравнению с неустойчивыми клетками [10, 11]. Повышенное содержание винкамина, основного алкалоида барвинка малого, свидетельствует о высоком уровне процессов биосинтеза ТИА в исследуемых каллусных тканях. Одним из ключевых ферментов биосинтеза ТИА является L-триптофан декарбоксилаза (ТДК, ЕС 4.1.1.28) – катализирующая превращение триптофана в триптамин [12]. Триптамин

является протоалкалоидом – основным предшественником ТИА. Во многих работах предполагается, что активность триптофан декарбоксилазы является показателем биосинтетического потенциала клеточных культур. Однако следует отметить, что к настоящему времени очень мало данных по исследованию участия триптофан декарбоксилазы в биосинтезе алкалоидов барвинка малого [13]. Также отсутствуют публикации об использовании химического мутагенеза для повышения биосинтетического потенциала каллусных клеток барвинка малого, активности ТДК и накопления триптамина. В связи с вышесказанным были проведены исследования активности ТДК и содержания эндогенного триптамина в 4МТ-устойчивых мутантных линиях, с повышенным содержанием винкамина. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность ТДК и содержание триптамина в каллусных линиях *Vinca minor* L. (отбор на устойчивость к 4МТ)

| Клеточная культура | Активность ТДК,<br>нмоль триптамина/мг<br>белка/мин |           | Содержание триптамина,<br>мкмоль/г |           |
|--------------------|---|-----------|------------------------------------|-----------|
|                    | 30 сут  | 90 сут    | 30 сут                             | 90 сут    |
| первичная          | 0,83±0,08   |           | 0,65±0,05                          |           |
| Линия V4           | 1,75±0,91   | 2,17±1,08 | 1,88±0,11                          | 1,95±0,17 |
| Линия V7           | 1,25±0,08   | 1,45±0,24 | 0,43±0,11                          | 0,65±0,17 |
| Линия V11          | 4,57±0,84   | 4,45±1,02 | 1,56±0,19                          | 1,25±0,12 |
| Линия V17          | 2,57±0,38   | 2,45±1,33 | 1,55±0,22                          | 1,05±0,13 |

Было установлено, что каллусные линии V4, 7, 11, 17 характеризовались также высокими значениями активности триптофан декарбоксилазы и эндогенного содержания триптамина, основного предшественника ТИА барвинка малого, а также стабильностью ростовых и биосинтетических процессов в течение 3-х пассажей. Индексы роста отобранных линий были сравнимы с показателями каллуса первичной линии. Для линии V7 было характерно 1,5-кратное увеличение активности ТДК и отсутствие увеличения содержания триптамина (табл. 1). В тканях линий V4, 11, 17 отмечено 2-5-кратное увеличение активности ТДК и 2-3 кратное - триптамина по сравнению с каллусной тканью первичной линии (табл. 2).

В результате проведенных исследований были отобраны МТ-устойчивые каллусные линии *Vinca minor* L., характеризующиеся достаточно высокими скоростью роста, уровнями активности ключевого фермента биосинтеза ТИА – триптофандекарбоксилазы и содержанием эндогенного протоалкалоида триптамина, а также накопления винкамина.

Проведенное нами сравнение с первичным каллусом линий-сверхпродуцентов (обработанные мутагеном) на 30-е и 90-е сутки показало увеличение содержания винкамина в 2-3 раза. Стоимость винкамина на мировом рынке составляет около 80 000 дол. США за 1 кг [3]. Таким образом, очевидно, что обработка каллусных культур мутагеном значительно повышает рентабельность препарата.

Приведенные результаты указывают на экологическую целесообразность, социальную направленность и экономическую эффективность развития биофармацевтики.

Работа выполнена при поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант №Б15-087).

### Список литературы

1. Жарашуева Л. М., Бисчекова Ф. Р. Биоэкономика как новое и перспективное направление в экономике // Биоэкономика и экобиополитика. – 2015. – №1. – С. 8-10.
2. Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink // Phytochem. Rev. – 2002. – V. 1. – P. 13–25.
3. Rao, R.S. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites / R.S. Rao, G.A. Ravishankar // Biotechnology Advancement. – 2002. – V. 20. – P. 101-153.
4. Юрин, В.М. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза / В.М. Юрин, Т.И. Дитченко, О.В. Молчан, М.П. Шапчиц, С.Н. Ромашко, Булатова А.А., Логвина А.О. // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2009. – Т. 4, ч. 2. – С.168–182.
5. Молчан О.В., Фатыхова С.А., Шабуня П.С., Юрин В.М. Содержание феруловой кислоты в интродуцированных растениях и каллусных культурах *Vinca minor* L. Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем» – 2015. – Т. 10, часть 1. – С 203-208.
6. Penna S., Vitthal S.B., Yadal P.V. In vitro mutagenesis and selection in plant tissue Cultures and their prospects for crop improvement // Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability (Special Issue I)– 2012.- V6.- P. 6-14.
7. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1968. – Vol. 15, №13. – P. 473-497.
8. Pollard J.W., Walker J.M. Methods in molecular biology. V. 6. Plant cell and tissue culture. – New Jersey: Humana Press/ - 1990. – 597 p
9. Молчан О.В. Получение мутантных каллусных линий *Vinca minor* L. с повышенными уровнями активности триптофандекарбоксилазы и содержания триптамина / О.В. Молчан, В.М. Юрин // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2016. – Т. 11, ч. 2. – С.148–155.

10. Maliga, P. (1980) Isolation, characterization and utilization of mutant cell lines in higher plants. *Infernfl. Rev. Cytol. supp.* 11 A, 225-250.)
11. Berlin J., Mollenschott C., Sasse F., Witte L., Piehl G., Buntemeyer H. Restoration of serotonin biosynthesis in cell suspension cultures of *Peganum harmala* by selection for 4-methyltryptophan-tolerant cell lines. – 1987. – *J. Plant Physiol.* – V. 131.- P. 225-236.
15. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering application / P.J. Facchini [et al.] // *Phytochemistry.* – 2000. – Vol. 54. – P. 121–138.
16. Molchan, O. L-tryptophan decarboxylase activity and tryptamine accumulation in callus cultures of *Vinca minor* L. / O. Molchan, S. Romashko, V. Yurin // *Plant Cell and Tissue Organ Cultures.* – 2012. – Vol. 108. – P. 535–539.

## ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ ОВЕЧЬИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ $\alpha$ - И $\gamma$ -ИНТЕРФЕРОНОВ

Острикова К.В., Потапович М.И.

Белорусский Государственный Университет, г. Минск, kristiost@mail.ru

*Целью данного исследования является получение субстанций овечьих  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферонов. В результате выполнения работы получены высокоэффективные штаммы-продуценты соответствующих белков, а также очищенные белки, которые обладают высокой удельной активностью.*

**Введение.** Мелкий рогатый скот (МРС) подсемейство ко́зьи (лат. *Caprinae*), – отрасль мирового продуктивного скотоводства, которая дает в больших объемах сырьё для легкой промышленности. По численности сельскохозяйственных животных мелкий рогатый скот занимает одно из ведущих мест. Однако на необходимое расширение отрасли влияют многие отрицательные факторы и, в первую очередь, разнообразные причинные стрессовые состояния, приводящие к иммунодефицитам, а также постоянно растущий и развивающийся инфекционный фон, обусловленный вирусными факторами [1].

Несмотря на регулярно проводимые противозооотические мероприятия, количество новых инфекционных болезней животных в мире постоянно растет. Во всех странах они являются серьезной социально-экономической проблемой. Экономический ущерб от инфекционных заболеваний МРС складывается из падежа, снижения продуктивности животных вследствие их заболевания; недополучения приплода из-за переболевания и бесплодия животных, а также затрат на проведение специальных ветеринарных мероприятий [1,2]. К числу наиболее опасных заболеваний относится чума мелкого рогатого скота, анаплазмоз, ящур, блютанг и др. [2].

Причинами появления болезней являются иммунодефицитные состояния, бактериальные, вирусные и смешанные инфекции. Для лечения заболеваний бактериальной этиологии используются антибиотики, в то время как эффективных противовирусных лечебных ветеринарных препаратов и средств иммунопрофилактики практически не существует. В этом плане большие надежды связаны с ветпрепаратами на основе рекомбинантных интерферонов.

Интерфероны представляют собой большое семейство многофункциональных секретируемых белков животных, участвующих в противовирусной защите, регуляции роста клеток и иммунного ответа. Интерфероны обладают относительной видоспецифичностью, т.е. интерферон человека менее активен для животных и наоборот, в то же время у близкородственных животных многие белки близки по структуре и взаимозаменяемы по функциональной активности [3,4]. К таким взаимозаменяемым белкам можно отнести овечий и козий интерфероны.  $\alpha$ -интерфероны этих видов различаются всего 13-ю а.о., а  $\gamma$ -интерфероны – 11-ю.

Для создания противовирусного иммуномодулирующего биопрепарата для МРС на основе рекомбинантных интерферонов наиболее эффективным представляется использование не индивидуальные белки, а смеси овечьего интерферона- $\alpha$ , обладающего противовирусной активностью и овечьего интерферона- $\gamma$ , который является регулятором иммунного ответа у животных. Биопрепараты на основе рекомбинантных белков безопасны и их производство является экономически выгодным.

Главным условием промышленного получения рекомбинантных белков в целях конструирования биопрепаратов, является достаточно высокий уровень экспрессии целевого белка в штаммах-продуцентах.

В задачу представляемой разработки входило получение рекомбинантных белков овечьего  $\alpha$ - и  $\gamma$ - интерферонов с целью использования их в качестве действующих веществ в ветеринарных биопрепаратах противовирусного и иммуномодулирующего действия для профилактики и лечения вирусных заболеваний, коррекции иммунодефицитов у мелкого рогатого скота.

В процессе выполнения работы оптимизирован кодонный состав структурной части генов овечьего  $\alpha$ - и  $\gamma$ - интерферона для успешной экспрессии в бактериальных клетках. Сконструированы экспрессирующие рекомбинантные плазмиды и получены высокоэффективные штаммы-продуценты соответствующих белков, с уровнем продукции целевых белков до 40% от общего количества белка клетки.

Подобраны условия для солюбилизации, рефолдинга и очистки овечьих интерферонов до уровня превышающего 95%, подтвержденного методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Определено, что очищенные белки обладают высокой удельной активностью, определенной по отношению к вирусу везикулярного стоматита, достигающей до  $3 \times 10^6$  МЕ/мг для  $\alpha$ - и  $2 \times 10^6$  МЕ/мг  $\gamma$ -рекомбинантного интерферона

Таким образом, получены субстанции овечьих  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферонов, которые необходимы для создания препаративной формы комплексного биопрепарата для профилактики и лечения иммунодефицитных состояний и заболеваний вирусной или смешанной этиологии мелкого рогатого скота.

#### Список литературы:

1. Данкверт С.А., Халманов А.М., Осадчая О.Ю. Овцеводство стран мира. – Москва. 2011.
2. Дорош, М. Болезни коз и овец: [Электронный ресурс]. 2002-2006 – URL: <http://www.e-reading.ws/>. – Дата доступа: 21.03.2016.
3. Interferons: Characterization and application / A. Meager [et al.]; edited by A. Meager. – WILEY-VCH Verlag, 2006. – 410 p.
4. Sen, C. Viruses and Interferons // Annu.Rev. Microbiol. 2001. Vol. 55. P. 255–282.

### ВИДОСПЕЦИФИЧНОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ *ECHINACEA* MOENCH

Попов Е.Г., Кручонок А.В., Титок В.В.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, [egropoff@gmail.com](mailto:egropoff@gmail.com)

*В настоящей работе ВЭЖХ-анализ адаптирован и применен для измерения в листьях 10 образцов *Echinacea* ssp. содержания фенольных кислот и некоторых их производных по которым определены видоспецифические различия. Результаты исследования подтверждают, что метод может быть использован для оценки качества растительного сырья с определением оптимальных сроков заготовки, а также и для целей хемосистематики.*

**Введение.** Эффективность применяемых современной медициной для стимулирования иммунитета растительных препаратов обусловлена наличием в них БАВ (биологически активных веществ) с соответствующими спектрами действия (антирадикальное, противовирусное, фагоцитостимулирующее). Среди таковых назовем метаболиты кофейной кислоты – оксикоричные (полифенольные) кислоты и их производные по которым оценивается качество фитосырья: кафтаровая кислота, хлорогеновая кислота, цинарин, эхинакозид, цикориевая кислота), а также гликопротеиды, полисахариды, алкаамиды и др. Эти вещества обладают антиоксидантным и детоксикационным действием, в том числе помогают выводить из организма

ионы тяжелых металлов [1-3]. Для получения вышеупомянутых препаратов используются интродуцированные в Евразию из Северной Америки и хорошо изученные виды декоративно-медоносных растений рода *Эхинацея* (*Echinacea* Moench) – *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *E. pallida* (Nutt.) Nutt, *E. angustifolia* DC [2, 4-6]. Однако появившиеся недавно сорта культивируются исключительно как декоративные растения. Поэтому представляют интерес исследования наличия в них уникальных сочетаний БАВ и возможностей их применения. **Целью** нашей работы является оценка содержания фенольных кислот и их производных в листьях природных видов и новых гибридов *Echinacea ssp.*

**Материалы и методы исследования.** Исследование проведено на растениях рода *Echinacea* (Moench) семейства *Compositae*: 3 вида *Echinacea* (*E. purpurea*, *E. paradoxa*, *E. angustifolia* Moench), 4 сорта *E. purpurea* ‘Green Jewel’, ‘Green Envy’, ‘Secret Romance’ и ‘Элегия’ селекции ЦБС, а и 2 межвидовых гибрида *E. × hybrida* – ‘Leilani’ и ‘Hot Papaya’ (таблица 1, рисунок 1). В исследовании использовали листья, отобранные в августе, в фазе цветения ВВСН 56-67) [7], в период максимального накопления растениями БАВ.

Таблица 1 – Анализируемые виды и сорта (гибриды) рода *Echinacea* Moench.

| №№<br>пп | Название образца                           | шифр           | Иформация об образце,<br>plant patent (PP), оригинатор |
|----------|--|----------------|--|
| 1        | <i>E. purpurea</i>                         | Е <sub>0</sub> | природный (дикий) вид                                  |
| 2        | <i>E. angustifolia</i>                     | Е <sub>8</sub> | природный (дикий) вид                                  |
| 3        | <i>E. paradoxa</i>                         | Е <sub>4</sub> | природный (дикий) вид                                  |
| 4        | <i>E. purpurea</i> ‘Элегия’                | Е <sub>9</sub> | селекция ЦБС   |
| 5        | <i>E. purpurea</i> ‘Green Jewel’           | Е <sub>2</sub> | USA PP18678, Piet Oudolf                               |
| 6        | <i>E. purpurea</i> ‘Green Envy’            | Е <sub>5</sub> | USA PP17172, Mark Veeder                               |
| 7        | <i>E. purpurea</i> ‘Secret Romance’        | Е <sub>7</sub> | USA PP23036, Terra Nova                                |
| 8        | <i>E. × hybrida</i> ‘Hot Papaya’           | Е <sub>1</sub> | USA PP21022, Arie Blom                                 |
| 9        | <i>E. × hybrida</i> ‘Leilani’              | Е <sub>6</sub> | USA PP23526, Terra Nova                                |
| 10       | <i>E. × hybrida</i> ‘Strawberry Shortcake’ | Е <sub>3</sub> | USA PP23020, Terra Nova                                |

При выборе метода пробоподготовки сырья и получения экстрактов для анализа наличия целевых компонентов мы руководствовались ГОСТ Р 4.1.1672-03 [8]. Листья высушивали при t 30°C и экстрагировали 70 %-ным этанолом (30 % H<sub>2</sub>O) при соотношении сырье/экстрагент = 1:50; экстракцию осуществляю при t 4°C в течение 10 сут.); экстракт переносили в стеклянную герметичную тару и хранили в темноте при t 0-4°C. Анализ компонентов экстрактов с использованием для идентификации маркеров фенольных кислот и их производных (*trans*-изомеры) проводили на хроматографе Аджилент-1260 с колонкой Zorbax Eclipse Plus C18. Предварительно экстракты центрифугировали (15000 g, 3 мин, t 20°C) и пропускали через фильтры PTFE (Agilent, ФРГ) с диаметром пор 0,2 мкм, затем вносили в виалы, откуда отбор в прибор проводился автосэмплером.

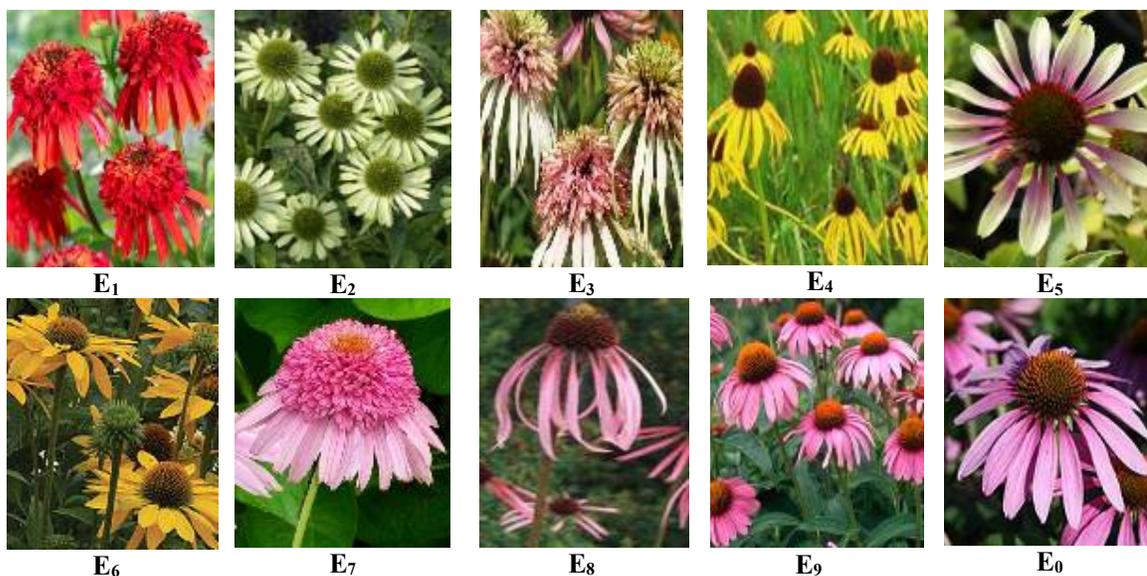


Рисунок 1 – Анализируемые виды и сорта рода *Echinacea* Moench

Хроматографию (рисунки 2, 3) осуществляли в градиентном режиме согласно методике [4] с регистрацией субстанций DAD G4212B (Agilent, США) в milli Absorbance Units [mAU].

**Результаты и их обсуждение.** В исследовании выявили характерные видовые и сортовые различия *Echinacea ssp.* в количественном распределении детектируемых биоактивных компонентов (таблица 2).

Некоторые компоненты (бензойная, кофейная кислоты) являются универсальными метаболитами. Другие же представляют особый интерес. Например, резвератрол – в малых дозах действует как антиканцероген; феруловая, хлорогеновая и др. кислоты – оказывают гепатопротекторное, гипогликемическое действие, снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний; олеаноловая кислота – проявляет геронтопротекторное, противовоспалительное, ранозаживляющее действие, снижает артериальное давление, тонизирует нервную систему, восстанавливает сердечный ритм, нормализует уровень холестерина [9].

Анализ результатов (таблица 2) дает следующий порядок распределения образцов  $E_i$  по содержанию компонентов – аскорбиновая

кислота:  $E_6 \geq E_4 > E_3 \geq E_5 > E_8 = E_9 \geq E_0 \geq E_7 \geq E_1 \geq E_2$ ;  
кафтаровая:  $E_8 \geq E_0 \geq E_5 \geq E_9 > E_1 \geq E_6 \geq E_7 > E_2 > E_3 > E_4$ ;  
коричная:  $E_9 \geq E_3 \geq E_0 \geq E_6 \geq E_1 \geq E_7 \geq E_8 = E_2 \geq E_5 \geq E_4$ ;  
кофейная:  $E_3 > E_4 \geq E_8 > E_2 \geq E_1 > E_9 = E_0 = E_7 = E_6 = E_5$ ;  
олеаноловая:  $E_9 > E_4 = E_7 \geq E_3 \geq E_6 \geq E_5 \geq E_8 \geq E_1 = E_0 \geq E_2$ ;  
салициловая:  $E_2 > E_0 \geq E_6 = E_9 > E_4 = E_3 \geq E_8 > E_5 > E_7 = E_1$ ;  
синапиновая:  $E_6 > E_2 > E_7 = E_8 > E_9 \geq E_0 \geq E_1 = E_3 \geq E_5 > E_4$ ;  
феруловая:  $E_1 \geq E_7 \geq E_2 > E_9 \geq E_0 = E_5 > E_6 \geq E_8 \geq E_3 > E_4$ ;  
хлорогеновая:  $E_4 > E_9 > E_0 \geq E_8 \geq E_5 > E_6 \geq E_3 > E_1 > E_2 > E_7$ ;

цикориевая:  $E_3 > E_9 = E_0 > E_1 \geq E_7 > E_8 \geq E_6 > E_5 > E_4 = E_2$ ;  
резвератрол:  $E_4 > E_3 > E_6 \geq E_5 \geq E_0 \geq E_9 \geq E_2 > E_8 = E_7 = E_1$ ;  
цимарин:  $E_6 > E_0 > E_4 > E_2 > E_9 = E_8 = E_7 = E_5 = E_3 = E_1$ ;  
эхинакозид:  $E_3 > E_5 \geq E_4 > E_2 > E_9 = E_0 = E_8 = E_7 = E_6 = E_1$ .

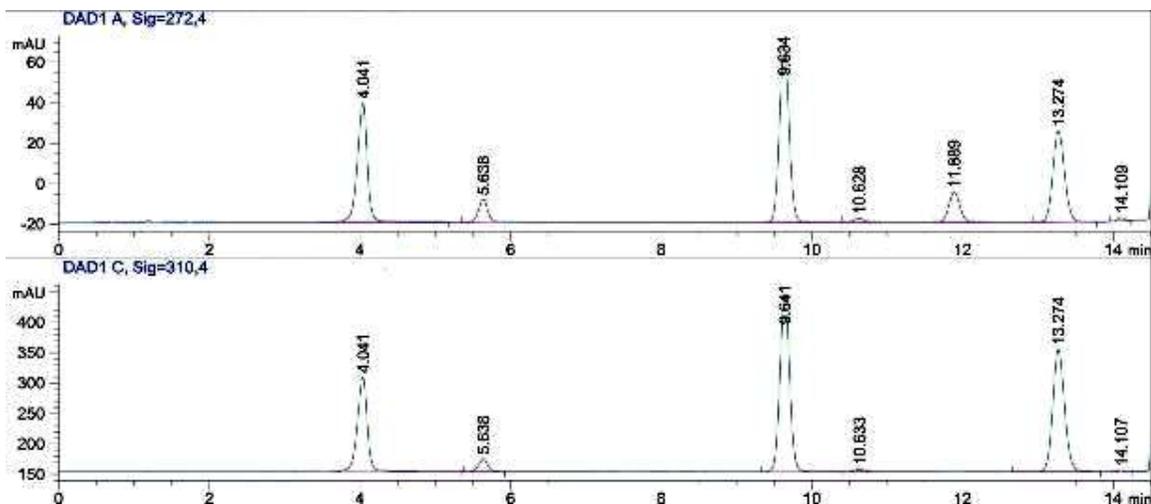


Рисунок 2 – Типичная хроматограмма маркеров определяемых компонентов.

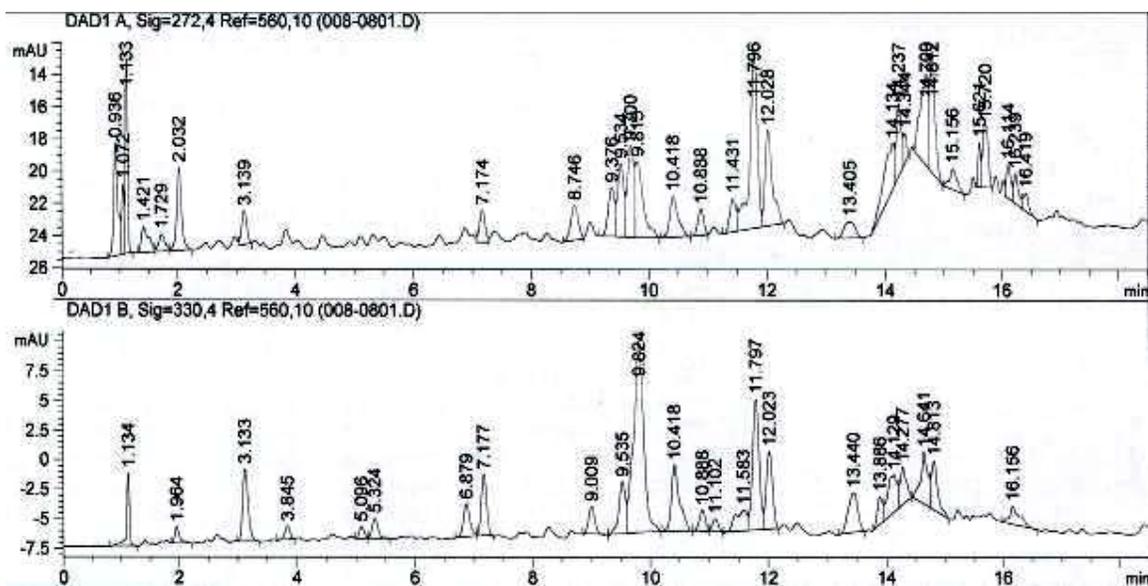


Рисунок 3 – Типичная хроматограмма экстракта листьев *Echinacea* L.  
(на примере пробы *Echinacea* × *hybrida* ‘Strawberry Shortcake’ [E<sub>3</sub>])

**Заключение.** Впервые в Беларуси получены данные по содержанию БАВ в листьях декоративных сортов эхинацеи. Стоит отметить отличие от других и в сравнении с E<sub>0</sub> сорта селекции ЦБС ‘Элегия’ (E<sub>9</sub>), отбор которого целенаправленно вели как на декоративные, так и на лекарственные свойства. Заслуживает внимания состав БАВ нового для Беларуси вида *E. paradoxa*, которая не используется как лекарственное растение, но является донором желтой окраски лигульных цветков новых селекционных форм. Определены новые для рода *Echinacea* ценные БАВ – резвератрол и олеаноловая кислота.

Таблица 2 – Результаты ВЭЖХ-анализов листьев 10 образцов *Echinacea ssp.* на содержание компонентов и показателей качества\* данного растительного материала, %.

| Определяемый компонент | $t_R$ , #<br>мин | Образцы <i>Echinacea ssp.</i> (E <sub>i</sub> ) |                |                |                |                |                |                |                |                |                |
|------------------------|------------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                        |                  | E <sub>0</sub>                                  | E <sub>1</sub> | E <sub>2</sub> | E <sub>3</sub> | E <sub>4</sub> | E <sub>5</sub> | E <sub>6</sub> | E <sub>7</sub> | E <sub>8</sub> | E <sub>9</sub> |
| Аскорбиновая к-та      | 1,2-1,3          | 0,7-4,2   | 0,3-2,5        | 0,1-1,3        | 2,4-6,7        | 5,8-7,3        | 0,9-6,5        | 1,4-10,9       | 0,4-4,3        | 0,6-5,0        | 0,8-4,7        |
| Кафтаровая к-та*       | 3,1-3,6          | 24,6-24,8                                       | 16,5-19,1      | 12,4-12,9      | 3,4-4,8        | 0,7-1,0        | 21,2-26,8      | 13,6-17,5      | 13,5-15,8      | 26,3-30,6      | 22,4-24,1      |
| Хлорогеновая к-та*     | 3,9-4,4          | 2,6-2,8   | 0,5-0,8        | 0,1-0,3        | 1,4-1,5        | 5,7-14,6       | 2,0-2,2        | 1,6-1,7        | ND*            | 1,8-2,9        | 3,4-3,6        |
| Синапиновая к-та       | 5,3-5,4          | 1,4-2,0   | 1,5-1,7        | 4,7-4,9        | 1,5-1,6        | ND*            | 1,3-1,4        | 6,9-9,2        | 2,9-3,8        | 2,8-3,9        | 1,7-2,0        |
| Цинарин*               | 6,3-6,5          | 1,2-1,3   | ND*            | 0,6-0,7        | ND*            | 0,8-0,9        | ND*            | 1,9-2,5        | ND*            | ND*            | ND*            |
| Эхинакозид*            | 6,7-6,8          | ND*   | ND*            | 0,1-0,2        | 2,8-7,5        | 0,9-1,7        | 1,4-1,5        | ND*            | ND*            | ND*            | ND*            |
| Кофейная к-та          | 7,2-7,9          | —**   | 0,4-0,5        | 0,5-0,6        | 2,4-4,5        | 1,9-2,2        | —**            | —**            | —**            | 0,8-2,9        | —**            |
| Феруловая к-та         | 9,5-9,9          | 45,6-51,1                                       | 58,9-68,4      | 54,4-57,7      | 14,8-30,9      | 4,8-8,2        | 44,7-50,8      | 28,4-43,4      | 56,7-70,3      | 28,6-32,8      | 48,4-53,2      |
| Бензойная к-та         | 10,0-10,2        | —**   | —**            | 1,9-2,3        | 2,2-2,9        | 4,0-4,6        | 0,8-2,2        | 1,3-1,4        | —**            | —**            | —**            |
| Цикориевая к-та*       | 10,3-10,5        | 3,1-3,6   | 1,9-2,4        | ND*            | 4,4-6,6        | ND*            | 1,1-1,2        | 1,4-1,5        | 1,6-2,4        | 1,3-1,8        | 3,1-3,7        |
| Салициловая к-та       | 13,1-13,6        | 5,3-6,0   | 1,3-1,4        | 11,1-12,2      | 3,2-5,1        | 4,3-4,4        | 2,2-2,9        | 5,4-5,5        | 1,3-1,4        | 3,4-3,6        | 5,0-5,5        |
| Резвератрол            | 14,1-14,4        | 0,6-0,7   | ND*            | 0,5-0,6        | 2,0-2,4        | 7,3-16,1       | 0,8-0,9        | 0,9-1,0        | ND*            | ND*            | 0,6-0,7        |
| Коричная к-та          | 14,6-14,9        | 3,5-14,7  | 4,9-5,8        | 3,3-5,4        | 8,3-12,6       | 1,9-4,6        | 2,4-5,1        | 6,4-7,9        | 4,2-5,5        | 3,7-5,2        | 4,7-16,9       |
| Олеаноловая к-та       | 15,0-15,6        | 0,3-2,1   | 0,3-2,6        | 0,4-1,4        | 1,4-2,7        | 1,0-3,5        | 0,4-3,5        | 0,7-3,3        | 0,7-3,7        | 1,7-1,8        | 3,3-3,4        |

#Время удерживания компонента (Retention time) при хроматографировании; \*ND – не обнаружили; \*\*не определяли.

\*Компоненты, по содержанию которых определяется качество фитосырья *Echinacea ssp.* [2-6].

Результаты ВЭЖХ подтверждают факт преимущественной аккумуляции такого важного компонента БАВ эхинацеи как эхинокозид в соцветиях [2, 4, 6], а не в листьях, что говорит в пользу сбора на лекарственное сырье всей надземной массы. Апробированный метод ВЭЖХ может быть использован в оценке качества фитосырья по детекции требуемых веществ и в определении оптимальных сроков заготовки, а также для целей хемосистематики.

### Список литературы

1. Лекарь, А.В. Экстракция кафтаровой и цикориевой кислот из эхинацеи пурпурной в среде субкритической воды / А.В. Лекарь [и др.] // Сверхкритические флюиды: теория и практика. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 69–79.
2. Barnes, J. *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties / Barnes J., Anderson L.A., Gibbons S., Phillipson J.D. // J. Pharm. Pharmacol. – 2005. – Vol. 57, № 8. – P. 929–954.
3. Моисеев, Д.В. Определение фенольных кислот в растениях методом ВЭЖХ / Моисеев Д.В. // Химия растит. сырья. – 2014. – Т. 16, № 3. – С. 171–174.
4. Brown, P.N. Determination of major phenolic compounds in *Echinacea spp.* raw materials and finished products by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation matrix extension / Brown P.N., Chan M., Paley L., Betz J.M. // J. AOAC Int. – 2011. – Vol. 95, № 5. – P. 1400–1410.
5. Соколов, С.Я. Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей / Соколов С.Я. – М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – 967 с.
6. Brown, P.N. Determination of phenolic constituents in *Echinacea* raw materials and dietary supplements by HPLC-UV: collaborative study / Brown P.N., Mudge E.M., Paley L. // J. AOAC Int. – 2016 – Vol. 99, № 5. – P. 1197–1203.
7. Meier, U. Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen : BBCH Monografie / Meier U. – Berlin : Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft, 2001. – 165 p.
8. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора МЗ России, 2004. – 400 с.
9. Кухарева, Л.В. Геронтопротекторные вещества иссопа лекарственного (*Hyssopus officinalis* L.) и многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* Fisch. et Mey) / Л.В. Кухарева, Е.Г. Попов, Т.В. Гиль, А.Д. Луу, Х.В. Буи, Б.Х. Нинь, Н.Б.Ту, В.В. Титок // Вестник Фонда фундамент. исследований. – 2016. – № 4. – С. 21–31.

# ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВЛИЯНИЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ СТИМУЛЯЦИИ СЕМЯН КУКУРУЗЫ ЭМП СВЧ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА

Пушкина Н.В., Максимов С.И., Карпович В.А.  
НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск,  
nadyapushkina@gmail.com

**Введение.** Исследование механизмов регуляции роста и развития растений одна из важнейших задач физиологии растений, направленная на разработку новых способов предпосевной стимуляции семенного материала для получения гарантированно высоких урожаев. Растительный организм представляет собой сложную саморегулирующуюся систему, все компоненты которой взаимосвязаны и взаимозависимы, а сигнальная система позволяет удерживать параметры гомеостаза в контролируемых пределах [1]. Переходы от одной стадии развития растения к другой сопровождаются биохимическими изменениями в составе и содержании промежуточных метаболитов, которые могут существенно меняться под действием электромагнитного поля [2]. Известны методы предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур ионизирующим излучением и различными видами тепловых воздействий, вызывающие стимулирующие эффекты ростовых параметров [3, 4]. Нами предложен метод низкоэнергетического предпосевого воздействия ЭМП СВЧ, стимулирующий ростовые параметры растений кукурузы: увеличение динамики прорастания, длины корней и проростков на начальных этапах развития растений [5]. Однако до сих пор не ясен механизм стимулирующего действия ЭМП СВЧ с растительными объектами.

В связи с этим, целью данной работы является разработка феноменологической модели, в которой бы все регуляторные уровни были увязаны в единую функциональную систему. На основании анализа литературы [3, 4, 6, 7] и собственных данных [5, 8, 9] нами была сформулирована феноменологическая модель влияния предпосевной стимуляции семян ЭМП СВЧ на начальных этапах онтогенеза.

Основные экспериментальные факты, лежащие в основе модели.

1. Предпосевная обработка семян кукурузы резонансной частотой 64-66 ГГц существенно стимулирует ростовые процессы (длину корней и проростков) на начальных этапах развития растений [5].

2. Низкоэнергетическое, кратковременное ЭМП СВЧ может вызывать физиологическую реакцию в семенах кукурузы, индуцируя избыточную активацию метаболизма, которая повышает общие адаптивные механизмы растительного организма и способствует его преадаптации к другим возможным стрессовым воздействиям [8].

3. Предпосевная обработка семян кукурузы ЭМП СВЧ вызывает реакцию, которая стимулирует накопление биомедиаторов липоидной природы, что выражается в увеличении длины корней и проростков [8].

Феноменологическая модель влияния предпосевной стимуляции семян кукурузы ЭМП СВЧ на начальных этапах онтогенеза

Феноменологическая модель стимулирующего эффекта действия предпосевной ЭМП СВЧ обработки семян кукурузы описывается известным логистическим уравнением (1) и соответствует графику распределения функции (рисунок 1), который отражает изменение количества проросших семян от времени:

(1)

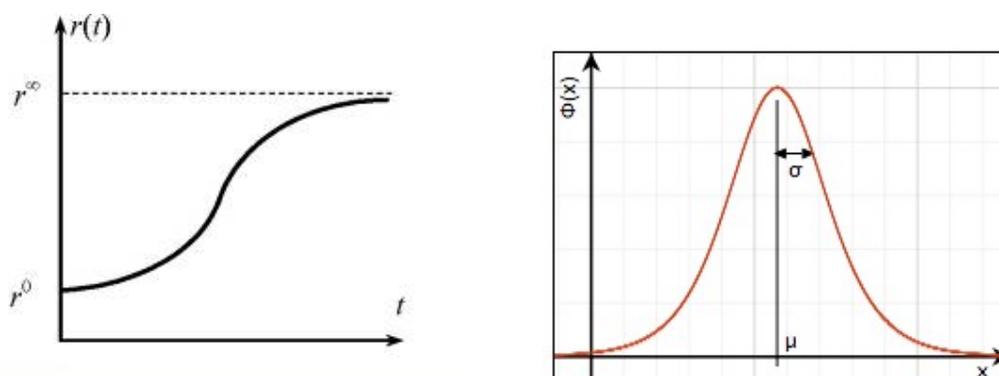


Рисунок 1 – Логистическая кривая (А) и функция распределения (Б)

По результатам динамики прорастания семян, полученных в лабораторных опытах, построены логистические функции (Рисунок 2) и методом нелинейной аппроксимации определены их параметры (Таблица 1). Зависимость параметров от режима предпосевной обработки показывает, что данные эквиваленты логистической функции распределения скорости роста (рисунок 2 Б), которая селективна к выбору частот электромагнитного поля и зависит от времени предпосевого ЭМП СВЧ воздействия на семена кукурузы сорта Дарья.

Таблица 1 – Коэффициенты логистической функции прорастания семян

| Варианты опыта | a     | b     | c    |
|----------------|-------|-------|------|
| Контроль       | 1.227 | 0.708 | 4.18 |
| Режим 1        | 0.969 | 1.379 | 2.8  |
| Режим 2        | 0.979 | 1.427 | 2.79 |
| Режим 3        | 0.956 | 1.464 | 2.7  |

В зависимости от режима предпосевной ЭМП СВЧ обработки семян кукурузы сорта Дарья распределение скоростей прорастания характеризуется уменьшением разброса (дисперсии), это является свидетельством увеличения

не только динамики их прорастания, но и однородности семенного материала по скорости появления проростков.

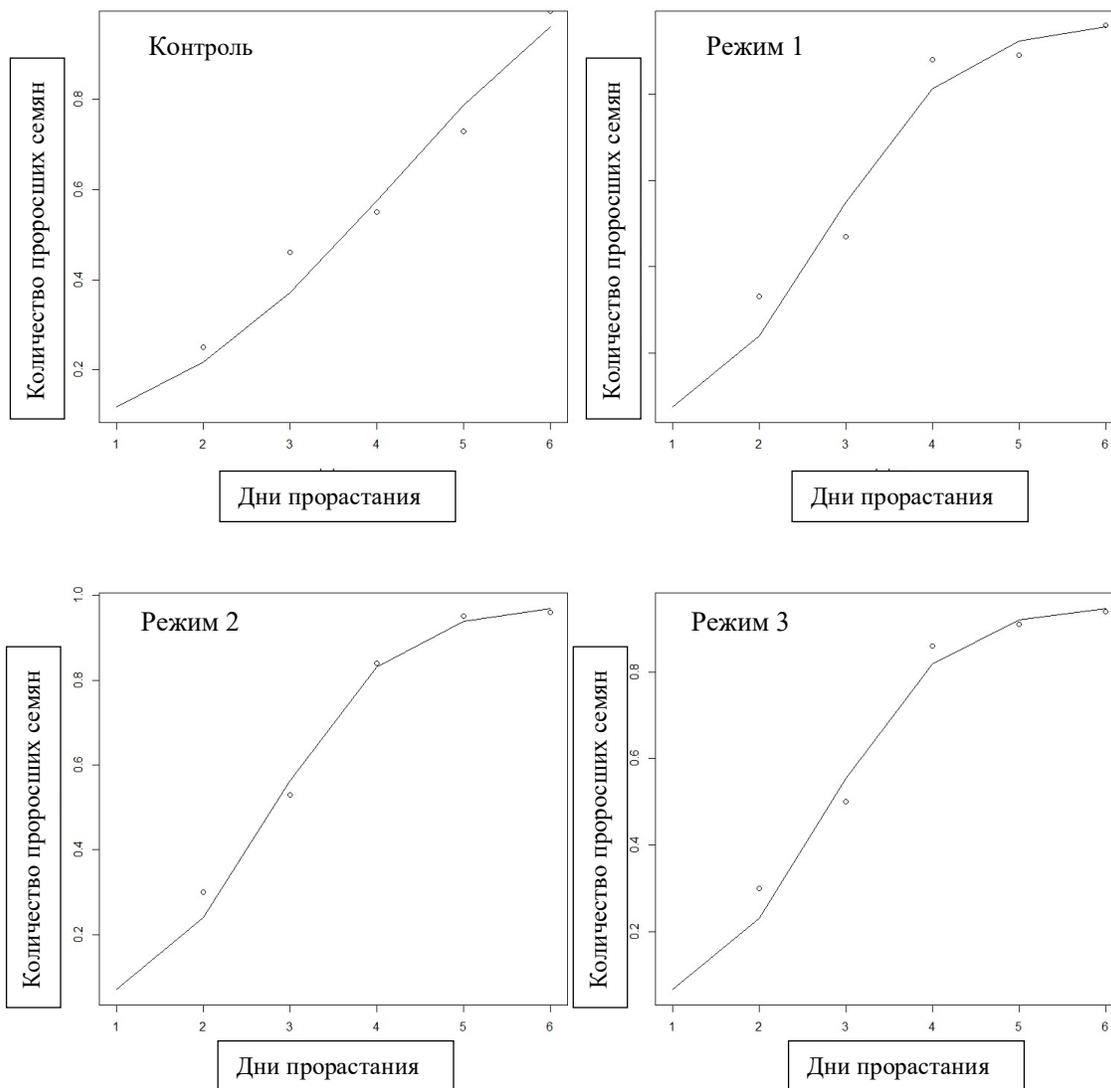


Рисунок 2 – Логистические функции динамики прорастания семян кукурузы сорта Дарья после предпосевной ЭМП СВЧ обработки семян (Режим 1 – частота 64-66 Гц, время 8 мин; Режим 2 – частота 64-66 Гц, время 12 мин; Режим 3 – частота 64-66 Гц, время 20 мин)

Зависимость разброса скорости прорастания от режима предпосевной обработки ЭМП СВЧ представлена на рисунке и формулами (2-5).

Контроль 
$$y = 1.227 / (1 + \exp(-0.708(x - 4.18))) \quad (2)$$

Режим 1 (частота 64-66 Гц, 8 мин) 
$$y = 0.969 / (1 + \exp(-1.379(x - 2.8))) \quad (3)$$

Режим 2 (частота 64-66 Гц, 12 мин) 
$$y = 0.979 / (1 + \exp(-1.427(x - 2.79))) \quad (4)$$

Режим (частота 64-66 Гц, 20 мин)  $y = 0.956 / (1 + \exp(-0.708(x - 2.7)))$  (5)

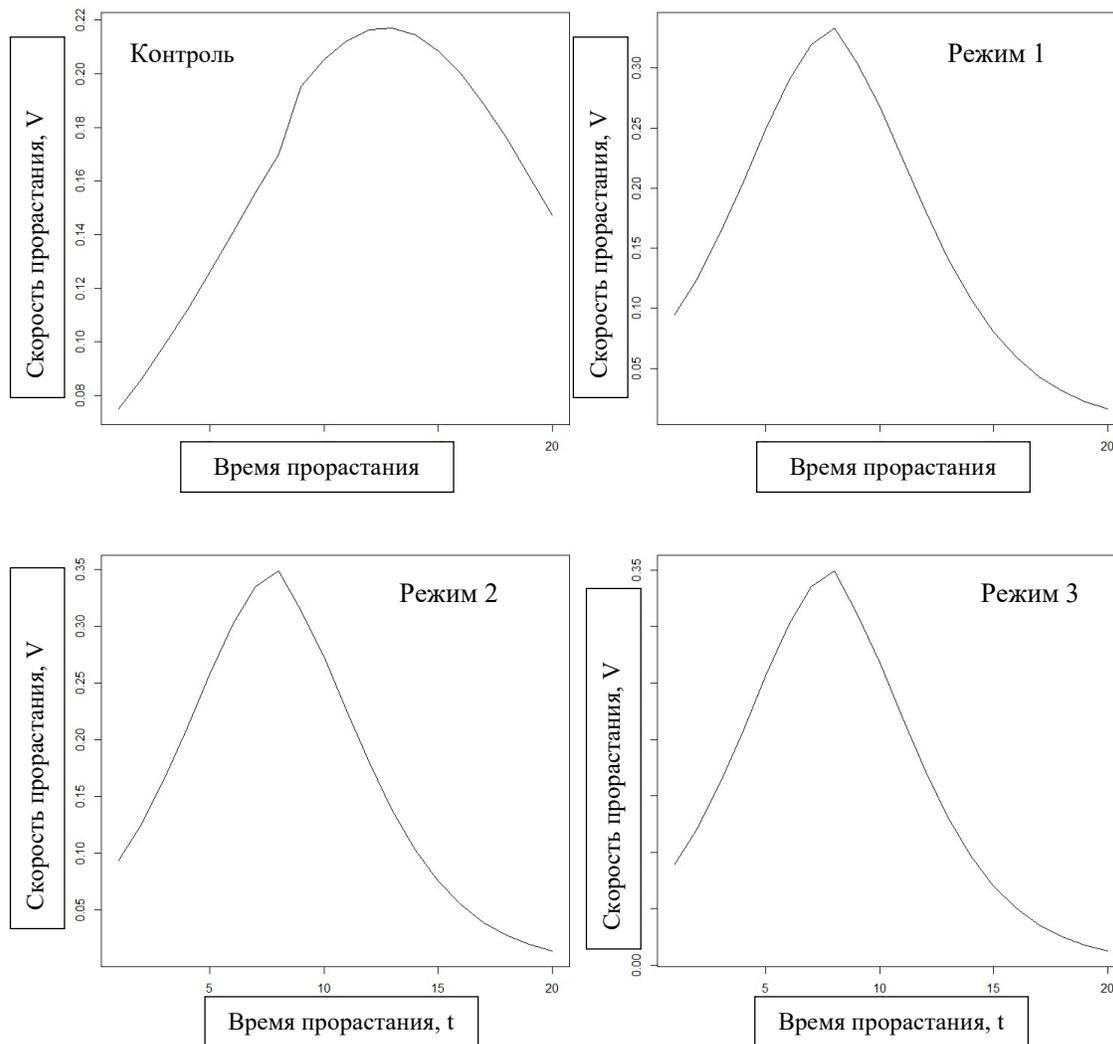


Рисунок 3 – Зависимость разброса скорости прорастания от режима предпосевной обработки ЭМП СВЧ  
(Режим 1 – частота 64-66 Гц, время 8 мин; Режим 2 – частота 64-66 Гц, время 12 мин; Режим 2 – частота 64-66 Гц, время 20 мин)

Предлагаемая феноменологическая модель влияния предпосевной стимуляции семян ЭМП СВЧ на начальных этапах онтогенеза позволяет объединить разрозненные данные, имеющие отношение к регуляции роста и развития проростков кукурузы в различных физиологических условиях, и объяснить рост корней и проростков в условиях действия стресс-факторов, что открывает перспективы для управления над этими процессами в условиях организма в целом. Показано, существенное увеличение динамики прорастания семян кукурузы после предпосевной ЭМП СВЧ обработки Режимом 2, что характеризуется дружностью прорастания семян.

Надежность вышеописанной фенологической модели подтверждается многократными лабораторными и полевыми экспериментами.

#### Список литературы:

1. Поляков В.Ю., Зацепина О.В., Киреев И.И. и др. Структурно-функциональная модель митотической хромосомы // Биохимия. – 2006. – Т.71, №1. – С.6-16.
2. Racuciu, M. 50 Hz Frequency Magnetic Field Effects on Mitotic Activity in the Maize Root / M.Racuciu // Romanian Journal of Biophysics. – 2011. – Vol.21, No.1. – P. 53-62.
3. Tabatabael, S.A., Ansaris O. Predicting seed germination of safflower (*Carthamustinctorius*) cultivars using hydrottime model / Ceretari Agronomiceim Moldove, Vol. L, No. 1(169). 2017. – P. 79-87/
4. Mesgaran, M.B., Mashhadi, H.R., Alizadeh, H., Hunt, J., Young, K.R., Cousens, R.D. (2013). Importance of distribution function selection for hydrothermal time models of seed germination. *Weed Res.*, 53(2): 89-101.
5. Пушкина Н.В., Карпович В.А. Оптимизация времени и диапазона резонансных частот воздействия на всхожесть растений / Н.В. Пушкина, В.А. Карпович // Труды БГУ. – 2016. – Т 11. , ч.2 . – С. 156-163.
6. Mohammad R., Faezeh Z. Effect of some environmental factors on seed germination of *Eryngium caeruleum* M. Bieb. Populations / Acta Bot. Bras. vol.31 no.2 Belo Horizonte Apr./June 2017
7. Amini V, Zaefarian F, Rezvani M. Interspecific variations in seed germination and seedling emergence of three *Setaria* species. *Brazilian Journal of Botany* 38.2015. – P. 539-545.
8. Пушкина Н.В., Курченко В.П. Влияние резонансных частот на ростовые процессы и их регуляцию в корнях и проростках/ Н.В. Пушкина, В.П. Курченко // Труды БГУ. – 2016 – Т 11. , ч. 2 . – С. 164-183.
9. Пушкина Н.В., Курченко В.П. Влияние резонансных частот на рост, развитие и урожайность в условиях полевых опытов / Н.В. Пушкина, В.П. Курченко // Труды БГУ. – 2016– Т 11. , ч. 2. – С. 184-198.

#### ЭФФЕКТИВНАЯ МИКРОТОМОГРАФИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КУРИНОГО ЭМБРИОНА НА РАННИХ ЭТАПАХ ЭМБРИОГЕНЕЗА И ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДА

Ржепаковский И.В.<sup>1</sup>, Тимченко Л.Д.<sup>1</sup>, Писков С.И.<sup>1</sup>, Аванесян С.С.<sup>1</sup>,  
Сизоненко М.Н.<sup>1</sup>, Привалова К.А.<sup>1</sup>, Арешидзе Д.А.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь,  
78igorr@mail.ru

<sup>2</sup>Московский государственный областной университет, г. Москва

*Развивающийся куриный эмбрион является удобной моделью для доклинических исследований фармакологической безопасности кандидатов*

*лекарственных средств. Особенности его развития позволяют провести полноценную оценку всех развивающихся систем организма под влиянием фармакологических средств. В то же время актуален поиск методологических подходов, которые позволят в короткие сроки при высокой степени достоверности получить наиболее информативный комплекс морфофункциональных критериев развития на одном экспериментальном объекте. В этом смысле, в качестве перспективного, нами рассматривается инновационный способ визуализации внутренних структур - рентгеновская компьютерная микротомография. На мировом уровне, предпринимаются отдельные попытки использовать этот метод для изучения токсического влияния различных факторов на развитие куриного эмбриона. Однако нет четких общепринятых методик использования рентгеновской микротомографии для визуализации изменений рентгенопрозрачных структур развивающегося куриного эмбриона. В этой связи нами доказана высокая эффективность использования спиртового раствора фосфорновольфрамовой кислоты в качестве рентгеноконтрастного вещества при микротомографической визуализации внутренних структур куриного эмбриона на ранних этапах эмбриогенеза.*

**Введение.** В настоящее время в мировой практике произошел методический сдвиг в проведении проверки фармакологической безопасности кандидатов в лекарственные средства на более ранние этапы доклинического исследования, то есть после оценки их физико-химических показателей, это связано с попытками сократить расходы и ускорить переход к клиническим испытаниям [4].

Для раннего скрининга на исследовательском этапе изучения лекарственных средств, выгодно иметь эффективные и недорогие модельные системы, характеризующиеся высокой пропускной способностью, так как чаще всего исследователи на первом этапе получают сразу много вариантов потенциальных препаратов [7].

Развивающийся куриный эмбрион имеет ряд особенностей, которые делают его удобной моделью для доклинических исследований фармакологической безопасности, в которых можно с высокой степенью достоверности протестировать эффекты на все основные системы органов в эмбриогенезе. Он не подвержен влиянию метаболизма материнского организма, экономически доступен, имеет короткий период инкубации, удобный размер, доступен для большого количества методов экспериментальных манипуляций. В успешных попытках использовать куриный эмбрион в качестве модели для доклинических исследований есть пример связанный со знаковым для фармакологической безопасности препаратом талидомидом. Случившаяся в 1960-х гг. прошлого века талидомидная трагедия стала для медицинских работников не только предупреждением, изменившим представление о маточно-плацентарном

барьер, защищающем будущего ребенка от контакта с любым агентом из окружающей среды, но и своеобразным сигналом тревоги, когда почти любое воздействие стало рассматриваться потенциально тератогенным. В связи с тем, что талидомид не оказывает токсического воздействия на грызунов, синтезированные аналоги талидомида, показавшие свою антиангиогенную и противовоспалительную активность, были успешно проверены на тератогенную токсичность на курином эмбрионе [1]. Кроме того результаты фармакологической безопасности кандидатов в лекарственные средства полученные с использованием развивающегося куриного эмбриона хорошо экстраполируются на специфические группы пациентов, такие как беременные женщины и новорожденные. Это увеличивает вероятность того, что препарат преуспееет на более поздних стадиях доклинических исследований, а также будет допущен к клиническим испытаниям в педиатрии [2].

Вышеприведенные факты подтверждают как необходимость поиска новых удобных моделей для оценки фармакологической безопасности кандидатов лекарственных средств, так и перспективы изучения в этом направлении развивающегося цыпленка. Однако важным при этом является использование инновационных инструментальных методов. Любые факторы, в том числе изучаемые кандидаты в лекарственные средства влияющие, так или иначе, на развивающийся эмбрион могут провоцировать морфологические изменения структур органов и тканей, что можно оценивать как тератогенный эффект. В настоящее время бурно развивается и совершенствуется один из самых перспективных и удобных методов 3D визуализации различных структур - метод рентгеновской компьютерной высокоразрешающей микротомографии (микро-КТ). Микро-КТ стала зрелой техникой, которая может дополнять или заменять гистологический анализ во многих исследовательских направлениях, причем основным преимуществом является то, что она не мешает никакому дополнительному исследованию свежей или фиксированной ткани, требует небольшой пробоподготовки и относительно простой обработки данных [5].

Микро-КТ все чаще начинает применяться в вопросах биологии развития и токсикологии с использованием эмбрионов. Так группа ученых из научно-исследовательских лабораторий фирмы Merck (США) продемонстрировала хорошее соответствие между наблюдениями, сделанными после окрашивания эмбрионов крысы и кролика ализариновым красным S и анализом изображения после получения его с помощью микро-КТ, а также обосновала преимущества использования компьютерной микротомографии в токсикологии на эмбрионах кролика и цыпленка [8, 9]. Кроме того британские ученые изучили данный вопрос и дали первичные рекомендации по использованию как МРТ, так и микро-КТ в доклинических исследованиях с использованием эмбрионально-фетальных моделей [3].

Опубликованные работы по доклиническому использованию микро-КТ в настоящее время в основном сосредоточены на визуализации костной системы. Основная причина этого заключается в том, что большинство мягких тканей являются рентгенопрозрачными. Однако контрастные агенты, такие как четырехокись осмия, йодсодержащие соединения и фосфорновольфрамовая кислота (РТА) и т.п. могут использоваться для получения изображений мягкой ткани [5].

В связи с этим является актуальной задача отработки приемов использования доступных рентгеноконтрастных агентов для визуализации органов и тканей развивающегося куриного эмбриона методом микрофотографии.

### **Материалы и методы**

Для проведения исследований были отобраны куриные эмбрионы с 5 по 8 сутки инкубации. Перед контрастированием куриные эмбрионы хранились в забуференном растворе формалина. В соответствии с рекомендациями В.Д. Metscher (2009) их промывали 24 часа под проточной водой и проводили постепенную дегидратацию в растворах этилового спирта (30%, 50%, 70%) в течение 12 часов в каждом. Затем эмбрионы на 24 часа помещались в спиртовой раствор фосфорновольфрамовой кислоты (ЕРТА), который готовили путем растворения 5 г фосфорновольфрамовой кислоты в 200 мл 70% этилового спирта. Для визуализации органов и тканей куриного эмбриона использовали рентгеновский микрофотограф SkyScan 1176 (Bruker, Бельгия). Параметры сканирования: X-ray напряжение 65-80 кВ; X-ray сила тока 300-380 мкА; фильтры - 1 мм Al или Al+Cu; размер пикселя 8,77 мкм; разрешение камеры высокое (4000 пикселей по ширине поля); вращение 360°; шаг вращение - 0,3°; количество проходов - 4. Сканированные объекты реконструировали при помощи программы Nrecon (version 1.7.1.0, Bruker, Belgium), параметры реконструкции: beam hardening - 41; ring reduction - 10. Оценку эффективности контрастирования проводили в программе СТАп (version: 1.13.11.0, Bruker microCT, Belgium), учитывали общую степень визуализации органов. Критерием эффективности визуализации после контрастирования был уровень рентгеновской плотности выражающейся в условных единицах Хаунсфильда (HU). Шкала единиц Хаунсфильда – шкала линейного ослабления излучения по отношению к воде, рентгеновская плотность которой принимается за 0 HU.

### **Результаты**

Анализ эффективности визуализации внутренних структур куриного эмбриона на ранних этапах эмбриогенеза контрастированных ЕРТА показал, что уровень рентгеновской плотности органов, таких как легкие, сердце, печень колеблется от 5000 до 13000 HU на всех исследуемых сутках инкубации, что позволяет четко анализировать отдельные органы эмбриона, в том числе с использованием количественного 2D и 3D анализа (рисунок).

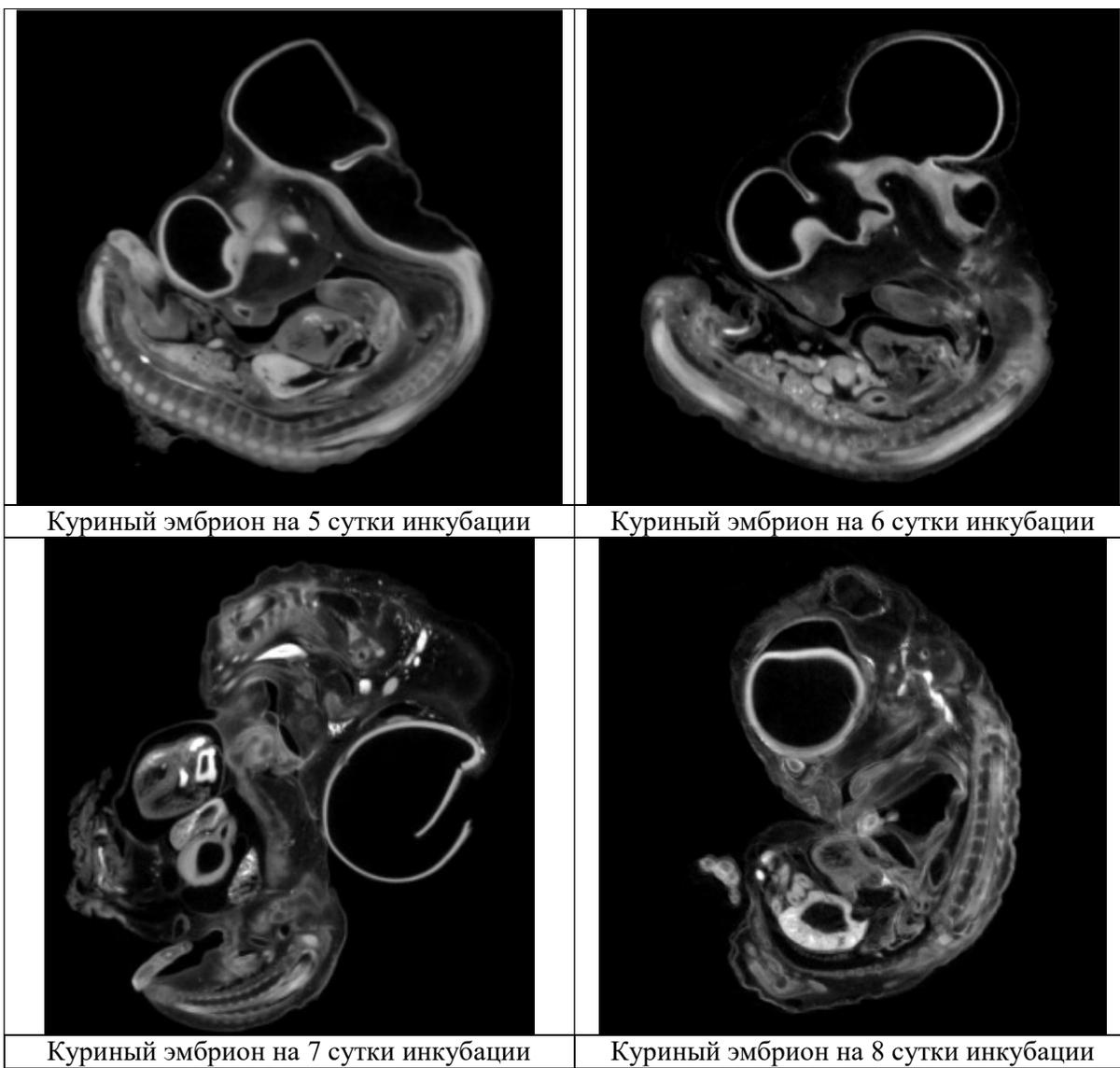


Рисунок – Микротомограммы контрастированных ЕРТА куриных эмбрионов на разных сутках развития

### **Заключение**

Фосфорновольфрамная кислота может успешно использоваться в качестве рентгеноконтрастного агента для микротомографической визуализации органов и тканей куриного эмбриона на ранних этапах эмбриогенеза.

### **Список литературы:**

1. Beedie, Shauna L. Shared mechanism of teratogenicity of anti-angiogenic drugs identified in the chicken embryo model / Shauna L. Beedie, Chris Mahony, Heather M. Walker, Cindy H. Chau, William D. Figg, Neil Vargesson // Scientific Reports (2016) 6:30038, doi:10.1038/srep30038;
2. Bjornstad, Sigrid Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals / Sigrid Bjornstad, Lars Peter

- Engeset Austdal,<sup>1</sup> Borghild Roald, Joel Clinton Glover, and Ragnhild Elisabeth Paulsen // *J Pharmacol Exp Ther* (2015) 355:386–396, doi:10.1124/jpet.115.227025;
3. French, Julian Use of magnetic resonance imaging (MRI) and micro-computed tomography (micro-CT) in the morphological examination of rat and rabbit fetuses from embryo-fetal development studies / Julian French, Neill Gingles, Jane Stewart, Neil Woodhouse // *Reproductive Toxicology* (2010) 30:292-300, doi:10.1016/j.reprotox.2010.04.016;
4. Hamdam, J. Safety pharmacology—current and emerging concepts / J. Hamdam, S. Sethu, T. Smith, A. Alfirevic, M. Alhaidari, J. Atkinson, M. Ayala, H. Box, M. Cross, and A. Delaunois et al. // *Toxicol Appl Pharmacol* (2013) 273:229–241;
5. Holdsworth, David W. Micro-CT in small animal and specimen imaging / David W. Holdsworth, Michael M. Thornton // *Trends in Biotechnology* (2002) Vol. 20 (8):S34-S39, doi:10.1016/S0167-7799(02)02004-8;
5. Metscher, Brian D. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues / Brian D, Metscher // *BMC Physiology* (2009) 9:11, doi:10.1186/1472-6793-9-11
7. Pugsley, M.K. Principles of safety pharmacology / M.K. Pugsley, S. Authier, and M.J. Curtis // *J.Pharmacol* (2008) 154:1382–1399;
8. Wise, L. David Micro-Computed tomographic evaluation of fetal skeletal changes induced by all-trans-retinoic acid in rats and rabbits / L. David Wise, Xue Dahai, Christopher T. Winkelmann // *Birth Defects Research (Part B)* (2010) 89:408–417, doi:10.1002/bdrb.20267;
9. Wise, L. David Micro-computed tomography imaging and analysis in developmental biology and toxicology / L. David Wise, Christopher T. Winkelmann, Belma Dogdas and Ansuman Bagchi // *Birth Defects Research (Part C)* (2013) 99:71–82, doi:10.1002/bdrc.21033.

ГРИБЫ РОДА *GANODERMA* – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Ризевский С.В.<sup>1</sup>, Hoang Ngoc Cuong<sup>2</sup>, Huynh Thanh Tung<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет, Минск

<sup>2</sup> Университет Бинь Зьонг, Тузаумот, Вьетнам

*Проведен анализ летучих компонентов метанольных экстрактов мицелия грибов *Ganoderma lucidum* и *G. applanatum* белорусского и вьетнамского происхождения методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Выявлены индивидуальные тритерпеноиды стероидной природы. Проведен филогенетический анализ грибов *Ganoderma* из ряда стран.*

**Введение.** Грибы рода *Ganoderma* – это трутовые грибы, вызывающие белые гнили лиственных и хвойных пород деревьев [1, 2]. Однако, кроме того они являются продуцентами целого ряда биологически активных

веществ: белков, липидов, полисахаридов, органических кислот, ферментов, витаминов и др. Многие из этих соединений являются фармакологически активными и издревле используются человеком в традиционной медицине. В азиатской медицине наиболее широкое применение имеют плодовые тела гриба *Ganoderma lucidum*, известным как Линг-Чжи на китайском и Рейши на японском языке.

В результате последних исследований было обнаружено, что биологические вещества, выделенные из этих грибов, оказывают иммуностимулирующее, противовоспалительное, противораковое, противовирусное, гепатопротекторное, противоаллергенное, гипогликемическое, а также антиоксидантное действие на организм человека [3].

Разработка новых лекарственных препаратов на основе соединений растительного или грибного происхождения невозможна без детального исследования компонентного состава природного источника. Крайне важным видится оценка качественного и количественного состава биологически активных соединений. Грибы рода *Ganoderma* широко распространены в мире, что делает их доступными к использованию человеком повсеместно. На сегодняшний день известно более 80 видов грибов рода *Ganoderma*, наиболее широкое применение из которых находят виды *G. lucidum* и *G. applanatum* [1].

Целью данной работы было проведение анализа состава экстрактов мицелия грибов *Ganoderma lucidum* и *G. applanatum*, собранных на территории Беларуси и Вьетнама, выявление сходств и различий в составе тритерпеноидных соединений и оценка возможности использования данных грибов как источников биологически активных соединений.

#### **Материалы и методы.**

Объектом исследований служил мицелий грибов *Ganoderma lucidum* (белорусского и вьетнамского происхождения), и *Ganoderma applanatum*. Навеску мицелия гриба измельчали, биологически активные соединения экстрагировали метанолом. Определение качественного и количественного состава экстрактов проводили методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией на системе Agilent 6850 - 5975B с капиллярной колонкой DB-5 MS (5%-дифенил-95%-диметилсилоксан) длиной 60 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0.25 мкм. Газ-носитель – гелий. Относительный состав метаболитов вычисляли по площадям пиков без использования поправочных коэффициентов. Идентификацию веществ проводили путем сравнения масс-спектров с данными библиотеки NIST0.5a.

Для проведения филогенетического анализа грибов рода *Ganoderma* использовали нуклеотидные последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров генов рибосомных РНК загруженные из базы GenBank. Всего проанализировано 37 последовательностей для грибов

*G. applanatum*, *G. colossus*, *G. lobatum*, *G. lucidum*, *G. meredithiae*, *G. oestедii*, *G. oregonense*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum*, *G. tsugae*, *G. valesiacum*, произрастающих в Японии, США, Канаде, Тайване, Франции, Корее, Нидерландах, Аргентине, Великобритании. Множественное выравнивание последовательностей проводили в программе MEGA 4 по алгоритму ClustalW [4]. Филогенетические деревья строили по алгоритму ML в MEGA4. Последовательность *Cytidia salicina* использовали как внешнюю группу. Достоверности топологии дерева определяли методом бутстреппинга для 1000 псевдореплик [5].

### Результаты и обсуждение

Проведенный филогенетический анализ исследуемых грибов рода *Ganoderma* на основе нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров генов рибосомных РНК выявил сходства и различия между грибами азиатского, европейского и американского регионов. При построении дендрограммы грибы сформировали несколько обособленных кластеров, соответствующих родам *G. applanatum*, *G. colossus*, *G. lucidum*, *G. meredithiae*, *G. resinaceum*, *G. tsugae* (рисунок 1).

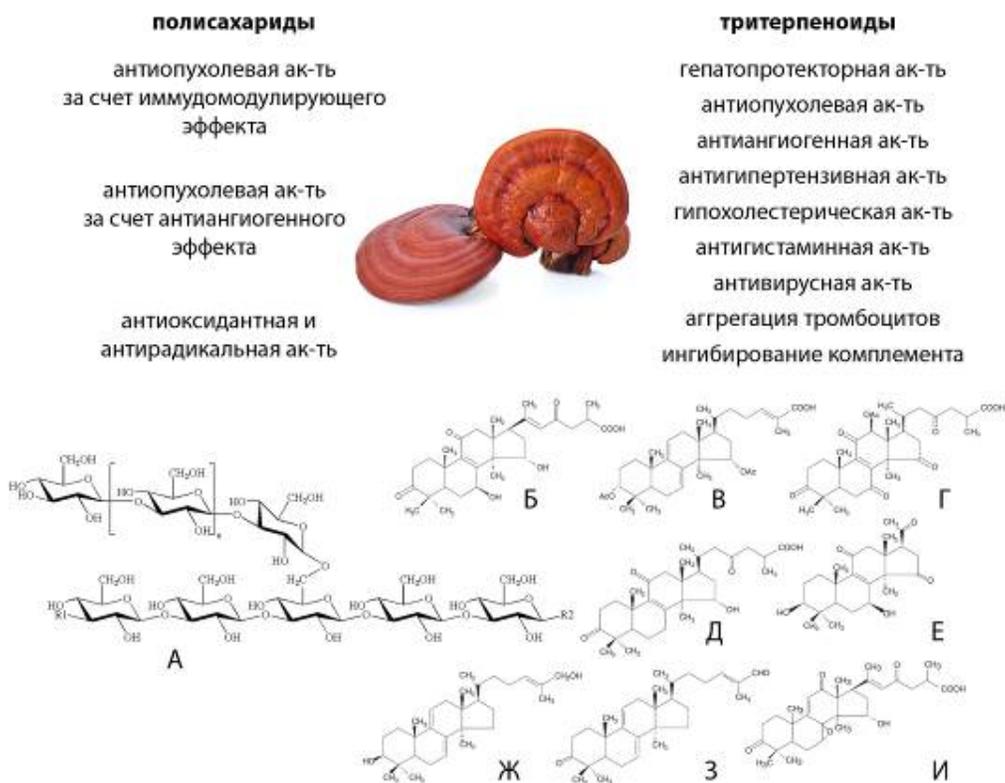


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево грибов рода *Ganoderma*, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров генов рибосомных РНК. Указана приуроченность грибов к хвойному или лиственному субстрату и страна произрастания гриба

Близкое генетическое родство некоторых видов позволяет предположить и сходный состав вторичных метаболитов. В некоторой мере это предположение подтверждается еще и тем, что распределение грибов по кластерам произошло в соответствии с их приуроченностью к лиственным либо хвойным породам дерева.

По химической природе вторичные метаболиты грибов *Ganoderma*, определяющие их высокую биологическую активность, представляют собой полисахариды и тритерпеноиды (рисунок 2).

Рисунок 2 – Основные компоненты мицелия грибов *Ganoderma* и проявляемые ими биологической активности. А -  $\beta$ -1-3-D,  $\beta$ -1-6-D-глюкан; Б - ганодереновая кислота А; В - ганодермовая кислота R; Г - ганодермовая кислота F; Д - ганолуцидовая кислота А; Е - люцидон; Ж - ганодерол В; З - ганодераль А; И - аппланоксидовая кислота А

Полисахариды представлены в основном водорастворимыми  $\beta$ -1-3-D и  $\beta$ -1-6-D глюканами, определяющими антиопухолевую активность экстрактов грибов за счет иммуномодулирующего и антиангиогенного эффекта. Кроме того, полисахариды проявляют антиоксидантную и антирадикальную активности.

Среди тритерпеноидов наиболее важное место занимают вещества стероидной природы. В грибах *Ganoderma* на сегодняшний день идентифицировано более 150 индивидуальных тритерпеноидов, таких как ганодермовая кислота (производное ланостана), люциденовая, ганодермовая,

ганолоцидовая, аппланоксидовая кислоты и другие соединения (рисунок 2). Тритерпеноиды, полученные из грибов *Ganoderma* обладают широчайшим спектром биологических активностей, включая гепатопротекторную, антипухоловую, антигипертензивную, антивирусную и другие [3].

Содержание тритерпеновых соединений сильно варьирует в зависимости от географического места обитания гриба а также его возраста [6, 7].

Проведенный анализ метанольных экстрактов *Ganoderma lucidum*, собранных на территории Беларуси и Вьетнама, а также *Ganoderma applanatum* выявил наличие по меньшей мере семи тритерпеноидов стероидной природы (таблица 1). Их содержание и разнообразие было наибольшим в экстракте из *G. lucidum*, собранным на территории Беларуси. Экстракт гриба *G. applanatum* показал невысокое разнообразие соединений, однако высокое содержание эргостерола.

Таблица 1 – Состав тритерпеновых компонентов грибов *Ganoderma*

| Наименование соединения                               | <i>G. lucidum</i><br>(Фаниполь,<br>Беларусь) | <i>G. lucidum</i><br>(Ханой,<br>Вьетнам) | <i>G. applanatum</i><br>(Фаниполь,<br>Беларусь) |
|---|--|--|---|
| 9(11)-Дегидроэргостерил бензоат                       | 0,11   | -  | -   |
| Эргоста-5,7,9(11),22-тетраен-3-ол, (3 $\beta$ , 22E)  | 0,24   | 0,84                                     | -   |
| Эргостерол  | 7,36   | 7,60                                     | 15,36   |
| Эргоста-7,22-диен-3-ол (3 $\beta$ , 5 $\alpha$ ,22E)- | 0,32   | 8,90                                     | 9,89  |
| Эргоста-5,8-диен-3-ол, (3 $\beta$ )-                  | 0,52   | 0,05                                     | 0,02  |
| $\gamma$ -Эргостенол                                  | 0,21   | 1,48                                     | 3,22  |
| Ланостерол  | 0,33   | -  | -   |

Кроме соединений стероидной структуры в экстрактах выявлено более 50 индивидуальных низкомолекулярных летучих компонентов. Среди них интерес могут представлять гидрокси-1-(гидроксиметил)этиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты, олеиламин, цис-9,10-эпоксиоктадеканамин, 2-монопальмитин, октадеканамид, амид олеиновой кислоты, метиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты, метил ленолеат и другие соединения, участвующие в метаболизме липидов стероидной природы.

### Заключение

В ходе работы проведен анализ летучих компонентов метанольных экстрактов мицелия грибов *Ganoderma lucidum* и *G. applanatum* белорусского и вьетнамского происхождения методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Идентифицированы индивидуальные тритерпеноиды: 9(11)-Дегидроэргостерил бензоат, Эргоста-5,7,9(11),22-тетраен-3-ол, (3 $\beta$ , 22E), Эргостерол, Эргоста-7,22-диен-3-ол (3 $\beta$ , 5 $\alpha$ ,22E)-, Эргоста-5,8-диен-3-ол, (3 $\beta$ )-,  $\gamma$ -Эргостенол и Ланостерол. Их содержание варьировало в экстрактах *G. lucidum* и было наибольшим в грибах, собранных на территории Беларуси.

Экстракты *G. applanatum* отличались высоким содержанием эргостерола. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования белорусских трутовых грибов как источников биологически активных соединений широкого спектра действия и создают предпосылки для более детальных исследований этой группы грибов.

### Список литературы

1. Leung S.W.S. Lingzhi (Ganoderma) research – the past, present and future perspectives // Proceedings of International Symposium on Ganoderma Research, Shanghai, October 21–23, Beijing, Medical University Pres. - 2002. - pp. 1–9.
2. Kim H.W., Kim B.K. Recent advances on the biologically active triterpenoids of *Ganoderma lucidum*. In: *Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutics* // Proceedings of International Symposium on Ganoderma Research, Shanghai, October 21–23, Beijing, Medical University Press, 2002, pp. 10–19.
3. Boh B. et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds // *Biotechnology annual review*. - 2007. - Vol 13. pp. 265-301
- 4 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2007. – Vol. 24, № 8. – pp. 1596–1599.
- 5 Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // *Evolution*. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
6. Ma B. et al. Triterpenoids from the spores of *Ganoderma lucidum*. // *Am. J. Med. Sci.* - 2011 Vol. 3. - pp. 495-498
7. Stojković D.S. et al. A detailed comparative study between chemical and bioactive properties of *Ganoderma lucidum* from different origins // *Int. J. Food. Sci. Nutr.* - 2014. - Vol. 65(1). - pp. 42-47.

### ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ КОМАРОВ-ГАЛЛИЦ (CECIDOMYIINAE) ФАУНЫ БЕЛАРУСИ

Рогинский А.С., Бугакова А.В., Буга С.В.  
Белорусский государственный университет, г. Минск  
e-mail: bio.roginski@mail.ru

*Дана информация о представленности маркерных нуклеотидных последовательностей галлиц подсемейства Cecidomyiinae в on-line банках данных. В частности, нуклеотидные последовательности имеются для 7 видов, а именно Contarinianasturtii (Kieffer, 1888), Dasineurarosae (Bremi, 1847), Dasineuramali (Kieffer, 1904), Obolodiplosis robiniae (Haldeman, 1847), Rhabdophagarosaria (Loew, 1850), Rhabdophagaterminalis (Loew, 1850) и Resseliellatheobaldi (Barnes, 1927). Это оставляет широкие перспективы для дальнейшего штрихкодирования представителей таксона.*

Комары-галлицы (Cecidomyiidae) – богатый видами таксон двукрылых насекомых (Insecta:Diptera), который объединяет в своем составе представителей разных экологических форм. Личинки этих длинноусых двукрылых являются потребителями плодовых тел грибов, хищниками и паразитами тлей, других насекомых, а также фитофагами, в большинстве своем проявляющими тератогенные качества [1]. Многие виды являются вредителями сельскохозяйственных и декоративных культур, лекарственных и иных хозяйственно ценных растений [2]. Повреждения этими фитофагами, как правило, видоспецифичны, что определяет возможность надежной идентификации их таксономической принадлежности по повреждениям [3, 4]. Благодаря этому галлицы фигурируют в основных определителях вредителей лесных, декоративных и плодово-ягодных культур [2]. И, напротив, идентификация свободноживущих или уходящих на окукливание личинок тератформирующих галлиц крайне затруднена вследствие однообразности признаков внешней морфологии, что определяет задачу поиска иных способов идентификации таксономической принадлежности этих двукрылых. В настоящее время очевидной альтернативой является использование ДНК-идентификации.

Наиболее известным и широко применяемым является ДНК-штрихкодирование (ДНК-баркодинг), концепция которого основывается на том, что каждый биологический вид может быть идентифицирован на основе коротких стандартизированных фрагментов ДНК [5]. В результате целенаправленных исследований у животных в качестве ДНК-штрихкода было принято использовать последовательность гена субъединицы 1 цитохромоксидазы С (COI) [6, 7]. Накопление в банках данных нуклеотидных последовательностей для большего числа представителей таксона по сборам из разных регионов мира также дает материал для исследований в области геногеографии, популяционной генетики и эволюционной таксономии. Комары-галлицы фауны Беларуси до последнего времени не были объектами целенаправленных исследований, и к настоящему времени известны представители таксона, принадлежащие к числу вредителей сельскохозяйственных [8–11], лесных и декоративных [12, 13] культур. Для небольшого числа видов галлиц фауны Беларуси к настоящему времени в online-банки данных депонированы маркерные нуклеотидные последовательности. Соответствующие данные обобщены нами в таблице.

Как следует из данных таблицы, маркерные нуклеотидные последовательности к настоящему времени имеются лишь для 7 видов галлиц из более чем 50, известных к настоящему времени для фауны Беларуси. Большинство последовательностей получено для насекомых, коллектированных в Великобритании, Германии и Канаде. Основное их число датировано 2013 и 2015 годами, так что не приходится говорить интенсивном штрихкодировании представителей таксона в настоящее время.

Таблица – Регистрационные данные маркерных нуклеотидных последовательностей COI для комаров-галлиц (Сем. Cecidomyiidae) фауны Беларуси в международных on-line банках данных [14] (по состоянию на сентябрь 2017 г.)

| Вид галлиц                                      | Страна         | Регион                             | Год  | Количество нуклеотидных последовательностей |       |
|---|----------------|------------------------------------|------|---|-------|
|   |                |                                    |      | для региона                                 | общее |
| <i>Contarinianasturtii</i> (Kieffer, 1888)      | Канада         | Wellington County                  | 2013 | 1   | 1     |
| <i>Dasineur ROSAE</i> (Bremer, 1847)            | Великобритания | Surrey                             | 2005 | 5   | 6     |
|   | Германия       | Kreis Ahrweiler                    | 2013 | 1   |       |
| <i>Dasineur mali</i> (Kieffer, 1904)            | Канада         | Wellington County                  | 2010 | 1   | 2     |
|   |                | Port Coquitlam                     | 2015 | 1   |       |
| <i>Obolodiplosis robiniae</i> (Halldeman, 1847) | Япония         | Fukuoka                            | –    | 3   | 17    |
|   | Южная Корея    | Suwon                              | –    | 2   |       |
|   | Китай          | –                                  | –    | 4   |       |
|   | Германия       | Kreis Ahrweiler                    | 2013 | 8   |       |
| <i>Rhabdophaga rosaria</i> (Loew, 1850)         | Польша         | Ojców National Park, Malpolskie W. | 2002 | 1   | 1     |
| <i>Rhabdophaga terminalis</i> (Loew, 1850)      | Канада         | Rouge National Urban Park          | 2013 | 15  | 24    |
|   |                | Mississauga                        | 2016 | 2   |       |
|   |                | Cambridge                          | 2015 | 1   |       |
|   |                | Toronto                            | 2015 | 4   |       |
|   | Великобритания | Rouge National Urban Park          | 2016 | 2   |       |
| <i>Resseliella theobaldi</i> (Barnes, 1927)     | Великобритания | Kent, East Malling                 | 2008 | 3   | 6     |
|   | Германия       | Kreis Ahrweiler                    | 2013 | 1   |       |
|   |                |                                    | 2014 | 2   |       |

При этом существуют широкие перспективы расширения работ по ДНК-маркированию комаров-галлиц в интересах как фундаментальной (эволюционная таксономия), так и прикладной (диагностика вредителей растений и карантинных объектов) науки.

*Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б17МС-025).*

**Список литературы:**

1. Мамаев, Б.М. Галлицы, их биология и хозяйственное значение / Б.М. Мамаев. – М.: АН СССР, 1962. – 72 с.
2. Коломоец, Т.П. Насекомые-галлообразователи культурных и дикорастущих растений европейской части СССР. Двукрылые / Т.П. Коломоец, Б.М. Мамаев, М.Д. Зерова. – Киев: Наукова думка, 1989. – 168 с.
3. Гусев, В.И. Определитель повреждений лесных и декоративных деревьев и кустарников европейской части СССР / В.И. Гусев, М.Н. Римский-Корсаков. – М.; Л.: Гослес-бумиздат, 1951. – 580 с.
4. Гусев, В.И. Определитель повреждений деревьев и кустарников, применяемых в зеленом строительстве / В.И. Гусев. – М.: Агропромиздат, 1989. – 208 с.
5. Biological identification through DNA barcodes / P.D.N. Hebert [etal.] // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2003. – Vol. 270. – P. 313–321.
6. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates / O. Folmer [et al.] // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. – 1994. – Vol. 3, n. 5. – P. 294–299.
7. Voronova, N.V. Subspecies identification in aphids (Homoptera: Aphididae) by application of partial sequence of cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene: a view on the potential of method / N.V. Voronova // American International Journal of Research in Formal, Applied & Natural Sciences. – 2014. – Vol. 6, n. 1. – P. 1–6.
8. Колтун, Н.Е. Защита молодых насаждений и питомников семечковых культур от вредных организмов / Н.Е. Колтун, В.С. Комардина; Институт защиты растений. – Минск: Институт системных исследований в АПК НАН Беларуси, 2014. – 64 с.
9. Колтун, Н.Е. Вредители сада / Н.Е. Колтун. – Минск: Красико-Принт, 2017. – 24 с.
10. Защита плодовых и ягодных культур от вредителей, болезней и сорных растений на приусадебных участках / С.В. Сорока [и др.]. – Несвиж, 2008. – 272 с.
11. Интегрированные системы защиты сельскохозяйственных культур от вредителей, болезней и сорняков: рекомендации / Нац. акад. наук Респ. Беларусь; Ин-т защиты растений НАН Беларуси; под ред. С.В. Сороки. – Мн.: Бел. наука, 2005. – 462 с.
12. Петров, Д.Л. Дендрофильные галлообразующие двукрылые (Insecta: Diptera) фауны Беларуси / Д.Л. Петров // Вестник БГУ. – Сер. 2: Химия. Биология. География. – 2010. – № 1. – С. 31–35.
13. Петров, Д.Л. Насекомые-галлообразователи – вредители кустарниковых растений зеленых насаждений Беларуси / Д.Л. Петров, Ф.В. Сауткин // Вестник БГУ. – Сер. 2: Химия. Биология. География. – 2013. – № 1. – С. 65–71.
14. Taxonomy Kingdoms of Life Being Barcoded [Electronic resource]. – 2014–2017. – Mode of access:

[http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser\\_Home](http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser_Home). – Date of access: 04.09.2017.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПЕРЕЧНЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ  
МИКРООРГАНИЗМОВ У ТЛЕЙ *MACROSIPHUM GEI* КОСН, 1855,  
КОЛЛЕКТИРОВАННЫХ С ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЙ

Сироткина Д.П., Воронова Н.В.

Белорусский государственный университет, г. Минск

*В работе приводятся результаты исследования связи между перечнем эндосимбионтов тлей модельного вида и кормовым растением.*

**Введение.** Тли (Aphidoidea) – таксон флоэмососущих насекомых, широко распространенных в зоне умеренного климата. Тли используют в качестве кормовых растений большое число культур, в том числе, сельскохозяйственных. Поскольку тли питаются исключительно растительным соком, в процессе эволюции они образовали стойкие симбиотические отношения с разнообразными микроорганизмами. Один из таких микроорганизмов – облигатный симбионт тлей – *Buchnera aphidicola*, восполняющий нехватку азотсодержащих веществ во флоэмном соке растений. Кроме этого, *B. aphidicola* положительно влияет на жизнеспособность потомства тли, участвует в синтезе витаминов и т.д.

Помимо облигатных симбионтов у тлей детектируют вторичных (факультативных) эндосимбионтов. Среди этих микроорганизмов наибольший интерес представляют бактерии родов *Rickettsia*, *Spiroplasma*, *Serratia*, *Hamiltonella* и *Regiella*. Их роль в жизнедеятельности насекомого-хозяина активно изучается. В литературе представлены данные, свидетельствующие о том, что вторичные симбионты участвуют в защите тлей от патогенов и паразитоидов, влияют на термоустойчивость, а для *Acyrtosiphon pisum* было показано, что бактерии рода *Regiella* могут быть ассоциированы с выбором тлей кормового растения [1].

Особый интерес для исследования представляет собой вариабельность перечня симбиотических микроорганизмов среди особей одного вида тлей, так как в литературе не представлено достаточно данных о стабильности спектра эндосимбионтов. Как известно, передача симбиотических микроорганизмов происходит вертикально – от матери к потомству и, в некоторых случаях, горизонтально – с участием паразитоидов или в результате каннибализма. Однако частота горизонтальной передачи симбионтов у тлей значительно ниже, чем вертикальной. Для белокрылок было показано, что горизонтальная трансмиссия симбионтов может осуществляться через кормовое растение, однако у тлей такой механизм до сих пор подтвержден не был [2, 3].

В связи с тем, что на сегодняшний день в литературных источниках представлены неполные данные о возможных путях трансмиссии симбионтов, а влияние симбиотических микроорганизмов на жизнедеятельность тлей не выяснено в полном объеме, изучение симбиотического разнообразия представляет важную исследовательскую задачу. В частности, интересным представляется вопрос о связи между кормовым растением и перечнем симбионтов тли в пределах одного биотопа. В рамках данного исследования был проведен анализ перечня симбиотических микроорганизмов, выявляемых в отдельных особях тлей *Macrosiphum gei* Koch, 1855, ассоциированных с 4 видами кормовых растений. Выбранные растения отличались составом вторичных метаболитов, но произрастали в пределах одного биотопа.

### Материалы и методы

Сбор энтомологического материала проводился в период с 2008 по 2016 гг. на территории памятника природы «Дубрава» (Минск, Беларусь). Тли вида *M. gei* были коллектированы с 4 различных растений-хозяев: *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm., *Geum urbanum* L., *Aegopodium podagraria* L., *Chaerophyllum aromaticum* L. Выделение тотальной ДНК проводили из единичных особей тлей с использованием коммерческого набора «DNA Purification Kit» (Thermo Scientific). Протокол производителя для выделения ДНК из тканей животных был несколько модифицирован: время инкубации образцов в лизирующем буфере было увеличено до 60 мин, объем лизирующего буфера был уменьшен до 50 мкл, количество хлороформа – до 100 мкл; вместо преципитирующего буфера был использован 96 % этанол. Выделенную ДНК растворяли в 30 мкл деионизированной воды.

ПЦР-анализ был проведен с использованием родоспецифичных диагностических праймеров [4], представленных в таблице. Таблица – Родоспецифичные праймеры для получения фрагмента гена 16SrRNA бактерий, использованные в работе

| Род симбионтов      | Название праймера            | Последовательность праймера 5'– 3'                | Размер продукта, п.н. |
|---------------------|------------------------------|---|-----------------------|
| <i>Buchnera</i>     | Buch16S1F<br>Buch16S1R       | GAGCTTGCTCTCTTTGTCGGCAA<br>CTTCTGCGGGTAACGTCACGAA | 420                   |
| <i>Rickettsia</i>   | ApisRic16SF1<br>ApisRic16SR1 | TGGCTGTCGTCAGCTCGT<br>TTTAGGCTAATGGGTTTTGGTCAT    | 200                   |
| <i>Spiroplasma</i>  | 16SA1<br>TKSSspR             | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG<br>TAGCCGTGGCTTTCTGGTAA      | 510                   |
| <i>Regiella</i>     | U99F<br>16SB4                | ATCGGGGAGTAGCTTGCTAC<br>CTAGAGATCGTCGCCTAGGTA     | 200                   |
| <i>Hamiltonella</i> | PABSF<br>16SB4               | AGCACAGTTTACTGAGTTCA<br>CTAGAGATCGTCGCCTAGGTA     | 200                   |
| <i>Serratia</i>     | 16SA1<br>PASScmp             | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG<br>GCAATGTCTTATTAACACAT      | 480                   |

Состав реакционной смеси для ПЦР в 15 мкл включал: 7,5 мкл Quick-LoadTaq 2×MasterMix (Праймтех), 2,5 мкл воды, 0,15 мкМ каждого праймера, 2 мкг ДНК. ПЦР проводили в режиме: начальная денатурация при 95 °С – 10

мин., 40 циклов 95 °С – 30 сек., 55 °С – 30 сек. и 72 °С – 1 мин., финальная элонгация – 72 °С – 5 мин. Электрофоретическое разделение продуктов провели в 1,5 % агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса «GeneRuler DNA Ladder Mix» (Thermo Scientific), а также ДНК маркеров молекулярного веса М1Кб и М100bp (Праймтех). Детектирование результатов провели на основе наличия либо отсутствия на электрофореграмме фрагмента необходимой длины. Специфичные праймеры к 16S рРНК облигатного симбионта тлей *B. aphidicola* были использованы в качестве положительного контроля качества ПЦР. Статистическая обработка данных была проведена в программе STATISTICA. Для определения статистической значимости полученных результатов были построены таблицы сопряженности и рассчитан критерий  $\chi^2$ .

### Результаты

Для изучения связи между перечнем симбионтов у тлей *M. gei* и питанием на конкретном кормовом растении был проведен скрининг симбиотических микроорганизмов в 91 особи тлей (с бутеня ароматного – 24 особи, со сныти обыкновенной – 22 особи, с купыря лесного – 24 особи, с гравилата городского – 21 особь). В ходе исследования оказалось, что симбиотические микроорганизмы имели различную встречаемость: чаще всего были детектированы бактерии рода *Regiella* – в 79 из 91 особи, реже всего обнаруживались бактерии рода *Serratia* – в 7 особях из 91 (в качестве примера результатов диагностического ПЦР-анализа на рисунке 1 представлены электрофореграммы ПЦР-продуктов, полученных при работе с образцами тлей, собранных на бутене ароматном и купыре лесном).

Низкая встречаемость была также отмечена у бактерий родов *Rickettsia* и *Spiroplasma*, а именно, у 9 и 10 особей соответственно из 91 исследованной были детектированы симбионты данных родов. Симбиотические бактерии рода *Hamiltonella* присутствовали в 16 образцах.

Тля с бутеня ароматного: 1 – *Buchnera*, 2 – *Rickettsia*, 3 – *Regiella*, 4 – *Hamiltonella*, 5 – *Spiroplasma*, 6 – *Serratia*. Тля с купыря лесного: 7 – *Buchnera*, 8 – *Rickettsia*, 9 – *Regiella*, 10 – *Hamiltonella*, 11 – *Spiroplasma*, 12 – *Serratia*

Рисунок 1 – Электрофореграмма результатов диагностического ПЦР-анализа общей ДНК, выделенной из тлей *Macrosiphum gei*

Стоит отметить, что 9 особей из 91 не содержали ни одного из рассматриваемых вторичных симбионтов, однако первичный симбионт – *V. aphidicola*, был детектирован во всех исследованных особях.

Информация о встречаемости симбиотических микроорганизмов в выборке представлена на рисунке 2.

Рисунок 2 – Встречаемость эндосимбионтов различных родов у тлей  
*Macrosiphum gei*

Для оценки наличия либо отсутствия связи между встречаемостью эндосимбионта конкретного рода и кормовым растением тли была построена таблица сопряженности и посчитан критерий  $\chi^2$  для качественных данных (наличие/отсутствие симбиотического микроорганизма у каждой из исследованных особей тли). В результате статистической обработки данных отвергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий в перечне симбионтов между тлями с разных кормовых растений не удалось. Оказалось, что встречаемость каждого из эндосимбионтов на конкретном кормовом растении у тлей *M. gei* соответствовала ожидаемому значению, рассчитанному для генеральной совокупности. Несмотря на встречающиеся в литературе данные об ассоциации некоторых эндосимбионтов тлей с выбором насекомым конкретного кормового растения [1], полученные нами результаты не позволяют предположить наличие такого рода связи.

Полученные данные об отсутствии связи между наличием симбиотических микроорганизмов у тлей *M. gei*, коллектированных на территории Беларуси, и кормовым растением, а также вариабельность перечня симбионтов в пределах одного вида тли может свидетельствовать о том, что симбиотический спектр отдельных особей тлей определяется случайными причинами. В связи с этим вопрос о возможных путях попадания симбионта в организм насекомого-хозяина остается открытым.

*Исследование выполнено при поддержке гранта, выделенного Министерством образования Республики Беларусь, докторантам, аспирантам и студентам в 2017 г.*

#### **Список литературы:**

1. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits / K. M. Oliver [et al.] // Annual Review of Entomology. – 2010. – Vol. 55, N. 1. – P. 247–266.
2. Faithful vertical transmission but ineffective horizontal transmission of bacterial endosymbionts during sexual reproduction of the black bean aphid, *Aphis fabae* / K. Vorburger [et al.] // Ecological Entomology. – 2017. – Vol. 42, N. 2. – P. 202–209.
3. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated / A. Caspi-Fluger [et al.] // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2012. – Vol. 279, N. 1734. – P. 1791–1796.
4. Facultative bacterial endosymbionts of three aphid species, *Aphis craccivora*, *Megoura crassicauda* and *Acyrtosiphon pisum*, sympatrically found on the same host plants / T. Tsuchida [et al.] // Appl. Entomol. Zool. – 2006. – Vol. 41, N. 1. – P. 129–137.

#### **БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ *VIDENSFRONDOSUS* L.- ИНВАЗИВНОГО ВИДА ВО ФЛОРЕ БЕЛАРУСИ**

Скуратович Т.А.<sup>1</sup>, Молчан О.В.<sup>1</sup>, Голенченко С.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси», г. Минск, tskuratovich@yandex.ru

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет, г. Минск

*Установлено, что экстракты череды олиственной оказывают антибактериальную активность относительно *Staphylococcus aureus* 6538, *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29212 и фунгистатическое действие в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*. Биологическая активность находится в соответствии с содержанием суммы фенольных соединений в экстрактах.*

**Введение.** Череда олиственная – однолетнее травянистое растение до 1,5 м высотой [5]. Этот вид первоначально произрастал в Северной Америке и с 19-го века начал распространяться в Европе [10]. В Беларуси впервые был отмечен в г. Бресте (1955 г.) [4]. С этого времени количество известных местонахождений значительно возросло [2]. Несмотря на широкое территориальное распространение череды олиственной, фармакологические свойства ее изучены весьма недостаточно. Наиболее известной в фармацевтическом отношении является череда трехраздельная, включенная в Государственную фармакопею Республики Беларусь [1]. Трава череды трехраздельной улучшает пищеварение, нормализует обмен веществ, обладает противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами [3]. В связи с тем, что места естественного обитания аборигенного вида череды трехраздельной значительно сокращаются, возникает необходимость в исследовании биологической активности инвазивного вида череды – череды олиственной, который может быть альтернативным источником фармакологически ценного сырья.

Целью данной работы являлось изучение антибактериальной и фунгицидной активности инвазивного вида *Bidensfrondosus*L.

#### **Объекты и методы исследования**

Объектами исследований были высушенные измельченные листья растений *Bidensfrondosus*L, собранных в фазу бутонизации начала цветения на территории Минской области г. Солигорска.

Для определения антибактериальной и фунгицидной активности использовали следующие варианты экстрактов листьев растений *Bidensfrondosus*L:

1. Соотношение навеска/экстрагент (вода) 1:50;
2. Соотношение навеска/экстрагент (вода) 1:5;
3. Соотношение навеска/экстрагент (25% этанол) 1:5;
4. Соотношение навеска/экстрагент (40% этанол) 1:5.

Контроль – соответствующие экстрагенты: вода, 25 и 40% этанол.

В качестве основных тест-объектов для оценки антибактериальной активности служили условные патогены человека *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 6538P™), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 25923™), *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz (ATCC® 29212™).

Посев микроорганизмов для формирования бактериального газона проводили методом Дригальского. Для выявления антибактериальной активности применяли метод лунок [6]. Учет результатов проводили через 48 часов инкубирования при температуре 37°C. О наличии антибактериальной активности судили по появлению зоны задержки роста бактерий вокруг лунки с экстрактом череды.

Для определения фунгицидной активности использовали фитопатогенные грибы *Fusarium avenaceum*, *Colletotrichum gloeosporioides*,

*Botrytis sceneria*. Посев грибов проводили методом агаровых блоков [6]. Культивировали патогены при температуре 28°C. Результаты оценивали на 4-е сутки по радиусу зон роста грибов.

Фенольные соединения экстрагировали водой, 25 и 40% этанолом при 80°C трехкратно по 30 минут и определяли спектрофотометрически с использованием реактива Фолина-Дениса в пересчете на галловую кислоту [11]. Оптическую плотность поглощения определяли с помощью спектрофотометра СФ 2000 (Россия).

Антиоксидантную активность оценивали по реакции с 0,002 % раствором DPPH (дифенил-2-пикрил-гидразил) [9].

Обработку данных производили с помощью пакета статистического анализа программы Microsoft Excel. Основными статистическими характеристиками служили: средняя арифметическая величина и ошибка средней величины. Эксперименты были выполнены в 3-х кратной повторности.

### Результаты и обсуждение

Исследована фунгицидная активность экстрактов листьев *Bidens frondosus* L. относительно фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis sceneria* (рисунок 1).

Установлено, что экстракт варианта № 4 (соотношение навеска/экстрагент (40% этанол) 1:5) оказывал фунгистатическое действие по отношению к исследованным патогенам. Площадь колоний грибов в данном варианте в среднем на 60 % меньше контрольного значения.



Рисунок 1 – Оценка фунгистатической активности экстрактов листьев *Bidens frondosus* L

Исследовано влияние экстрактов листьев *Bidens frondosus* L на рост культур бактерий *Staphylococcus aureus* 6538 (рисунок 2), *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29212. В вариантах опыта 2, 3, 4 наблюдалось ингибирование роста бактерий. Максимальная антибактериальная активность экстрактов была характерна для варианта №4.

Площадь зоны задержки роста *Staphylococcus aureus* 6538, *Staphylococcus aureus* 25923 и *Enterococcus faecalis* 29212 в данном случае составляла 4,5; 2,0 и 13,8 см<sup>2</sup>соответственно.

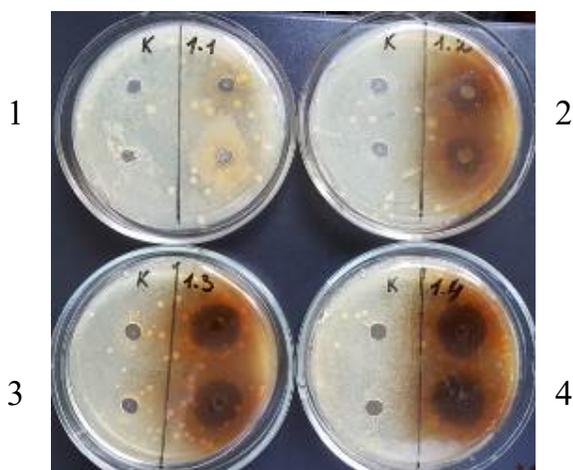


Рисунок 2 – Антибактериальная активность экстрактов листьев *Bidensfrondosus* L в отношении *Staphylococcus aureus* 6538

Экстракт листьев череды олиственной в варианте №1 (соотношение навеска/экстрагент (вода) 1:50) оказал положительный результат только по отношению к *Enterococcus faecalis* 29212 (зона задержки роста бактерий – 3,1 см<sup>2</sup>).

Далее нами была определена сумма фенольных соединений и их антирадикальная активность в исследуемых экстрактах череды олиственной. Установлено, что максимальное содержание суммы фенольных соединений (1,62±0,019 мг/лунку) было в варианте № 4, где наблюдались максимальная антибактериальная активность и фунгистатический эффект относительно исследованных патогенов. Антирадикальная активность этих экстрактов была также максимальной (таблица 1).

Таблица 1 – Сумма фенольных соединений и антирадикальная активность в экстрактах *Bidensfrondosus*L

| Вариант | Сумма фенольных соединений мг/лунку | Антирадикальная активность, %/г сухой массы |
|---------|-------------------------------------|---|
| 1       | 0,10±0,002                          | 0,37±0,061                                  |
| 2       | 1,09±0,003                          | 4,05±0,182                                  |
| 3       | 1,24±0,009                          | 6,28±0,322                                  |
| 4       | 1,62±0,019                          | 9,93±0,096                                  |

Можно предположить, что существенное влияние на проявление антибактериальной и фунгистатической активности экстрактов листьев *Bidensfrondosus* L.оказывают фенольные соединения. Таким образом, биологическая активность находится в соответствии с содержанием суммы фенольных соединений в экстрактах. Согласно имеющимся публикациям [8]

спиртовые экстракты, содержащие фенольные соединения, других видов рода Череда обладают противоаллергической активностью в то время как о бактериальной и фунгицидной активности экстрактов листьев *Bidensfrondosus* L. имеются малочисленные данные[7].

### **Заключение**

Исследовано влияние экстрактов листьев *Bidensfrondosus* L. на рост ряда бактериальных и грибных патогенов. Установлено, что этанольные экстракты череды олиственной оказывают ингибирующий эффект на рост бактерий *Staphylococcus aureus*6538, *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29212 и фунгистатическое действие в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium avenaceum*, *Colletotrichumgloe osporioides*, *Botrytis cinerea*. Можно предположить, что весомый вклад в проявление антибактериальной и фунгистатической активности вносят фенольные соединения экстрактов.

Авторы выражают благодарность сотруднику кафедры ботаники Белгосуниверситета Джусу М.А. за помощь в сборе сырья растений.

Работа выполнялась в рамках подпрограммы 2 «Противодействие экспансии чужеродных видов организмов, минимизация ущербов для природного биоразнообразия, экономики и здоровья человека» (Инвазии и экобезопасность) ОНТП «Интродукция, озеленение, экобезопасность» на 2016-2020 гг.

### **Список литературы:**

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 3 т. / РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; редкол.: под общ.ред. А. А. Шерякова. – Минск :Минский государственный ПТК полиграфии им. В. Хоружей, 2006–2009. – Т. 2. – 2007. – 471 с
2. Джус, М.А. Род *Bidens* L. (Asteraceae) во флоре Белоруссии // Материалы I(IX) Международной Конференции Молодых Ботаников в Санкт-Петербурге, Санкт-Петербург, 21–26 мая 2006. – СПб: Изд-во ГЭТУ, 2006.– С. 49–50.
3. Изучение фармакологической активности суммарных комплексов череды трехраздельной / А.С. Микаэлян[и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – № 10. – С. 62-66.
4. Корнась, Я. О находке *Bidens melanocarpus* Wiegand в Бресте // Ботанические материалы гербария Ботан. ин-таим. В.Л. Комарова АН СССР. – М.–Л., 1960. – Т. 20. – С. 337–339.
5. Распространение череды олиственной (*Bidens frondosus* L., Asteraceae) в Беларуси и содержание биологически активных соединений в сырье растений / О.В. Молчан [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т.11, Ч. 2. – С. 123–131.

6. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – 253 с.
7. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Bidens frondosa* Linn / A. Rahman [et al.] // International journal of food science and technology. – 2011. – Vol.46. – P.1238–1244.
8. Antimicrobial and antifungal activities of the extracts and essential oils of *Bidenstripartite* / M. Tomczykowa[et al.] // Folia histochem cytobiologica. – 2008. – Vol.46, № 3. – P.389–393.
9. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical / M.S. Blois // Nature. – 1958. – V. 181. – P. 1199-1200.
10. Köck, U.V. Ökologische Aspekte der Ausbreitung von *Bidens frondosa* L. in Mitteleuropa. Verdrängter *Bidenstripartita* L. / U.V. Köck // Flora. – 1988. – Vol.180. – P. 177–190.
11. Folin, O. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // J. Biol. Chem. – 1927. – Vol. 73, № 2. – P. 627–650.

#### КОНСТРУИРОВАНИЕ ГИБРИДНОГО ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФЬЮЖН-БЕЛОК СВМТ-ESC-V(1–20)

Совгир Н.В., Бусленко А.В., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, г. Минск,  
sovgirnv@gmail.com

*В клетках E. coli в составе вектора pET-24b(+)* клонирована сконструированная гибридная молекула ДНК, состоящая из гена углеводсвязывающего модуля фермента ксиланазы 10А бактерий *Thermatoga maritima* и гена N-концевого фрагмента антимикробного пептида эскулентина-1b лягушки (*Rana esculenta* L., 1758). Правильность созданной последовательности гибридного гена подтверждена ДНК-секвенированием.

**Введение.** Антимикробные пептиды (АМП), способные губительно действовать на клетки микроорганизмов, представляют собой небольшие молекулы, выделяемые организмом-хозяином в ответ на микробные инвазии, и являются одним из механизмов врожденного иммунитета [5]. Среди природных источников антимикробных пептидов наиболее богатыми являются кожные секреты земноводных [7].

В работе использовали участок последовательности гена АМП эскулентина-1b прудовой лягушки (*Rana esculenta* L., 1758) [3], детерминирующий синтез первых 20 N-концевых аминокислотных остатков эскулентина-1b. По данным L. Marcellini et al. [6] этот фрагмент обладает такой же антибактериальной активностью, как и полноразмерный белок.

Рекомбинантные АМП являются привлекательными объектами для биотехнологического производства фармацевтических субстанций, лишенных отрицательных качеств, присущих антибиотикам [5]. Получение

рекомбинантных АМП с использованием прокариотических клеток успешно демонстрирует эффективность этого подхода. Чаще всего пептиды вводят в состав гибридных белков в целях предотвращения токсичности АМП в отношении клеток-продуцентов или обезвреживания систем, препятствующих экспрессии этих молекул в клетках бактерий. В состав фьюжн-белков между модульными компонентами также включают сайт специфического протеолиза или мишень для химического расщепления [8].

Сшивание генов углевод-связывающего модуля и АМП эскулентина-b(1-20) в составе экспрессирующего вектора позволяет получить фьюжн-белок, на N-конце которого в качестве белка-партнера находится растворимый анионный углевод-связывающий модуль (СВМТ), а на С-конце – катионный пептид эскулентин-b(1-20) (Esc-b(1-20)). Получение такого рекомбинантного белка позволит уменьшить внутриклеточную антимикробную активность эскулентина-b(1-20), которая в процессе биосинтеза может губительно сказываться на клетках-продуцентах *E. coli*. Последовательность СВМТ содержит сайт узнавания для TEV протеазы (tobacco etch virus protease), что позволит отделить пептид от белка-партнера в результате ферментативного протеолиза [10]. Кроме того, белок СВМТ способен эффективно связываться с углеводами, например, доступной и дешевой целлюлозой, которая может выступать в качестве сорбента для хроматографической очистки фьюжн-белка [4].

Целью работы являлось конструирование гена, кодирующего рекомбинантный фьюжн-белок СВМТ-Esc-b(1-20), состоящий из анионного углевод-связывающего модуля фермента ксиланазы 10А бактерий *T. maritima* и N-концевого фрагмента катионного антимикробного пептида эскулентина-1b.

**Материалы и методы исследования.** Источником последовательности ДНК гена углевод-связывающего модуля фермента ксиланазы 10А бактерий *T. maritima* служила ранее сконструированная рекомбинантная плазмида pUC57-СВМТ. Последовательность СВМТ, введенная в плазмиду pUC57 по сайту рестрикции *Nde* I, синтезирована компанией «Integrated DNA Technologies Inc. (IDT)» (США). Плазмида pET-Esc-b(1-20) содержит клонированный по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI и секвенированный ген антимикробного пептида эскулентина-b(1-20). Плазмиду pET-Esc-a(1-21), содержащую клонированный по сайтам рестрикции *Nde* I и *Eco* RI ген антимикробного пептида эскулентина-a(1-21), использовали в качестве положительного контроля при проведении ПЦР. Плазмиды pET-Esc-b(1-20) и pET-Esc-a(1-21) получены в НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии БГУ [2].

Штамм *E. coli* XL-1Blue (F' *proAB lacI<sup>q</sup>lacZAM15 Tn10(Tc<sup>r</sup>)/recA1 endA1 gyrA96(Nal<sup>r</sup>) thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac*) использовали для клонирования рекомбинантной плазмиды pET-СВМТ-Esc-b(1-20).

Плазмидную ДНК и ДНК из агарозного геля выделяли наборами «QIAprep Spin Miniprep Kit (50)» («QIAGEN», Германия) и «Silica Bead DNA

Gel Extraction Kit» («Thermo Scientific», Литва) соответственно согласно инструкциям производителей. В реакциях рестрикции использовали фермент *Nde* I серии FastDigest® («Thermo Scientific», Литва), лигирования – T4 ДНК-лигазу («Thermo Scientific», Литва), дефосфорилирования – щелочную фосфотазу («Antarctic Phosphatase») производства фирмы «New England Biolabs» (Великобритания).

Аmplификацию фрагментов ДНК проводили методом ПЦР в смеси стандартного состава [9] с использованием амплификатора Veriti 96 Well Thermal cycler («Applied Biosystems», Великобритания), полимеразы Taq («Thermo Scientific», Литва) и праймеров производства ОДО «Праймтех»: T7Promoter (5'-taatacgaactcactataggg-3'), T7Terminator (5'-tatgctagttattgctcag-3'). Режим амплификации: 94 °С – 5 мин (1цикл); 94 °С – 30 с, 47 °С – 20 с, 72 °С – 1 мин (30 циклов); 72 °С – 7 мин (1цикл). Матричную ДНК из трансформантов *E. coli* выделяли кипячением клеток бактерий в деионизированной воде и последующим центрифугированием суспензии.

Электрофоретический анализ нуклеиновых кислот и кальциевую трансформацию бактериальных клеток проводили согласно стандартным методикам [1].

**Результаты и их обсуждение.** Для получения необходимой гибридной конструкции из плазмиды рUC57-СВМТ в результате обработки рестриктазой *Nde* I вырезали ген СВМТ. Плазмиду рЕТ-Esc-b(1–20) также подвергали рестрикции ферментом *Nde* I и последующему дефосфорилированию. После лигирования вектора и гена СВМТ полученной рекомбинантной плазмидой рЕТ-СВМТ-Esc-b(1–20) трансформировали бактерии штамма *E. coli* XL-1 Blue.

Проверку трансформантов на наличие гибридной конструкции осуществляли при помощи ПЦР. В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь без матричной ДНК, в качестве положительного контроля – смесь, содержащую плазмиду рЕТ-СВМТ-Esc-a(1–21). В составе этой плазмиды находится ген СВМТ-Esc-a(1–21), который длиннее целевого гена СВМТ-Esc-b(1–20) на три пары нуклеотидов. При этом применяли праймеры, фланкирующие полилинкерную область плазмиды рЕТ-24b(+), на основе которой были получены рекомбинантные плазмиды рЕТ-СВМТ-Esc-b(1–20) и рЕТ-СВМТ-Esc-a(1–21).

Размер ожидаемых продуктов амплификации в случае получения трансформантов, содержащих нужную вставку, должен был составлять 936 п.н. При отрицательном результате ожидали получение ампликона размером 260 п.н. В результате проведенного электрофореза установлено наличие гена СВМТ-Esc-b(1–20) у клонов под номерами 3 и 5 (рисунок 1).

В связи с тем, что ген СВМТ в составе плазмиды рЕТ-Esc-b(1–20) клонировали по одному сайту рестрикции, определяли правильность ориентации вставки, для чего ампликоны, содержащие гибридную последовательность, обрабатывали рестриктазой Kpn I, т. к. сайт узнавания

этой рестриктазы является уникальным для последовательности и расположен между генами *CBMT* и *Esc-b(1–20)*. Положительным контролем рестрикции выступал ампликон гена *CBMT-Esc-a(1–21)* с правильной ориентацией вставки, в котором сайт *Kpn I* также является уникальным и находится на границе между генами *CBMT* и *Esc-a(1–21)*.

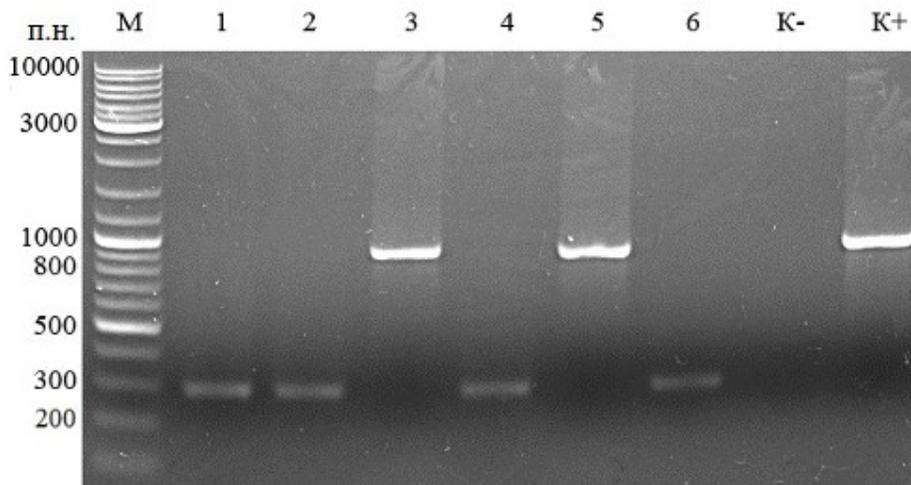


Рисунок 1 – Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа трансформантов *E. coli* XL-1 Blue на наличие гена *CBMT-Esc-b(1–20)*

М – маркер молекулярного веса GeneRuler Mix SM0333 («Thermo Scientific», Литва); 1–6 – порядковые номера проверенных трансформантов; К- – отрицательный контроль (проба без матричной ДНК); К+ – положительный контроль (плазмида *pET-CBMT-Esc-a(1–21)*).

В случае правильной ориентации вставки продуктами рестрикции должны быть фрагменты ДНК размером 736 и 207 п. н., а в случае обратной ориентации – 845 и 98 п. н. На электрофореграмме видно, что ампликон клона под номером 3 имеет вставку с правильной ориентацией гена *CBMT*, в то время как ампликон клона под номером 5 – с обратной (рисунок 2). Отсутствие случайных изменений в рекомбинантной последовательности из клона под номером 3 было подтверждено секвенированием по Сэнгеру.

Таким образом, ПЦР-анализом трансформантов, рестрикционным анализом ампликонов *CBMT-Esc-b(1–20)* и секвенированием подтверждено клонирование в составе вектора *pET-24b(+)* в клетках штамма *E. coli* XL-1 Blue целевого гибридного гена.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «Научно-производственный центр «ПроБиоТех».

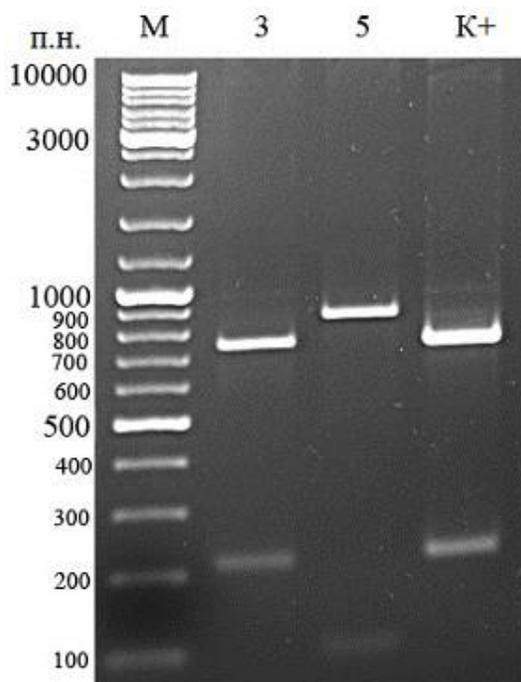


Рисунок 2 – Электрофореграмма результатов рестрикционного анализа ампликонов *CBMT-Esc-b(1-20)*

М – маркер молекулярного веса GeneRuler Mix SM0333 («Thermo Scientific», Литва); 3 и 5 – порядковые номера проверенных трансформантов; К+ – положительный контроль (ампликон гена *CBMT-Esc-a(1-21)*).

### Список литературы:

1. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984–480 с.
2. Нагорная, А. А. Клонирование N-концевых фрагментов антимикробного пептида эскулентина / А. А. Нагорная, Н. В. Совгир // Сборник работ 72-ой научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета: В 3 ч. Ч.1. БГУ, 2015. С. 247–250.
3. Совгир, Н. В. Клонирование и экспрессия гена антимикробного белка эскулентина-1b (*Rana esculenta*) в клетках бактерий *Escherichia coli* / Н. В. Совгир, В. А. Прокулевич // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2011. – Т. 6, Ч. 1. – С. 70–75.
4. Binding specificity and thermodynamics of a family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A / A. B. Boraston [et al.] // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40, No 21. – P. 6240–6247.
5. Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli* / M. L. Mangoni [et al.] // *Biochemical society*. – 2004. – Vol. 380, No 3. – P. 859–865.

6. Esculentin-1b(1–18) – a membrane-active antimicrobial peptide that synergizes with antibiotics and modifies the expression level of a limited number of proteins in *Escherichia coli* / L. Marcellini [et al.] // The FEBS Journal. – 2009. – Vol. 276, No 19. – P. 5647–56644.
7. Functional characterisation of the 1–18 fragment of esculentin-1b, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta* / L. M. Mangoni [et al.] // Peptides. – 2003. – Vol. 24, No 11. – P. 1771–1777.
8. Lagaron, J. M. Antimicrobial Polymers / J. M. Lagaron, M. J. Ocio, A. Lopez-Rubio. – New Jersey: Wiley, 2012. – 596 p.
9. McPherson, M. J. PCR / M. J. McPherson, S. G. Moller – Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 2000. – 276 p.
10. Phan, J. Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease / J. Phan [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277, No 52 – P. 50564–50572.

#### ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КЛАТРАТОВ ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ЭФИРНЫМ МАСЛОМ БУТОНОВ ГВОЗДИКИ

Тарасова Ю.В.<sup>1</sup>, Лодыгина С.В.<sup>1</sup>, Лодыгин А.Д.<sup>1</sup>, Капустин М.А.<sup>2</sup>,  
Ризевский С.В.<sup>2</sup>, Буткевич Т.В.<sup>2</sup>, Цыганков В.Г.<sup>3</sup>, Бондарук А.М.<sup>3</sup>,  
Филонюк В.А.<sup>4</sup>, Курченко В.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Кавказский государственный университет, г. Ставрополь

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет, Минск, kurchenko@tut.by

<sup>3</sup> РУП «Научно-практический центр гигиены», г. Минск

<sup>4</sup> Центральный аппарат Министерства здравоохранения Республики  
Беларусь, г. Минск

*Проведены исследования состава компонентов эфирного масла гвоздики, которое показало, что в его состав входит большое число биологически активных веществ различного химического строения: моно-, би- и трициклические монотерпены и сесквитерпены, а также терпеноиды: спирты, эфиры, кетоны. Разработанный метод получения клатратов эфирного масла гвоздики с циклодекстрином, позволяющий включить в их состав, преимущественно терпеноидные эфиры: эвгенол, изокариофиллен, эвгенил ацетат, кариофиллен оксид, содержание которых доминирует в полученных комплексах.*

Эфирное масло гвоздики получают из цветущих красных бутонов гвоздичного дерева, растущего в тропиках и субтропиках. Высушенные бутоны содержат гвоздичное масло в котором доминируют: эвгенол, ацетил-эвгенол, карнио филлен. Оно обладает насыщенным терпким привкусом, устойчивым ароматом. Гвоздичное масло является сильнодействующим обезболивающим и антисептическим средством, поэтому его можно использовать для профилактики инфекционных заболеваний [1, 2, 3]. Масло

находит широкое применение в пищевой промышленности, при производстве напитков, кондитерских и других изделий. При их изголовлении удобной формой использования гвоздичного масла являются комплексы включения в циклодекстрин. Циклодекстрины могут образовывать комплексы со многими биоактивными веществами, определяющие вкус и аромат пищи. Эти вещества часто наименее стабильны, разлагаются или улетучиваются при хранении продуктов. В отличие от эфирных масел комплексы включения растворимы в водной среде. Клатраты ЦД с пищевыми микрокомпонентами представляют собой сыпучий порошок, который стабилен при хранении. Они легко и точно могут быть дозированы, что позволяет вносить минимальные количества ароматических веществ [4, 5, 6]. Целью работы являлось получение клатрата эфирного масла гвоздики.

### **Материалы и методы**

В качестве объектов исследования был взят  $\beta$ -циклодекстрин ( $\beta$ -ЦД) ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>7</sub>, влажность 13,84 %. Содержание  $\beta$ -ЦД в сухом веществе не менее 98 %. Для получения комплексов  $\beta$ -циклодекстрина использовалось эфирное масло бутонов гвоздики (фирма «Лазурин», Россия).

Для получения комплексов включения эфирного масла гвоздики с циклодекстринами использовали метод сорастворения и лиофилизации. Циклодекстрин растворяли в дистиллированной воде при температуре 80 °С на водяной бане до полного растворения. Раствор охлаждали до 60 °С и при перемешивании по каплям вносили спиртовой раствор эфирного масла. При этом наблюдалось постепенное помутнение раствора и образование мелкодисперсных частиц комплексов включения. Полученный раствор охлаждали в холодильнике до 5 °С и центрифугировали для отделения клатратов. Полученные комплексы лиофильно высушивались. Полученный сухой порошок растирали до гомогенного состояния в ступке. Хранили в герметично закупоренных флаконах, при температуре 10 ± 2 °С. Были получены комплексы включения эфирного масла гвоздики при различных соотношениях циклодекстрина и эфирного масла: 1:0,1; 1:0,4; 1:0,7 и 1:1 [7, 8, 9].

Для оценки количества включенного в циклодекстрин эфирного масла использовался гравиметрический метод. Компоненты эфирного масла из полученных клатратов элюировались гексаном. Полученный высушенный циклодекстрин взвешивали и определяли количество экстрагированного масла.

Для газохроматографического анализа использовали по 1 мл растворов эфирного масла гвоздики в гексане и элюат из комплекса включения с циклодекстрином. Исследования проводились на газовом хроматографе Agilent 6850, оснащенный масс-детектором Agilent 5975B. Использовалась капиллярная колонка DB-5MS (сополимер 5 %-дифенил-95 %-диметилсилоксана) длиной 60 м с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Объем пробы - 1 мкл.

Процентный состав эфирных масел вычислялся по площадям пиков без использования поправочных коэффициентов. Качественный анализ основан на сравнении масс-спектров компонентов эфирного масла с соответствующими данными библиотеки масс-спектров NIST0.5a [7, 9].

Термогравиметрическим методом анализировались образец комплекса включения  $\beta$ -ЦД с эфирным маслом бутонов гвоздики, образец их физической смеси и образец циклодекстрина. Измерения проводились с помощью термоаналитической системы ТА - 4000 "Mettler Toledo" Швейцария. Масса исследуемой навески  $\sim 10,5$  мг. Использовалось программирование температуры в диапазоне 25 – 550 °С, скорость подъема температуры - 5 °С/мин [7, 9].

### Результаты и обсуждение

Использование гравиметрического метода позволило определить эффективность включения компонентов масла гвоздики в клатраты циклодекстрина. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Количество эфирного масла гвоздики в комплексах включения с циклодекстрином

| Эфирные масла  | масса                                    | Соотношение ЦД : эфирное масло |         |         |        |
|----------------|--|--------------------------------|---------|---------|--------|
|                |  | 1 : 0,1                        | 1 : 0,4 | 1 : 0,7 | 1 : 1  |
| Бутон гвоздики | масса образца                            | 0,1003                         | 0,1003  | 0,1000  | 0,1001 |
|                | масса после сушки                        | 0,0844                         | 0,0825  | 0,0797  | 0,0723 |
|                | масса эфирного масла                     | 0,0159                         | 0,0178  | 0,0203  | 0,0278 |
|                | содержание масла в 1 гр                  | 0,1585                         | 0,1775  | 0,2030  | 0,2777 |
|                | количество включенного эфирного масла, % | 15,8                           | 17,8    | 20,3    | 27,8   |

Содержание активных компонентов эфирного масла гвоздики в клатратах, полученных при соотношениях  $\beta$ -ЦД: эфирное масло – 1 : 0,1; 1 : 0,4; 1 : 0,7; 1 : 1 соответственно возрастает с 15,8; 17,8; 20,3 до 27,8 %.

Можно предположить, что различия в количествах биологически активных веществ в клатратах связаны с различной летучестью компонентов эфирных масел [7-9]. Для проверки данного предположения был проведен газохроматографический анализ с использованием масс-селективного детектора и термогравиметрии.

Термический анализ комплекса включения эфирного масла гвоздики с  $\beta$ -ЦД свидетельствует об его образовании. На рисунках 1, 2 представлены результаты термогравиметрического анализа  $\beta$ -ЦД и комплекса  $\beta$ -ЦД - эфирное масло гвоздики.

Термический анализ исследуемого образца эфирного масла гвоздики показал, что происходит включение терпеновых соединений в структуру  $\beta$ -ЦД (рисунок 2). Сравнительный анализ термограмм показывает, что для клатрата эфирного масла гвоздики характерно два максимума тепловыделения при температурах 100,11 - 180,47 °С и 202,13 - 255,35 °С. При этом происходит сдвиг максимума термического разложения ЦД с 320

°C до 295 °C. Эти результаты свидетельствуют об образовании комплексов включения [9].

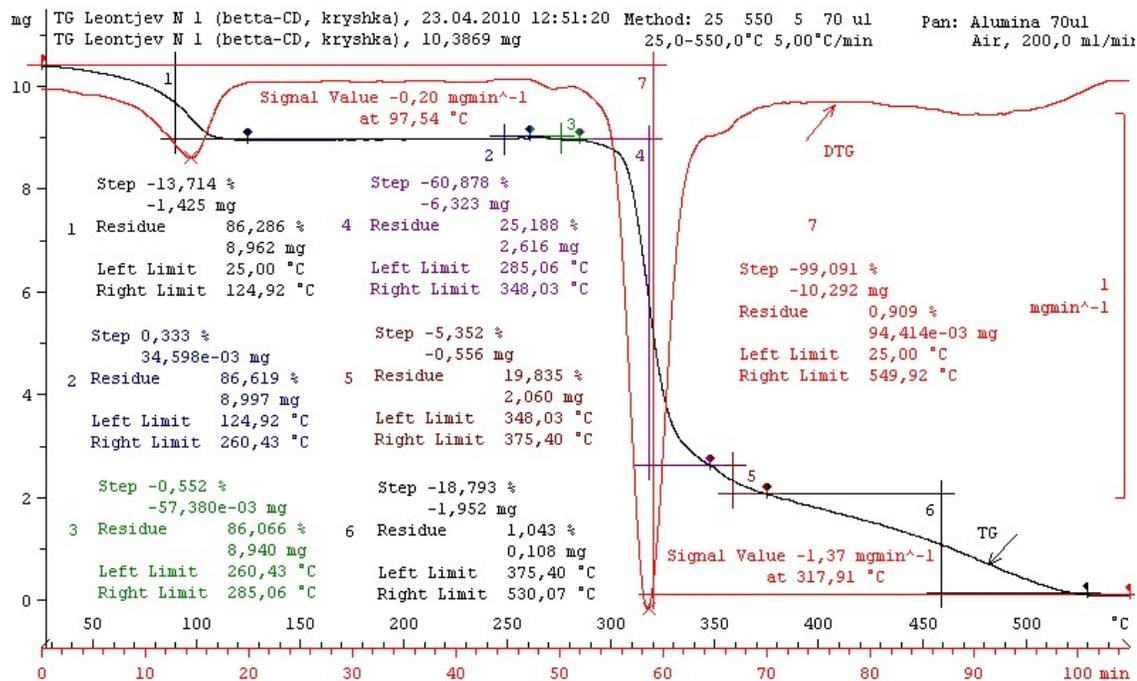
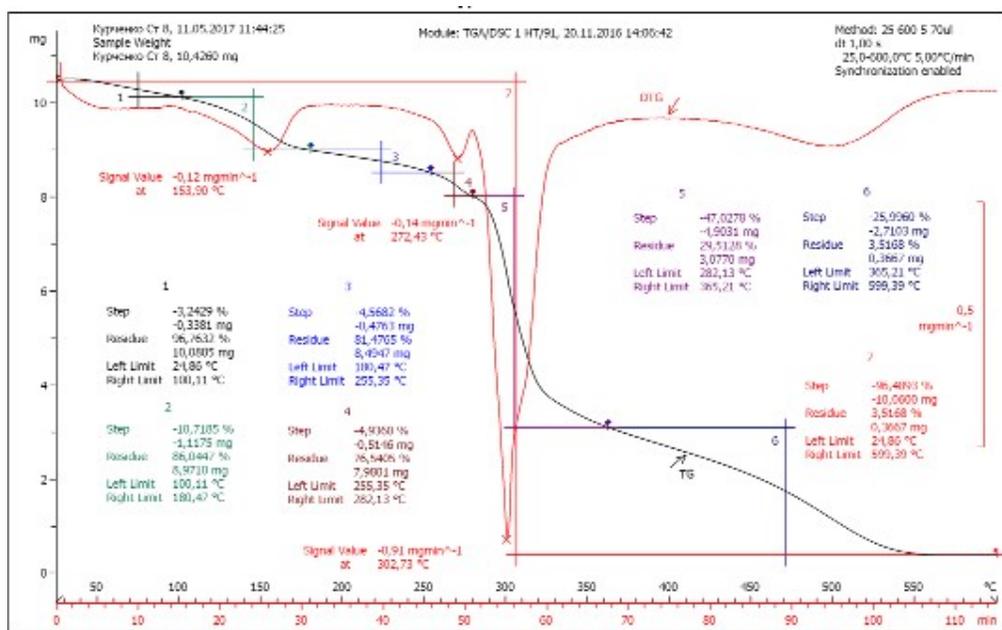


Рисунок 1 – Термогравиметрический анализ β-циклодекстрина



Lab: METTLER

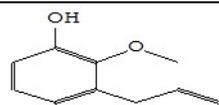
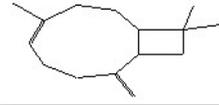
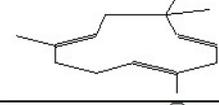
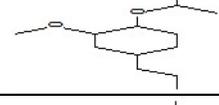
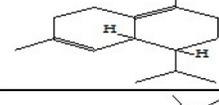
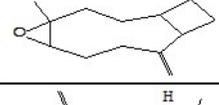
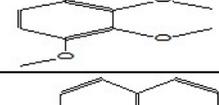
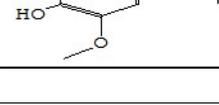
STAR<sup>®</sup> SW 9.20

Рисунок 2 – Термогравиметрический анализ клатрата β-циклодекстрина с эфирном маслом бутонов гвоздики

Анализ состава компонентов эфирного масла гвоздики, вошедшего в комплекс включения с β-ЦД (таблица 2), свидетельствует о том, что в состав комплекса вошли преимущественно терпеноидные соединения и

секвитерпены. Состав эфирного масла гвоздики и терпеновых соединений, вошедших в комплекс включения с  $\beta$ -ЦД, свидетельствует о том, что в нем доминируют соединения: эвгенол, изокариофиллен, эвгенил ацетат, кариофиллен оксид. Необходимо отметить, что полученные комплексы эфирного масла бутонов гвоздики с  $\beta$ -ЦД отличаются стабильностью и возможностью растворения в воде. Они легко дозируются при изготовлении кондитерских изделий и сохраняют аромат после термической обработки.

Таблица 2 – Относительное содержание (%) соединений в эфирном масле бутонов гвоздики и соединениях в клатрате с  $\beta$ -циклодекстрином

| № соединения | Соединение, моль. масса  | Формула  | Состав масла гвоздики | Состав веществ в $\beta$ -ЦД |
|--------------|--|--|-----------------------|------------------------------|
| 1            | Эвгенол, MV=164<br>CAS 25586-57-6                                    |    | 42.34                 | <b>69.35</b>                 |
| 2            | Изокариофиллен, MV=204<br>CAS 118-65-0                               |    | 11.24                 | <b>7.27</b>                  |
| 3            | Гумулен, MV=204<br>CAS 6753-98-6                                     |    | 1.55                  | 1.06                         |
| 4            | Эвгенил ацетат, MV=206<br>CAS 93-28-7                                |   | 25.26                 | <b>13.04</b>                 |
| 5            | $\delta$ -Кадинен, MV=204<br>CAS 483-76-1                            |  | <1                    | 1.02                         |
| 6            | Кариофиллен оксид, MV=220<br>CAS 1139-30-6                           |  | 4.53                  | <b>1.77</b>                  |
| 7            | Кариофилла-4(12),8(13)диен-5- $\alpha$ -ол, MV=220<br>CAS 19431-79-9 |  | 1.21                  | <1                           |
| 8            | 2',3',4' Триметоксиацетофенон,<br>MV=210<br>CAS 13909-73-            |  | 3.06                  | 1.19                         |
| 9            | цис-Изоэвгенол, MV=164<br>CAS 5912-86-7                              |  | 1.79                  | <1                           |
| Всего        |  |  | >90.98                | >94.7                        |

Включение в клатрат отдельных соединений определяется особенностями их химического строения [10]. Процентное содержание включения в комплекс с  $\beta$ -ЦД терпеноидных соединений представлен в таблице 3. Наиболее эффективно из эфирного масла гвоздики в клатрат

включились терпеноидные эфиры, содержание которых оказалось выше чем в исходном эфирном масле гвоздики.

Таблица 3 – Процентное содержание терпеновых соединений в эфирном масле гвоздики и в комплексе с циклодекстрином

| Терпеновые соединения       | Эфирное масло | Комплекс с ЦД |
|-----------------------------|---------------|---------------|
| Моноциклический секвитерпен | 1,55          | 1,06          |
| Бициклические секвитерпен   | 12,24         | 8,29          |
| Спирты                      | 1,21          | 1,0           |
| Эфиры                       | 76,98         | 86,35         |

Таким образом, разработан метод получения клатратов эфирного масла гвоздики с циклодекстрином, который позволяет включить преимущественно терпеноидные эфиры. Исследование особенностей химического состава эфирного масла бутонов гвоздики показало, что в его состав входит большое число биологически активных веществ различного химического строения: моно-, би- и трициклические монотерпены и секвитерпены, а также терпеноиды: спирты, эфиры, кетоны. Основными компонентами эфирного масла гвоздики, которые включаются в комплекс с циклодекстрином, являются эвгенол, изокариофиллен, эвгенил ацетат, кариофиллен оксид, содержание которых доминирует в полученных клатратах.

#### Список литературы:

1. Кустова, С.Д. Справочник по эфирным маслам / С.Д. Кустова. – М., 1978. – 175 с.
2. Туманова, Е. Ю. Энциклопедия эфирных масел / Е. Ю. Туманова. – М. : РИПОЛ, 2014. – 91 с.
3. Шутова, А.Г. Эфирные масла представителей рода *Pinus*, интродуцированных в центральном ботаническом саду НАН Беларуси / А.Г. Шутова, Е.В. Спиридович [и др.] // Труды БГУ. – 2009. – Т. 4, Ч. 2. – С. 226-236.
4. Dodziuk, H. Cyclodextrins and their complexes / H. Dodziuk. – Warsaw: Willey-VCH, 2006. – 486 p.
5. Кестнер, А.И. Применение циклодекстринов в биотехнологии и пищевой промышленности / А.И. Кестнер, Т.Б. Пальм // Итоги науки и техники. Сер. Микробиология. Циклодекстрины. – 1988 – т. 21, ч. 2.
6. Дихтярев, С.И. Медико-биологические характеристики циклодекстринов и применение их в медицине / С.И. Дихтярев, М.В. Штейнгард, Л.А. Чайка // Итоги науки и техники. Сер. Микробиология. Циклодекстрины. – 1988 – т. 20 – С. 97-136.
7. Капустин, М.А. Методы получения наноконплексов биологически активных веществ с циклическими олигосахаридами, анализ их физико-химических свойств и использование в пищевом производстве /

М.А. Капустин, А.С. Чубарова, Т.Н. Головач [и др.] // Труды БГУ. – 2016. – Т. 11, Ч.1. – С. 73-100.

8. Haresh M. Patel, Bhanubhai N. Suhagia, Shailesh A Shah and others Preparation and characterization of etoricoxib- $\beta$ -cyclodextrin complex prepared by the kneading method // Acta Pharm. – 2007. – 57 – P. 351-359.

9. Капустин, М.А. Получение и свойства наноструктур куркуминоидов с нативными и модифицированными циклическими олигосахаридами / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.П. Курченко, В.Г. Цыганков // Сб. материалов Междунар. науч-практ. конф. г. Саратов 12–16 июня 2017 г. – Саратов, 2017. – С. 240–246.

10. Schwingel L., Fasolo D., Holzschuh M. and others Association of 3-O-methylquercetin with  $\beta$ -cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies // J. of Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2008. – 62 – P. 149-159.

#### ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КЛАТРАТОВ ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ЭФИРНЫМ МАСЛОМ КАРДАМОНА

Тарасова Ю.В.<sup>1</sup>, Лодыгина С.В.<sup>1</sup>, Лодыгин А.Д.<sup>1</sup>, Капустин М.А.<sup>2</sup>, Ризевский С.В.<sup>2</sup>, Буткевич Т.В.<sup>2</sup>, Цыганков В.Г.<sup>3</sup>, Бондарук А.М.<sup>3</sup>, Филонюк В.А.<sup>4</sup>, Курченко В.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Кавказский государственный университет, г. Ставрополь

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет, Минск, kurchenko@tut.by

<sup>3</sup> РУП «Научно-практический центр гигиены», г. Минск

<sup>4</sup> Центральный аппарат Министерства здравоохранения Республики Беларусь, г. Минск

*Наиболее эффективно из эфирного масла кардамона в клатрат вошли: сабинен, линалоол, терпинен-4-ол, терпинеол, эвкалиптол, линалилацетат,  $\alpha$ -терпинил ацетат. Повышенное содержание этих терпеноидных соединений в клатратах, связано с особенностями их строения и физико-химическими свойствами. Разработанная методика получения клатратов эфирного масла кардамона с циклодекстрином, позволяет включить наиболее биологически активные вещества терпеноидной природы, способствующие улучшению пищеварения и аппетита. Это создает предпосылки для использования клатратов эфирного масла кардамона в кондитерских изделиях и напитках.*

**Введение.** Для улучшения консистенции, вкусовых качеств и питательной ценности пищевых продуктов используется добавление  $\beta$ -циклодекстрина ( $\beta$ -ЦД), в состав которых могут быть включены биологически активные вещества. Такая пищевая добавка может существенно изменять устойчивость и физические характеристики гетерофазных систем, в частности, эмульсий и пен [1 - 3]. При создании

функциональных продуктов питания важно обогатить их веществами, придающими им не только новые ароматы и вкусы, но и повышающие их пищевую ценность. При изготовлении многих кондитерских и других изделий используется эфирное масло кардамона.

Кардамон – многолетнее травянистое вечнозеленое тропическое растение с крупным корневищем, развивающим несколько стеблей высотой 2-3 м. Плоды -коробочки с многочисленными семенами. Родина кардамона Индия и Цейлон. Культивируется во многих странах Юго-Восточной Азии: Индии, Вьетнаме и др. В состав химических веществ семян кардамона входит эфирное масло 3-8%, состоящее из  $\alpha$ -терпинил ацетата, 1,8-цинеола, терпинеола, лимонена, неоролидола, линалоола,  $\alpha$ -пинена и др. Эфирное масло кардамона обладает выраженным тонизирующим действием, стимулирует работу мозга, способствует улучшению пищеварения, улучшает аппетит, обладает противовоспалительным, мочегонным, антиоксидантным свойствами [4, 5].

Целью работы являлось разработка технологии получения клатратов  $\beta$ -циклодекстрина с эфирным маслом кардамона и определение путей использования полученных комплексов.

#### **Материалы и методы**

В качестве объектов исследования был взят  $\beta$ -циклодекстрин (фармакопейный) ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>7</sub>, влажность 13,84 %. Содержание  $\beta$ -ЦД в сухом веществе не менее 98 %. Для получения комплексов  $\beta$ -циклодекстрина использовалось эфирное масло кардамона (фирма «Биаск», Россия).

Для получения комплексов включения эфирного масла кардамона с циклодекстринами использовали метод сорастворения и лиофилизации. Циклодекстрин растворяли в дистиллированной воде при температуре 80 °С на водяной бане до полного растворения. Раствор охлаждали до 60 °С и при перемешивании по каплям вносили спиртовой раствор эфирного масла. При этом наблюдалось постепенное помутнение раствора и образование мелкодисперсных частиц комплексов включения. Полученный раствор охлаждали в холодильнике до 5°С и центрифугировали для отделения клатратов. Полученные комплексы лиофильно высушивались. Полученный сухой порошок растирали до гомогенного состояния в ступке. Хранили в герметично закупоренных флаконах, при температуре  $10 \pm 2$  °С. Были получены комплексы включения эфирного масла кардамона при различных соотношениях циклодекстрина и эфирного масла: 1:0,1; 1:0,4; 1:0,7 и 1:1 [6-8].

Для оценки количества включенного в циклодекстрин эфирного масла использовался гравиметрический метод. Компоненты эфирного масла из полученных клатратов элюировались гексаном. Полученный высушенный циклодекстрин взвешивали и определяли количество экстрагированного масла [9 - 10].

Для газохроматографического анализа использовали по 1 мл растворов эфирного масла кардамона в гексане и элюат из комплекса включения с циклодекстрином. Исследования проводились на газовом хроматографе Agilent 6850, оснащенный масс-детектором Agilent 5975B. Использовалась капиллярная колонка DB-5MS длиной 60 м с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Процентный состав эфирных масел вычислялся по площадям пиков без использования поправочных коэффициентов. Качественный анализ основан на сравнении масс-спектров компонентов эфирного масла с соответствующими данными библиотеки масс-спектров NIST0.5a.

Термогравиметрическим методом анализировались образец комплекса включения ЦД с эфирным маслом кардамона, образец их физической смеси и образец циклодекстрина. Измерения проводились с помощью термоаналитической системы ТА - 4000 "Mettler Toledo" Швейцария. Использовалось программирование температуры в диапазоне 25 – 550 °С, скорость подъема температуры – 5 °С/мин [6 - 11].

### Результаты и обсуждение

Для использования клатратов β-ЦД с эфирным маслом кардамона были получены комплексы при различных соотношениях циклодекстрина и эфирного масла: 1:0,1; 1:0,4; 1:0,7 и 1:1. Определено количество эфирного масла в комплексах включения с циклодекстрином гравиметрическим методом. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Количество эфирного масла кардамона в комплексах включения с циклодекстрином

| Эфирные масла | масса                                    | Соотношение ЦД : эфирное масло |         |         |        |
|---------------|--|--------------------------------|---------|---------|--------|
|               |  | 1 : 0,1                        | 1 : 0,4 | 1 : 0,7 | 1 : 1  |
| Кардамон      | масса образца                            | 0,1003                         | 0,1001  | 0,1001  | 0,1002 |
|               | масса после сушки                        | 0,0867                         | 0,0840  | 0,0844  | 0,0831 |
|               | масса эфирного масла                     | 0,0136                         | 0,0161  | 0,0157  | 0,0171 |
|               | содержание масла в 1 гр                  | 0,1356                         | 0,1608  | 0,1568  | 0,1707 |
|               | количество включенного эфирного масла, % | 13,6                           | 16,1    | 15,7    | 17,1   |

Из полученных данных следует, что содержание активных компонентов эфирного масла кардамона в клатратах, полученных при соотношениях ЦД : эфирное масло – 1 : 0,1; 1 : 0,4; 1 : 0,7; 1 : 1 возрастает с 13,6; 16,1; 15,7 до 17,1% соответственно. Невысокий процент включения компонентов эфирного масла кардамона при увеличении его содержания по отношению к циклодекстрину в 10 раз, свидетельствует о различиях в структуре и свойствах компонентов масла. Это было подтверждено сравнительным газохроматографическим анализом эфирного масла кардамона и экстракта из комплекса включения.

Образование клатратов циклодекстрина с эфирным маслом кардамона, подтверждается термическим анализом. Термический анализ комплекса

включения эфирного масла кардамона с ЦД свидетельствует об его образовании. На рисунках 1, 2 представлены результаты термогравиметрического анализа ЦД и комплекса ЦД - эфирное масло кардамона.

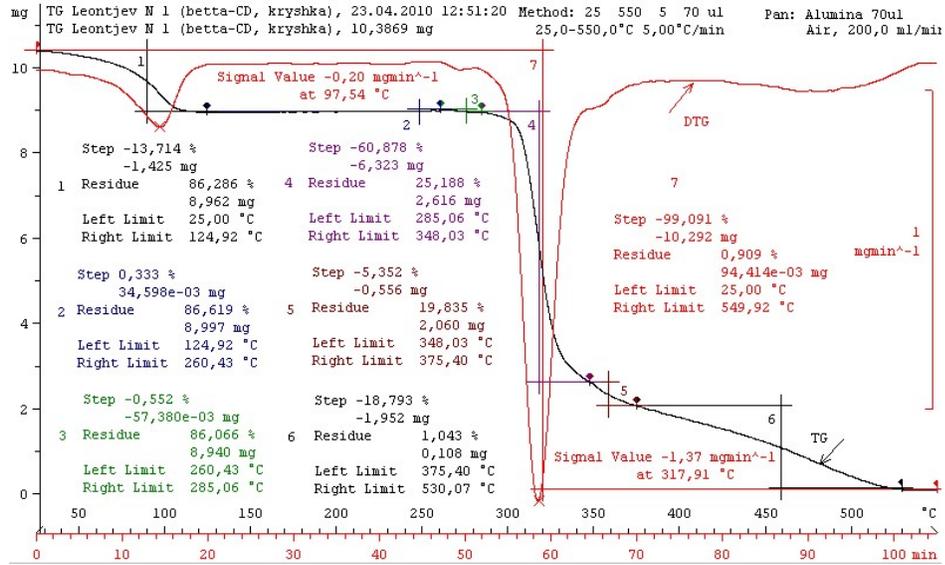


Рисунок 1 – Термогравиметрический анализ β-циклодекстрина

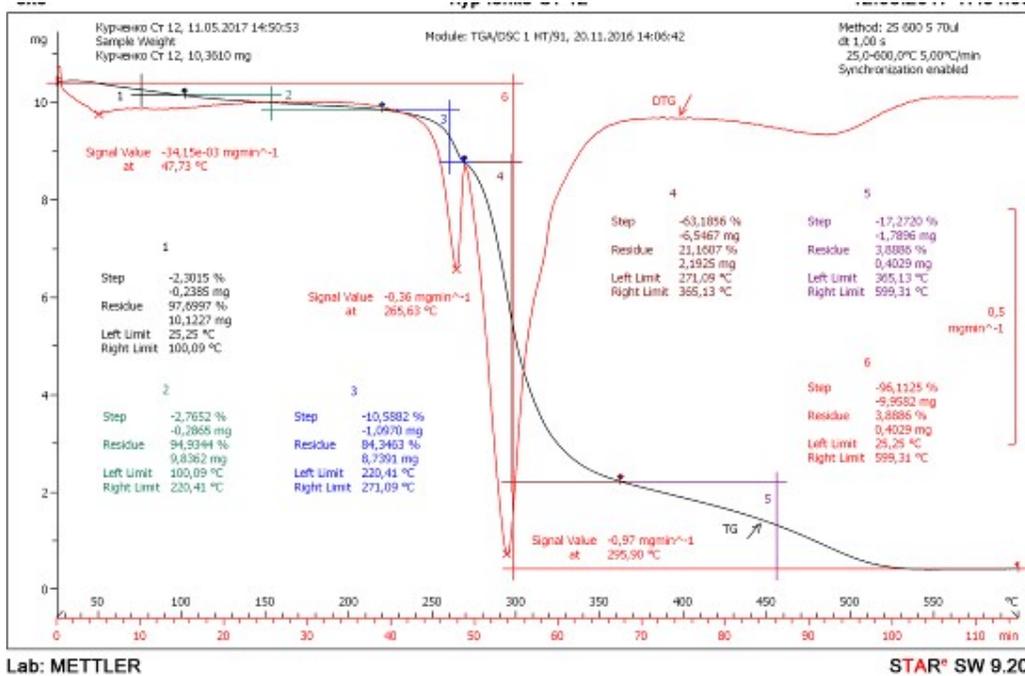


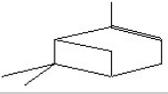
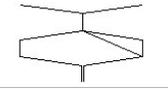
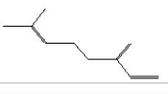
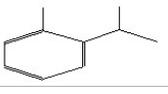
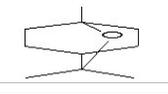
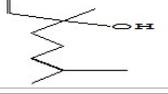
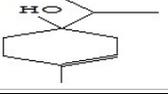
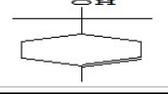
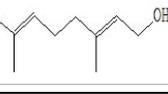
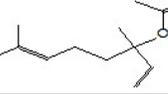
Рисунок 2 – Термогравиметрический анализ клатрата β-циклодекстрина с эфирным маслом кардамона

Сравнительный анализ термограмм показывает, что для клатрата эфирного масла кардамона характерен максимум тепловыделения при температуре 220,41 - 271,09 °С. При этом происходит сдвиг максимума

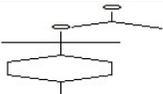
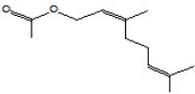
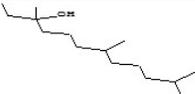
термического разложения ЦД с 320 °С до 295 °С. Эти результаты свидетельствуют об образовании комплексов включения.

Анализ состава эфирного кардамона, вошедшего в комплекс включения с  $\beta$ -ЦД (таблица 2), свидетельствует о том, что в состав клатрата вошли преимущественно эфиры терпеноидных соединений. Состав эфирного масла кардамона и терпеновых соединений, вошедших в комплекс включения с  $\beta$ -ЦД, свидетельствует о том, что в его составе вошли группы соединений: ациклический монотерпен -  $\beta$ -мирцен; моноциклический монотерпен - орто-цимен; бициклические монотерпены -  $\alpha$ -пинен, сабинен; спирты - линалоол, терпинен-4-ол, терпинеол, гераниол; эфиры - эвкалиптол, линалилацетат,  $\alpha$ -терпинил ацетат, геранил ацетат, (Е)-неролидол.

Таблица 2 – Относительное содержание (%) соединений в эфирном масле кардамона и терпеновых соединениях в клатрате с  $\beta$ -циклодекстрином

| № соединения | Соединение, моль. масса                   | Формула   | Состав масла кардамона | состав веществ в $\beta$ -ЦД |
|--------------|---|---|------------------------|------------------------------|
| 1            | 2   | 3   | 4                      | 5                            |
| 1            | $\alpha$ -Пинен<br>MV=136<br>CAS 80-56-8  |    | <1                     | 1.56                         |
| 2            | Сабинен,<br>MV=136<br>CAS 3387-41-5       |   | <1                     | <b>2.21</b>                  |
| 3            | $\beta$ -Мирцен<br>MV=136<br>CAS 123-35-3 |  | <1                     | 1.61                         |
| 4            | орто-Цимен,<br>MV=134<br>CAS 527-84-4     |  | <1                     | 1.41                         |
| 5            | Эвкалиптол,<br>MV=154<br>CAS 470-82-6     |  | 72.54                  | <b>38.85</b>                 |
| 6            | Линалоол,<br>MV=154<br>CAS 78-70-6        |  | 1.73                   | <b>2.59</b>                  |
| 7            | Терпинен-4-ол,<br>MV=154<br>CAS 562-74-3  |  | 3.97                   | <b>2.14</b>                  |
| 8            | Терпинеол,<br>MV=154<br>CAS 8000-41-7     |  | 3.16                   | <b>2.26</b>                  |
| 9            | Гераниол,<br>MV=154<br>CAS 106-24-1       |  | <1                     | 1.08                         |
| 10           | Линалилацетат,<br>MV=196<br>CAS 115-95-7  |  | <1                     | <b>2.12</b>                  |

Продолжение таблицы 2

| 1     | 2  | 3   | 4      | 5            |
|-------|--|---|--------|--------------|
| 11    | $\alpha$ -Терпинил ацетат, MV=196<br>CAS 80-26-2 |  | 10.67  | <b>33.95</b> |
| 12    | Геранил ацетат, MV=196<br>CAS 105-87-3           |  | <1     | 1.77         |
| 13    | (E)-Неролидол, MV=222<br>CAS 40716-66-3          |  | <1     | 1.26         |
| Всего |  |   | >92.07 | >92.81       |

Включение в клатрат отдельных соединений определяется особенностями их химического строения, что наглядно видно для соединений:  $\beta$ -мирцен, орто-цимен,  $\alpha$ -пинен, сабинен, линалоол, гераниол, линалилацетат,  $\alpha$ -терпинил ацетат, геранил ацетат, (E)-неролидол. Содержание этих веществ в комплексах включения значительно выше, чем в исходном эфирном масле кардамона. Процентное содержание включения терпеновых соединений в комплекс с ЦД представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Процентное содержание терпеновых соединений в эфирном масле кардамона и в комплексе с циклодекстрином

| Терпеновые соединения      | Эфирное масло | Комплекс с ЦД |
|----------------------------|---------------|---------------|
| Ациклический монотерпен    | 1,0           | 1,61          |
| Моноциклический монотерпен | 1,0           | 1,41          |
| Бициклические монотерпены  | 2,0           | 3,77          |
| Спирты                     | 9,86          | 7,77          |
| Эфиры                      | 86,21         | 95,83         |

Таким образом, наиболее эффективно из эфирного масла кардамона в клатрат вошли эфиры терпеноидных соединений, содержание которых существенно превысило их количество в исходном эфирном масле, что связано с особенностями их строения и физико-химическими свойствами. Основными компонентами эфирного масла кардамона, которые включаются в комплекс с циклодекстрином, являются сабинен, линалоол, терпинен-4-ол, терпинеол, эвкалиптол, линалилацетат,  $\alpha$ -терпинил ацетат. Разработанная методика получения клатратов эфирного масла кардамона с циклодекстрином, позволяет включить наиболее биологически активные вещества терпеноидной природы, способствующие улучшению пищеварения и аппетита. Это обстоятельство создает предпосылки для использования клатратов эфирного масла кардамона в кондитерских изделиях и напитках.

**Список литературы:**

1. Dodziuk, H. Cyclodextrins and their complexes / H. Dodziuk. – Warsaw: Willey-VCH, 2006. - 486 p.

2. Кестнер, А.И. Применение циклодекстринов в биотехнологии и пищевой промышленности / А.И. Кестнер, Т.Б. Пальм // Итоги науки и техники. Сер. Микробиология. Циклодекстрины. – 1988 – т. 21, ч. 2.
3. Дихтярев, С.И. Медико-биологические характеристики циклодекстринов и применение их в медицине / С.И. Дихтярев, М.В. Штейнгард, Л.А. Чайка // Итоги науки и техники. Сер. Микробиология. Циклодекстрины. – 1988 – т. 20 – С. 97-136.
4. Кустова, С.Д. Справочник по эфирным маслам / С.Д. Кустова. – М., 1978. – 175 с.
5. Туманова, Е. Ю. Энциклопедия эфирных масел / Е. Ю. Туманова. – М. : РИПОЛ, 2014. – 91 с.
6. Капустин, М.А. Получение и свойства комплексов включения циклодекстрина с диметилловым эфиром фталевой кислоты / М.А. Капустин, Н.В. Гавриленко, В.П. Курченко // Труды БГУ. – 2011. – Т. 6, ч. 2. – С. 126–133.
7. Капустин, М.А. Клатратные комплексы бета-циклодекстрина с синтетическими простаноидами / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.С. Радевич [и др.] // Биомика. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 1–5.
8. Капустин, М.А. Методы получения наноконплексов биологически активных веществ с циклическими олигосахаридами, анализ их физико-химических свойств и использование в пищевом производстве / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, Т.Н. Головач [и др.] // Труды БГУ. – 2016. – Т. 11, Ч.1. – С. 73-100.
9. Naresh M. Patel, Bhanubhai N. Suhagia, Shailesh A Shah and others Preparation and characterization of etoricoxib- $\beta$ -cyclodextrin complex prepared by the kneading method // Acta Pharm. – 2007. – 57 – P. 351-359
10. Капустин, М.А. Получение и свойства наноструктур куркуминоидов с нативными и модифицированными циклическими олигосахаридами / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.П. Курченко, В.Г. Цыганков // Сб. материалов Междунар. науч-практ. конф. г. Саратов 12–16 июня 2017 г. – Саратов, 2017. – С. 240–246.
11. Schwingel L., Fasolo D., Holzschuh M. and others Association of 3-O-methylquercetin with  $\beta$ -cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies // J. of Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2008. – 62 – P. 149-159.

## ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КЛАТРАТОВ ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ЭФИРНЫМ МАСЛОМ МУСКАТНОГО ОРЕХА

Тарасова Ю.В.<sup>1</sup>, Лодыгина С.В.<sup>1</sup>, Лодыгин А.Д.<sup>1</sup>, Капустин М.А.<sup>2</sup>, Ризевский С.В.<sup>2</sup>, Буткевич Т.В.<sup>2</sup>, Цыганков В.Г.<sup>3</sup>, Бондарук А.М.<sup>3</sup>, Филонюк В.А.<sup>4</sup>, Курченко В.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Северо-Кавказский государственный университет, г. Ставрополь

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, kurchenko@tut.by

<sup>3</sup>РУП «Научно-практический центр гигиены», г. Минск

<sup>4</sup>Центральный аппарат Министерства здравоохранения Республики Беларусь, г. Минск

*Наиболее эффективно из эфирного масла мускатного ореха в клатрат циклодекстрина вошли моно- и бициклические монотерпены, терпеноидные соединения: спирты, эфиры и кетоны, содержание которых существенно превысило их количество в исходном эфирном масле, что связано с особенностями их строения и физико-химическими свойствами. Разработанная методика получения клатратов эфирного масла мускатного ореха с циклодекстрином, позволяет включить разнообразные биологически активные вещества терпеновой природы, способствующие позитивному психоэмоциональному состоянию и улучшению аппетита. Это обстоятельство создает предпосылки для использования клатратов эфирного масла мускатного ореха в кондитерских изделиях и напитках.*

**Введение.** Циклодекстрины ( $\beta$ -ЦД) находят широкое применение в пищевой промышленности. Комплексы гидрофобных биологически активных веществ с циклодекстрином приобретают новые свойства: растворимость в воде, стабилизацию химических веществ и др. При производстве пищевых продуктов широко используются эфирные масла пряно-ароматических растений. Терпеновые соединения входящие в их состав не растворимы в воде, что затрудняет их практическое использование. Получение клатратов этих соединений с циклодекстрином позволяет расширить области использования эфирных масел [1 - 3].

Эфирное масло мускатного ореха отличается наличием в его составе: терпеновых спиртов - линалоол, борнеол, гераниол и других биологически активных соединений. Это масло оказывает психоэмоциональное воздействие, создавая атмосферу праздника, приятного возбуждения, азарта, помогает возникновению симпатии у мужчин и женщин, эмоционально раскрепощает [4, 5]. В связи с этим клатраты циклодекстрина с эфирным маслом мускатного ореха могут найти широкое применение в кондитерских и других пищевых продуктах.

Целью работы являлось разработка технологии получения клатратов  $\beta$ -циклодекстрина с эфирным маслом мускатного ореха и определение путей использования полученных комплексов.

## Материалы и методы

В качестве объектов исследования был взят  $\beta$ -циклодекстрин (фармакопейный) ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>7</sub>, влажность 13,84 %. Содержание  $\beta$ -ЦД в сухом веществе не менее 98 %. Для получения комплексов  $\beta$ -циклодекстрина использовалось эфирное масло мускатного ореха (фирма «Лазурин», Россия).

Для получения комплексов включения эфирного масла мускатного ореха с циклодекстринами использовали метод сорастворения и лиофилизации.

Циклодекстрин растворяли в дистиллированной воде при температуре 80 °С на водяной бане до полного растворения. Раствор охлаждали до 60 °С и при перемешивании по каплям вносили спиртовой раствор эфирного масла. При этом наблюдалось постепенное помутнение раствора и образование мелкодисперсных частиц комплексов включения. Полученный раствор охлаждали в холодильнике до 5 °С и центрифугировали для отделения клатратов. Полученные комплексы лиофильно высушивались. Полученный сухой порошок растирали до гомогенного состояния в ступке. Хранили в герметично закупоренных флаконах, при температуре 10 ± 2 °С. Были получены комплексы включения эфирного масла мускатного ореха при различных соотношениях циклодекстрина и эфирного масла: 1:0,1; 1:0,4; 1:0,7 и 1:1 [6-8].

Для оценки количества включенного в циклодекстрин эфирного масла использовался гравиметрический метод. Компоненты эфирного масла из полученных клатратов элюировались гексаном. Полученный высушенный циклодекстрин взвешивали и определяли количество экстрагированного масла .

Для газохроматографического анализа использовали по 1 мл растворов эфирного масла мускатного ореха в гексане и элюат из комплекса включения с циклодекстрином. Исследования проводились на газовом хроматографе Agilent 6850, оснащенном масс-детектором Agilent 5975B. Использовалась капиллярная колонка DB-5MS (сополимер 5%-дифенил-95%-диметилсилоксана) длиной 60 м с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Процентный состав эфирных масел вычислялся по площадям пиков без использования поправочных коэффициентов. Качественный анализ основан на сравнении масс-спектров компонентов эфирного масла с соответствующими данными библиотеки масс-спектров NISTO.5a [9, 10].

Термогравиметрическим методом анализировались образец комплекса включения ЦД с эфирным маслом мускатного ореха, образец их физической смеси и образец циклодекстрина. Измерения проводились с помощью термоаналитической системы TA - 4000 "Mettler Toledo" Швейцария. Масса исследуемой навески ~ 10,5 мг. Использовалось программирование температуры в диапазоне 25 – 550 °С, скорость подъема температуры – 5 °С/мин [6 - 11].

## Результаты и обсуждение

В зависимости от соотношения циклодекстрина и эфирного масла в клатраты включается различное количество соединений эфирного масла мускатного ореха. Определение количества эфирного масла в комплексах включения с циклодекстрином проведено с использованием гравиметрического метода. Из полученных данных следует, что содержание активных компонентов эфирного масла мускатного ореха в клатратах, полученных при соотношениях ЦД : эфирное масло – 1 : 0,1; 1 : 0,4; 1 : 0,7; 1 : 1 возрастает с 8,5; 16,3; 18,3 до 22,0 % соответственно. Высокий процент включения компонентов эфирного масла мускатного ореха при увеличении его содержания по отношению к циклодекстрину в 10 раз, свидетельствует о наличии среди компонентов эфирного масла веществ физико-химические свойства которых способствуют их включению в клатраты.

В связи с этим был проведен газохроматографический анализ с использованием масс-селективного детектора и термогравиметрия комплексов. Термический анализ комплекса включения эфирного масла мускатного ореха с ЦД свидетельствует об его образовании. На рисунке 1, представлены результаты термогравиметрического анализа комплекса ЦД - эфирное масло мускатного ореха.

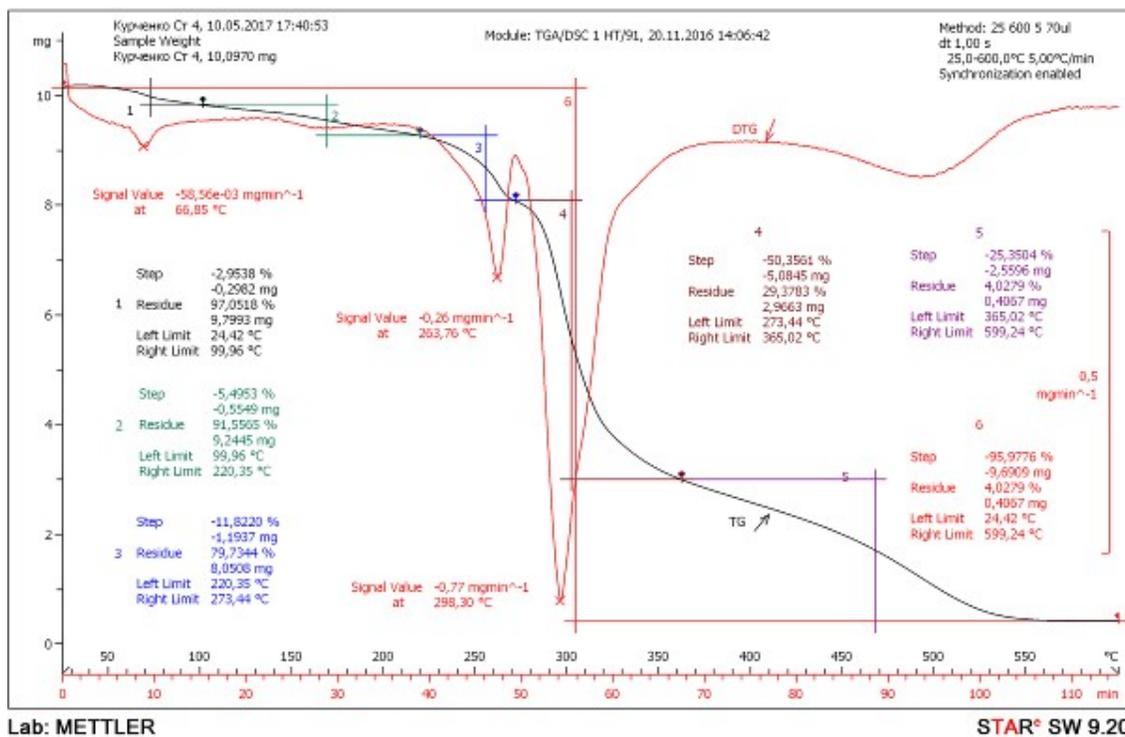


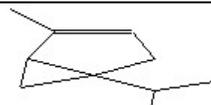
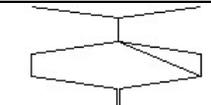
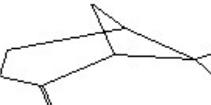
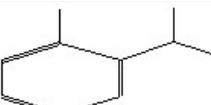
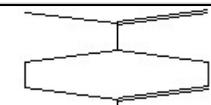
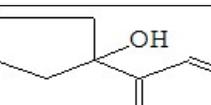
Рисунок 1 – Термогравиметрический анализ клатрата β-циклодекстрина с эфирным маслом мускатного ореха

Сравнительный анализ термограмм показывает, что для клатрата эфирного масла мускатного ореха характерен максимум тепловыделения при температуре 220,35 - 273,44 °С. При этом происходит сдвиг максимума

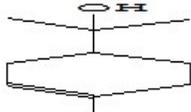
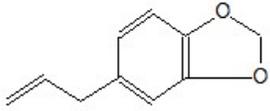
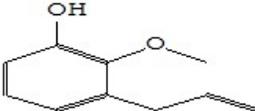
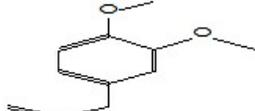
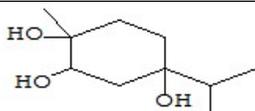
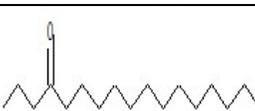
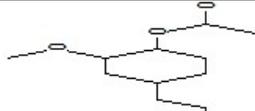
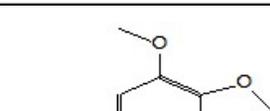
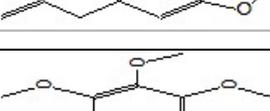
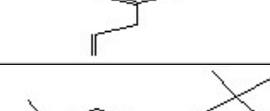
термического разложения ЦД с 320 °С до 295 °С. Эти результаты свидетельствуют об образовании комплексов включения.

Газохроматографический анализ состава терпеновых соединений эфирного масла мускатного ореха и веществ, вошедших в клатраты представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Относительное содержание (%) соединений в эфирном масле мускатного ореха и терпеновых соединениях в клатрате с β-циклодекстрином

| № соединения | Соединение, моль. масса  | Формула  | Состав масла муск. ореха | состав веществ в β-ЦД |
|--------------|--|--|--------------------------|-----------------------|
| 1            | 2  | 3  | 4                        | 5                     |
| 1            | α-Туйен, ММ=136<br>CAS 2867-05-2                                   |    | <1                       | <b>1.56</b>           |
| 2            | α-Пинен ММ=136<br>CAS 80-56-8                                      |    | 13.74                    | 11.83                 |
| 3            | Сабинен, ММ=136<br>CAS 3387-41-5                                   |    | 18.44                    | <b>21.5</b>           |
| 4            | β-Пинен, ММ=136<br>CAS 127-91-3                                    |  | 16.7                     | 11.17                 |
| 5            | орто-Цимен, ММ=134<br>CAS 527-84-4                                 |  | 3.17                     | <b>6.08</b>           |
| 6            | Сильвестрен, ММ=136<br>CAS 1461-27-4                               |  | 3.59                     | <1                    |
| 7            | D-Лимонен, ММ=136<br>CAS 5989-27-5                                 |  | <1                       | <b>5.39</b>           |
| 8            | Циклопентанол, 1-(1-метилен-2-пропенил)-, ММ=154<br>CAS 36971-11-6 |  | 1.55                     | <1                    |
| 9            | пара-Цимен-8-ол, ММ=150<br>CAS 1197-01-9                           |  | <1                       | 1.12                  |

Продолжение таблицы 1

| 1     | 2   | 3  | 4     | 5           |
|-------|---|--|-------|-------------|
| 10    | Терпинен-4-ол, ММ=154<br>CAS 562-74-3                       |    | 16.04 | 9.02        |
| 11    | Терпинеол, ММ=154<br>CAS 8000-41-7                          |    | 2.14  | 2.43        |
| 12    | Сафрол, ММ=162<br>CAS 94-59-7                               |    | <1    | <b>1.76</b> |
| 13    | Фенол, 2-метокси-3-(2-пропенил)-, ММ=164<br>CAS 25586-57-6  |    | 2.5   | <1          |
| 14    | Метилэвгенол, ММ=178<br>CAS 93-15-2                         |    | <1    | 1.1         |
| 15    | (1S,2S,4S)-тригидрокси-параментен, ММ=188<br>CAS 93861-30-4 |   | <1    | 1.84        |
| 16    | 4-Гептадеканон, ММ=254<br>CAS 53685-77-1                    |  | <1    | 1.08        |
| 17    | Эвгенил ацетат, ММ=206<br>CAS 93-28-7                       |  | 1.02  | <1          |
| 18    | Миристицин, ММ=192<br>CAS 607-91-0                          |  | <1    | <b>4.39</b> |
| 19    | Элемицин, ММ=208<br>CAS 487-11-6                            |  | <1    | <b>2.98</b> |
| 20    | Кариофиллен оксид, ММ=220<br>CAS 1139-30-6                  |  | 2.71  | <1          |
| Всего |   |  | >81.6 | >83.25      |

Анализ состава эфирного масла мускатного ореха, вошедшего в комплекс включения с  $\beta$ -ЦД (таблица 1), свидетельствует о том, что в состав

клатрата вошли преимущественно моно- и бициклические монотерпены:  $\alpha$ -Туйен,  $\alpha$ -Пинен, Сабинен,  $\beta$ -Пинен, орто-Цимен, Сильвестрен, D-Лимонен.

Включение в клатрат отдельных соединений определяется особенностями их химического строения. Содержание этих веществ в комплексах включения значительно выше, чем в исходном эфирном масле мускатного ореха. Процентное содержание включения терпеновых соединений в комплекс с ЦД представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Процентное содержание терпеновых соединений в эфирном масле мускатного ореха и в комплексе с циклодекстрином

| Терпеновые соединения       | Эфирное масло | Комплекс с ЦД |
|-----------------------------|---------------|---------------|
| Моноциклические монотерпены | 7,76          | 12,47         |
| Бициклические монотерпены   | 49,88         | 46,06         |
| Спирты                      | 19,59         | 15,41         |
| Эфиры                       | 10,23         | 10,25         |
| Кетоны                      | 1,0           | 1,08          |

Таким образом, наиболее эффективно из эфирного масла мускатного ореха в клатрат вошли моно- и бициклические монотерпены, терпеноидные соединения: спирты, эфиры и кетоны, содержание которых существенно превысило их количество в исходном эфирном масле, что связано с особенностями их строения и физико-химическими свойствами. Разработанная методика получения клатратов эфирного масла мускатного ореха с циклодекстрином, позволяет включить разнообразные биологически активные вещества терпеновой природы, способствующие позитивному психоэмоциональному состоянию и улучшению аппетита. Это обстоятельство создает предпосылки для использования клатратов эфирного масла мускатного ореха в кондитерских изделиях и напитках.

#### Список литературы:

1. Dodziuk, H. Cyclodextrins and their complexes / H. Dodziuk. – Warsaw: Willey-VCH, 2006. – 486 p.
2. Кестнер, А.И. Применение циклодекстринов в биотехнологии и пищевой промышленности / А.И. Кестнер, Т.Б. Пальм // Итоги науки и техники. Сер. Микробиология. Циклодекстрины. – 1988 – т. 21, ч. 2.
3. Дихтярев, С.И. Медико-биологические характеристики циклодекстринов и применение их в медицине / С.И. Дихтярев, М.В. Штейнгард, Л.А. Чайка // Итоги науки и техники. Сер. Микробиология. Циклодекстрины. – 1988 – т. 20 – С. 97-136.
4. Кустова, С.Д. Справочник по эфирным маслам / С.Д. Кустова. – М., 1978. – 175 с.
5. Туманова, Е. Ю. Энциклопедия эфирных масел / Е. Ю. Туманова. – М. : РИПОЛ, 2014. – 91 с.
6. Капустин, М.А. Получение и свойства комплексов включения циклодекстрина с диметилловым эфиром фталевой кислоты / М.А. Капустин,

Н.В. Гавриленко, В.П. Курченко // Труды БГУ. – 2011. – Т. 6, ч. 2. – С. 126–133.

7. Капустин, М.А. Клатратные комплексы бета-циклодекстрина с синтетическими простаноидами / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.С. Радевич [и др.] // Биомика. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 1–5.

8. Капустин, М.А. Методы получения наноконплексов биологически активных веществ с циклическими олигосахаридами, анализ их физико-химических свойств и использование в пищевом производстве / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, Т.Н. Головач [и др.] // Труды БГУ. – 2016. – Т. 11, Ч.1. – С. 73-100.

9. Naresh M. Patel, Bhanubhai N. Suhagia, Shailesh A Shah and others Preparation and characterization of etoricoxib- $\beta$ -cyclodextrin complex prepared by the kneading method // Acta Pharm. – 2007. – 57 – P. 351-359

10. Капустин, М.А. Получение и свойства наноструктур куркуминоидов с нативными и модифицированными циклическими олигосахаридами /М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.П. Курченко, В.Г. Цыганков // Сб. материалов Междунар. науч-практ. конф. г. Саратов 12–16 июня 2017 г. – Саратов, 2017. – С. 240–246.

11. Schwingel L., Fasolo D., Holzschuh M. and others Association of 3-O-methylquercetin with  $\beta$ -cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies // J. of Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2008. – 62 – P. 149-159.

## ОСОБЕННОСТИ АГРОТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СИЛИМАРИНА В КАЧЕСТВЕ ХЕЛАТОРА ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Чубарова А.С.<sup>1</sup>, Капустин М.А.<sup>1</sup>, Якимович Е.А.<sup>2</sup>, Курченко В.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет, г. Минск,

<sup>2</sup> РУП «Институт защиты растений», г. Прилуки,

*chubarova.hanna@gmail.com*

*Статья посвящена разработке агротехнологии выращивания расторопши пятнистой (*Silybum marianum* Gaertn.) в условиях Республики Беларусь с целью получения стандартизированного фармацевтического сырья по содержанию флаволигнанов, а также изучению способности отдельных флаволигнанов: силибинина, силикрестина и силидианина взаимодействовать с ионами тяжелых металлов. Проведена оценка влияния различных гербицидов на накопление и соотношение флаволигнанов в плодах этого лекарственного растения. Показано, что Эстамп, КЭ (3,0 л/га) проявляет высокую эффективность на посевах расторопши пятнистой, и не вызывает изменения в соотношении суммы флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой. Кроме того, выявлено, что силибинин, силикрестин*

*и силидианин образуют комплексные соединения с ионами меди (II) в соотношении 3:2, а ионами кобальта (II) и свинца (II) – в соотношении 1:1. Среди комплексов флаволигнанов с изученными металлами самыми прочными оказались комплексы со стехиометрией 1:1.*

**Введение.** Анализ состояния использования лекарственных средств в Республике Беларусь свидетельствует об увеличении спроса на лекарственные препараты растительного происхождения. Сложный комплекс биологических активных веществ лекарственных растений оказывает более мягкий, но, в то же время, достаточно выраженный лечебный эффект, что крайне важно при лечении заболеваний, носящих хронический характер [7].

Аптечная сеть и фармацевтическая промышленность испытывают определенный дефицит в сырье многих лекарственных растений. Общее количество растительных лекарственных средств, зарегистрированных в республике, превышает 300 наименований. Потребности в таких лечебных средствах удовлетворяются главным образом за счет их поставки из-за рубежа [7]. Хотя в последнее время отмечено увеличение объемов выпуска лекарственных средств из растительного сырья.

Низкая продуктивность лекарственных растений в настоящее время связана с устаревшей технологией их возделывания. Характерной чертой производства лекарственных растений остается использование ручного труда при проведении прополок, что ведет к удорожанию себестоимости производимой продукции и не позволяет расширять посевные площади данных культур. Поэтому одним из важнейших элементов интенсивной технологии возделывания лекарственных культур является применение химических средств защиты растений.

Среди агротехнологических факторов, определявших реализацию биологического потенциала лекарственных растений на долю мероприятий по борьбе с сорняками приходится от 25 до 75 % сохраненного урожая [3, 4].

Снижение численности и вредоносности сорных растений на плантациях лекарственных растений является одним из важнейших факторов получения высоких урожаев и стабилизации объемов посевных площадей. Достигнуть этого можно в т. ч. и за счет системы применения более широкого ассортимента высокоэффективных гербицидов в период вегетации культур.

Нами была поставлена цель – на основании установления влияния гербицидов, норм и сроков их применения на урожайность сырья расторопши пятнистой и его биохимические показатели обосновать систему защиты данной культуры от сорных растений для получения качественного сырья, соответствующего требованиям фармацевтической промышленности Республики Беларусь, а также выявить способность отдельных флаволигнанов взаимодействовать с ионами тяжелых металлов.

**Методы исследования.** Исследования по изучению эффективности гербицидов в борьбе с сорняками в посевах лекарственных растений

проводили в соответствии с общепринятыми методиками [6, 8]. Гербициды вносили методом сплошного опрыскивания ручным опрыскивателем «Jacto». Расход рабочего раствора 300 л/га. Были использованы следующие гербициды: Гезагард, КС (1,5 л/га), Гезагард, КС (2,0 л/га), Прометрекс Фло, КС (1,5 л/га), Прометрекс Фло, КС (2,0л/га), Прометрекс Фло, КС (2,0л/га), Стомп, КЭ (3,0 л/га), Эстамп, КЭ (3,0 л/га), Стомп профессионал, МКС (2,2 л/га). Гербициды вносили после посева до появления всходов культуры. С целью определения эффективности гербицидов ориентировочно через месяц проводили количественный, через полтора – количественно-весовой учет засоренности. За развитием расторопши пятнистой и сорняков проводили фенологические наблюдения [2]. Массовым наступлением фазы считали, когда в нее вступали 75 % культурных растений.

Для определения соотношений флаволигнанов в полученных плодах, а также для изучения хелатирующей способности индивидуальных флаволигнанов, в работе использовали силибинин, силикристин и силидианин, которые были получены по разработанной нами методике [9].

*Спектральная характеристика комплексов флаволигнанов с ионами меди (II), кобальта (II) и свинца (II).* За процессом комплексообразования следили спектрофотометрически на приборе Carry 50 (Varian, Австралия) с использованием кварцевых кювет (длина оптического пути 1 см). В кювету вносили 2 мл раствора лиганда (силибинин, силидианин и силикристин) в концентрации  $1 \times 10^{-3}$  моль/л и к нему последовательно добавляли по 2 мкл раствора соответствующей соли исследуемого металла в концентрации  $2 \times 10^{-2}$  моль/л до конечного объема 20 мкл. Спустя 1 минуту, записывали спектры поглощения в диапазоне длин волн 200–800 нм. Эксперимент повторяли с концентрацией ионов металла  $2 \times 10^{-1}$  моль/л. В качестве образца сравнения использовали растворы флаволигнанов. По изменениям в спектрах поглощения, характерных для чистых лигандов, определяли длину волны, соответствующую максимуму поглощения комплексов.

*Определение стехиометрического соотношения лиганда и иона металла при комплексообразовании.* Определение стехиометрических соотношений лигандов (флаволигнаны) и иона металла (меди (II), кобальта (II) и свинца (II)) проводили по методу Остромысленского-Джоба (метод непрерывных изменений или изомолярных серий) и по методу Бента-Френча [1].

*Определение прочности комплексов флаволигнанов и флавоноидов с ионами меди (II), кобальта (II) и свинца (II).* Прочность полученных комплексов оценивали по величине константы их образования, которые были определены по уравнению Накагуры [5].

**Результаты исследований.** При применении гербицидов на основе прометрина – Гезагард, КС (1,5 и 2,0 л/га) и Прометрекс Фло, КС (1,5 и 2,0 л/га) сорные растения погибали на 52,5–67,1 %, при этом численность мари белой снижалась на 95,9–100 %, проса куриного – на 40,8–59,8 %. При внесении гербицидов на основе пендиметалина – Стомпа, 33 % КЭ и

Эстамп, КЭ в норме 3,0 л/га, Стомп профессионал, МКС в норме 2,2 л/га мари белая погибала полностью, просо куриное – на 62,7–77,5 %. Общая гибель сорняков составляла 67,3–76,9 %. Наиболее оптимальные показатели гибели сорняков были получены от применения гербицидов на основе пендиметалина – Стомп, 33 % КЭ (3,0 л/га), Эстамп, КЭ (3,0 л/га), Стомп профессионал, МКС (2,2 л/га), а также гербицидов Гезагард, КС и Прометрекс Фло, КС в нормах 2,0 л/га. Результаты влияния применения гербицидов на урожайность расторопши пятнистой представлены в таблице 1.

В среднем за три года максимальную урожайность в посевах расторопши (12,7–12,8 ц/га семян) обеспечило применение гербицидов Стомп, 33 % КЭ и Эстамп, КЭ в нормах 3,0 л/га. Сохраненный урожай составил 5,2–5,3 ц/га. Гербициды Гезагард, КС, Прометрекс Фло, КС в норме 2,0 л/га и Стомп профессионал, МКС в норме 2,2 л/га недопустили потерь 3,8–4,4 ц/га урожая семян. Минимальные нормы внесения Гезагарда, КС и Прометрекса Фло, КС были менее эффективны с хозяйственной точки зрения, обеспечив повышение урожайности на 3,2–3,7 ц/га.

Таблица 1 – Влияние гербицидов на урожайность расторопши пятнистой (мелкоделяночный опыт, РУП «Институт защиты растений»)

| Вариант                            | Урожайность семян, ц/га |         |         |         | Сохраненный урожай, ц/га |
|------------------------------------|-------------------------|---------|---------|---------|--------------------------|
|                                    | 2013 г.                 | 2014 г. | 2015 г. | Среднее |                          |
| Контроль                           | 6,8                     | 10,6    | 5,2     | 7,5     | –                        |
| Гезагард, КС (1,5 л/га)            | 9,9                     | 12,7    | 9,7     | 10,7    | 3,2                      |
| Гезагард, КС (2,0 л/га)            | 10,9                    | 12,9    | 10,0    | 11,3    | 3,8                      |
| Прометрекс Фло, КС (1,5 л/га)      | 10,6                    | 13,4    | 9,5     | 11,2    | 3,7                      |
| Прометрекс Фло, КС (2,0 л/га)      | 11,6                    | 14,2    | 9,8     | 11,9    | 4,4                      |
| Стомп, 33 % КЭ (3,0 л/га)          | 11,9                    | 16,3    | 10,3    | 12,8    | 5,3                      |
| Эстамп, КЭ (3,0 л/га)              | 11,2                    | 16,6    | 10,2    | 12,7    | 5,2                      |
| Стомп профессионал, МКС (2,2 л/га) | 10,1                    | 13,9    | 10,4    | 11,5    | 4,0                      |
| НСР <sub>05</sub>                  | 2,6                     | 1,9     | 1,6     | 1,6–2,6 | –                        |

Таким образом, применение гербицидов Стомп, 33 % КЭ (3,0 л/га), Эстамп, КЭ (3,0 л/га), Стомп профессионал, МКС (2,2 л/га), Гезагард, КС (1,5–2,0 л/га) и Прометрекс Фло, КС (1,5–2,0 л/га) является высокоэффективным мероприятием контроля сорной растительности в посевах расторопши пятнистой. Самую высокую биологическую эффективность и максимальную урожайность в посевах расторопши обеспечило применение гербицидов Стомп, 33 % КЭ и Эстамп, КЭ в нормах 3,0 л/га.

После проведения уборки посевов и доведения семян до кондиционной чистоты и влажности для проведения анализов поделяночно были отобраны

пробы плодов. Было проведено сравнительное исследование состава флаволигнанов и их суммы в полученном урожае плодов расторопши пятнистой, выращенной с применением почвенных гербицидов. Сравнительный анализ состава силимаринов, полученных из плодов расторопши пятнистой, собранных с разных делянок, показал, что в результате обработки посевов расторопши почвенными гербицидами наблюдаются изменения как общего содержания флаволигнанов в плодах расторопши, так и содержания отдельных флаволигнанов. Результаты сравнительного анализа представлены в таблице 2.

Показано, что при применении почвенных гербицидов на основе прометрина происходит изменение соотношения флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой. На рисунке 1 представлены соотношения относительного содержания флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой при внесении: Гезагард, КС (1,5 л/га), Гезагард, КС (2,0 л/га), Прометрекс Фло, КС (1,5 л/га) и Прометрекс Фло, КС (2,0 л/га).

Таблица 2 – Изменение относительного содержания флаволигнанов и силимарина в исследуемых плодах расторопши пятнистой (в % от контроля) при применении почвенных гербицидов

| Название гербицида  | Силимарин | Силикристин | Силидианин | Силибинин  |
|---|-----------|-------------|------------|------------|
| Контроль (без обработки)  | 0,0       | 0,0         | 0,0        | 0,0        |
| Гезагард, КС (1,5 л/га)   | 28,2±0,7  | 27,6±0,5    | 28,7±0,4   | 27,3±0,6   |
| Гезагард, КС (2,0 л/га)   | -1,8±0,08 | -10,8±0,21  | 40,4±0,98  | -11,6±0,44 |
| Прометрекс Фло, КС (1,5 л/га)   | 15,4±0,6  | 26,3±1,3    | -34,8±1,2  | 26,9±0,78  |
| Прометрекс Фло, КС (2,0 л/га)   | 27,3±1,1  | 36,0±1,5    | -7,1±0,21  | 34,2±1,6   |
| Стомп, КЭ (3,0 л/га)  | 6,7±0,2   | 3,8±0,09    | 21,1±0,8   | 1,7±0,07   |
| Эстамп, КЭ (3,0 л/га)   | 6,0±0,12  | 4,6±0,14    | 12,1±0,57  | 3,6±0,1    |
| Стомп профессионал, МКС (2,2 л/га)  | -0,6±0,01 | -5,5±0,23   | 45,2±2,2   | -16,4±0,41 |
| Примечание: отрицательные значения обозначают снижение относительного содержания компонента |           |             |            |            |

Отношение силибинин/силикристин остается неизменным при использовании исследуемых гербицидов, в то время как соотношение силидианин/изосилибин снижается при использовании гербицидов Прометрекс Фло, КС (1,5 л/га) и Прометрекс Фло, КС (2,0 л/га). Отношение силибинина к силидианину в исследованных плодах снижается незначительно при применении Гезагард, КС (2,0 л/га), а при использовании

Прометрекс Фло, КС (1,5 л/га) значительно возрастает по сравнению с контрольной выборкой.

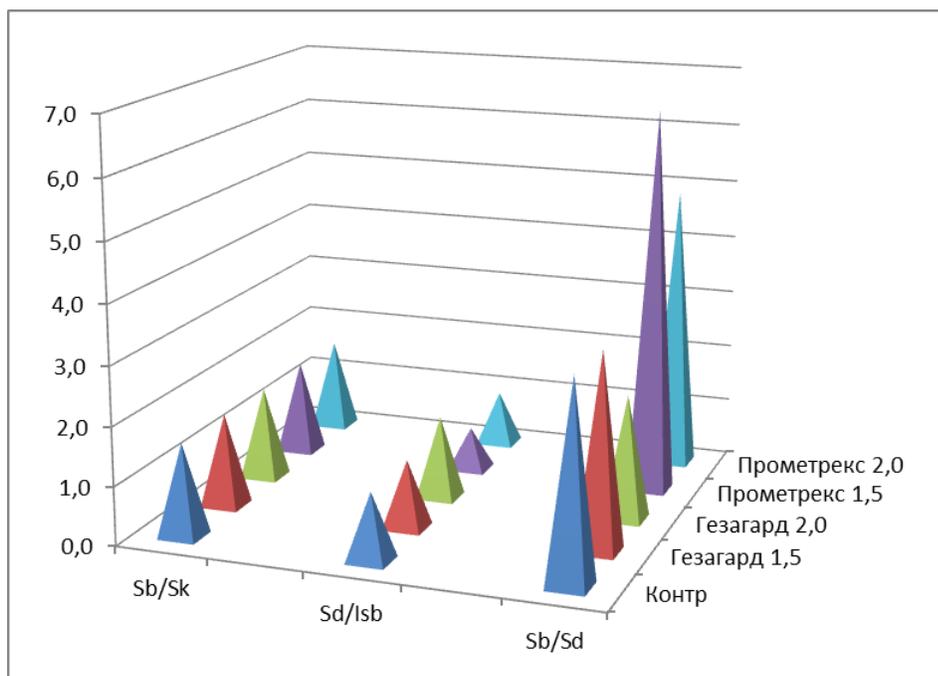


Рисунок 1 – Соотношение относительного содержания флаволигнанов в исследуемых плодах расторопши пятнистой при использовании почвенных гербицидов на основе прометрина

При внесении гербицидов на основе на основе пендиметалина – Стомп, КЭ (3,0 л/га), Эстамп, КЭ (3,0 л/га), Стомп профессионал, МКС (2,2 л/га) наблюдаются изменения соотношения флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой. На рисунке 2 представлены соотношения относительного содержания флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой при внесении Стомп, КЭ (3,0 л/га), Эстамп, КЭ (3,0 л/га), Стомп профессионал, МКС (2,2 л/га).

Отношение силибинин/силикрестин остается неизменным, в то время как соотношение силидианин/изосилибин повышается при использовании гербицида Стомп профессионал, МКС (2,2 л/га). Отношение силибинина и силидианина в исследованных плодах снижается при применении этого же гербицида по сравнению с контрольной выборкой. Остальные гербициды не приводят к существенным изменениям в соотношении флаволигнанов.

Показано, что рассчитанные отношения отдельных флаволигнанов могут быть индикаторами изменения соотношения силибинина, силидианина и силикрестина в силимаринах. Причем, отношение силибинина и силикрестина не является достаточно информативным, в то время как отношения силидианина и изосилибинина, силибинина и силидианина следует учитывать при анализе изменений в силимаринах плодов, выращенных в разных условиях. Отношение силибинина и силидианина в

плодах расторопши пятнистой играет важную роль не только при определении хеморасы, но также может предопределять биологическую активность этой фармацевтической субстанции, так как известно, что биологические активности отдельных флаволигнанов различаются.

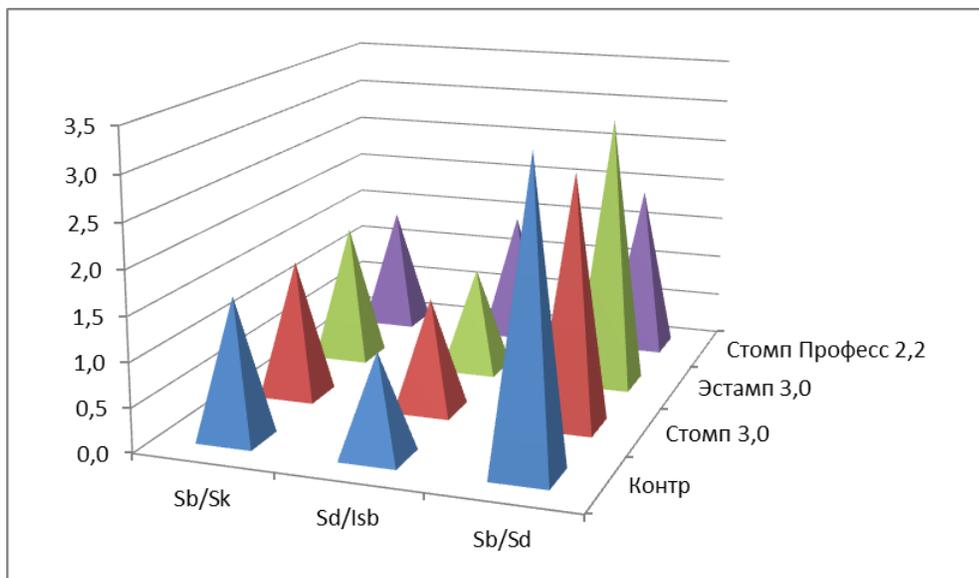


Рисунок 2 – Соотношение относительного содержания флаволигнанов в исследуемых плодах расторопши пятнистой при использовании почвенных гербицидов на основе пендиметалина

Согласно результатам полевых исследований самыми эффективными гербицидами, позволяющими значительно снизить засоренность сорняками посевов расторопши пятнистой, а также сохранить урожай являются: Прометрекс Фло, КС, Эстамп, КЭ и Стомп профессионал, МКС. Прометрекс Фло, КС приводит к увеличению общей суммы флаволигнанов на (15,4–27,3) % за счет увеличения содержания силикристина и силибинина, при условии снижения содержания силидианина. Отношение силибинина и силидианина при использовании этого гербицида значительно изменяется по сравнению с контрольной выборкой, что ставит под сомнение получение стандартизированного фармацевтического сырья. Эстамп, КЭ приводит к увеличению общей суммы флаволигнанов на (6,0±0,12) % за счет увеличения содержания всех компонентов силимарина, при условии значительного повышения содержания силидианина. Отношение силибинина и силидианина при использовании этого гербицида не изменяется по сравнению с контрольной выборкой. Стомп профессионал, МКС не приводит к изменению суммы флаволигнанов на фоне повышения содержания силидианина. Отношение силибинина и силидианина при использовании этого гербицида значительно снижается по сравнению с контролем.

Эстамп, КЭ (3,0 л/га) проявляет высокую эффективность на посевах расторопши пятнистой, позволяет сохранить урожай расторопши пятнистой

и не приводит к изменениям в соотношении суммы флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой, что важно при получении стандартизированного фармацевтического сырья. Принимая во внимание эффективность гербицидов, а также их влияние на содержание флаволигнанов в плодах, гербицид Эстамп, КЭ (3,0 л/га) может быть рекомендован к применению на посевах расторопши пятнистой, с целью получения стандартизированного сырья.

В водно-метанольной среде силибинин, силикристин и силидианин образуют комплексные соединения с ионами меди (II) в соотношении 3:2, а ионами кобальта (II) и свинца (II) – в соотношении 1:1. Комплексообразование сопровождается изменениями в спектрах поглощения исходных флаволигнанов в области полосы поглощения I, где происходит образование нового максимума поглощения. Следует отметить, что отсутствие двойной связи в кольце C у флаволигнанов ведет к образованию комплексов с более высокой стехиометрией.

Среди комплексов флаволигнанов с изученными металлами самыми прочными оказались комплексы со стехиометрией 1:1. Это комплексы флаволигнанов с ионами кобальта (II) и свинца (II).

Снижение прочности образующихся комплексов наблюдалось в последовательности: силикристин → силибинин → таксифолин → силидианин. Среди изученных ионов металлов снижение прочности комплексов с силибинином наблюдалось в следующей последовательности: кобальт (II) → свинец (II) → медь (II) [10].

Полученные результаты можно объяснить тем фактом, что расторопша пятнистая является рудеральным растением и встречается преимущественно вдоль дорог, а известно, что такие растения в процессе эволюции приобрели способность накапливать ионы тяжелых металлов в связанной форме в своих тканях, чтобы снизить их токсическое влияние на растительный организм. Вероятнее всего, эта способность реализуется за счет хелатирования флаволигнанами ионов тяжелых металлов.

**Выводы.** Проведено изучение биологической и хозяйственной эффективности применения гербицидов почвенного действия (Прометрекс Фло, КС, Гезагард, КС, Стомп, КЭ, Эстамп, КЭ и Стомп профессионал, МКС) в посевах расторопши пятнистой.

Проведенные исследования показали, что применение гербицидов до появления всходов расторопши пятнистой – высокоэффективный прием снижения засоренности посевов. Применение гербицидов Стомп, 33 % КЭ (3,0 л/га), Эстамп, КЭ (3,0 л/га), Стомп профессионал, МКС (2,2 л/га) после посева до всходов расторопши пятнистой снижает численность однолетних злаковых и двудольных сорных растений на 83,6–96,9 %, их массу – на 67,6–97,0 %, позволяет сохранить 4,0–5,3 ц/га семян культуры. Обработка посевов расторопши пятнистой в довсходовый период гербицидами Гезагард, КС и Прометрекс Фло, КС в нормах 1,5 и 2,0 л/га снижает численность однолетних

злаковых и двудольных сорных растений на 55,0–88,5 %, их массу – на 60,6–90,8 %, позволяет сохранить 3,2–4,4 ц/га семян культуры.

Эстамп, КЭ (3,0 л/га) проявляет высокую эффективность на посевах расторопши пятнистой, позволяет сохранить урожай расторопши пятнистой и не приводит к изменениям в соотношении суммы флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой, что важно при получении стандартизированного фармацевтического сырья. Принимая во внимание эффективность гербицидов, а также их влияние на содержание флаволигнанов в плодах, гербицид Эстамп, КЭ (3,0 л/га) может быть рекомендован к применению на посевах расторопши пятнистой, с целью получения стандартизированного сырья.

В водно-метанольной среде силибинин, силикрестин и силидианин образуют комплексные соединения с ионами меди (II), кобальта (II) и свинца (II) в разных соотношениях.

### **Список литературы:**

1. Pekal, A. Interaction of quercetin with copper ions: complexation, oxidation and reactivity towards radicals / A. Pekal, M. Biesaga, K. Pyrzynska // *Biometals*. – 2010. – Vol. 24, № 1. – P. 41–49.
2. Бейдеман И.Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ / И.Н. Бейдеман. – Новосибирск : Наука, 1974. – 156 с.
3. Загуменников, В.Б. Оптимизация культивирования лекарственных растений в нечерноземной зоне России / В.Б. Загуменников. – М. : РАСХН ВИЛАР, 2006. – 76 с.
4. Загуменников, В.Б. Особенности культивирования лекарственных растений в Нечерноземной зоне РФ : автореф. дис. ... докт. биол. наук : 06.01.13 / В.Б. Загуменников ; ВИЛАР РАСХН. – М., 2002. – 54 с.
5. Лапочкин, О.В. Получение и изучение комплексных соединений ванадила с аминокислотами: глицин,  $\alpha$ -аланин,  $\beta$ -аланин: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / О.В. Лапочкин; Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – Пятигорск, 2008. – 22 с.
6. Методические указания по проведению регистрационных испытаний гербицидов в посевах сельскохозяйственных культур в Республике Беларусь / РУП «Институт защиты растений»; сост. : С. В. Сорока, Т.Н. Лапковская. – Несвиж, 2007. – 58 с.
7. Постановление Совета Министров Республики Беларусь от 5 июля 2005 г. № 749 г. Минск «Об утверждении Государственной народно-хозяйственной программы развития сырьевой базы и переработки лекарственных и пряно-ароматических растений на 2005–2010 годы «Фитопрепараты».
8. Проведение полевых опытов с лекарственными культурами / под ред. к.с.х. наук А.И. Брыкина. – Лекарственное растениеводство. – Обзорная информ. – М. : «Минмедпром», 1981. – Вып. 1. – 60 с.

9. Способ получения индивидуальных флаволигнанов: патент Республики Беларусь № 20016 / А.С. Чубарова, В.П. Курченко; заявитель УО «Белорусский государственный университет». – Дата регистрации 28.12.2015.

10. Чубарова, А.С. Характеристика процесса комплексообразования гепатопротекторными флаволигнанами ионов меди (II), цинка (II), магния (II), кобальта (II) и свинца (II) / А.С. Чубарова, М.А. Капустин, В.П. Курченко // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2016. – Т. 11, ч. 2. – С. 236–247.

#### НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ РАСТИТЕЛЬНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Чухчин Д.Г., Новожилов Е.В., Болотова К.С., Тышкунова И.В., Малков А.В., Майер Л.В., Гурьянова А.А.

Северный Арктический федеральный университет им. М.В. Ломоносова,  
Архангельск

*В статье представлены исследования структуры микрофибрилл целлюлозы. Проведен сравнительный анализ дисперсности и степени кристалличности надмолекулярных структур целлюлозы растительного и бактериального происхождения.*

Биологическая конверсия целлюлозной биомассы в топливо, кормовые и пищевые продукты и химические вещества рассматривается в настоящее время как одна из ключевых отраслей биотехнологии. Это связано с необходимостью строить энергетику, химическую и микробиологическую промышленность на основе не ископаемого, обусловленного прогрессирующим дефицитом, а возобновляемого сырья [1]. Ключевым фактором, определяющим возможность переработки целлюлозы, является ее надмолекулярная структура. Процессы синтеза целлюлозы и формирования ее надмолекулярной структуры являются недостаточно изученными.

Синтез целлюлозы проходит внутри клеточной стенки растений, что является большим препятствием на пути изучения данного процесса. Рассмотреть процесс синтеза целлюлозы можно на более простом примере – синтезе целлюлозы, культивируемой бактериями рода *Acetobacter*. Обоснованием для такого выбора служит аналогия модификации кристаллической структуры целлюлозы I для растительной и бактериальной целлюлоз. Целлюлоза растений сосредоточена в микрофибриллах клеточной стенки. Различные слои стенки отличаются ориентацией микрофибрилл и хорошо различимы на микрофотографиях клеточной стенки можжевельника (рисунок 1, а). Несмотря на различную ориентацию, поперечные размеры

микрофибрилл во всех слоях клеточной стенки различных растений практически одинаковы.

В первичной стенке Р доля целлюлозы мала, и ее микрофибриллы образуют беспорядочную сетку. На радиальном сколе образца древесины ели (рисунок 1, б) показаны микрофибриллы в местах образования пор при формировании структуры волокна. Укладка микрофибрилл не имеет четкой ориентации, их поперечный размер составляет в среднем 30 нм. На фотографии тангенциального скола древесины березы (рисунок 1, в) изображен наружный слой  $S_1$ , в котором наблюдается спиральная ориентация микрофибрилл. Угол наклона микрофибрилл к оси волокна составляет для волокон либриформа и трахеид  $50...70^\circ$ . Для сравнения с древесными породами показан слой  $S_2$  на радиальном сколе в структуре соломы пшеницы (рисунок 1, г).

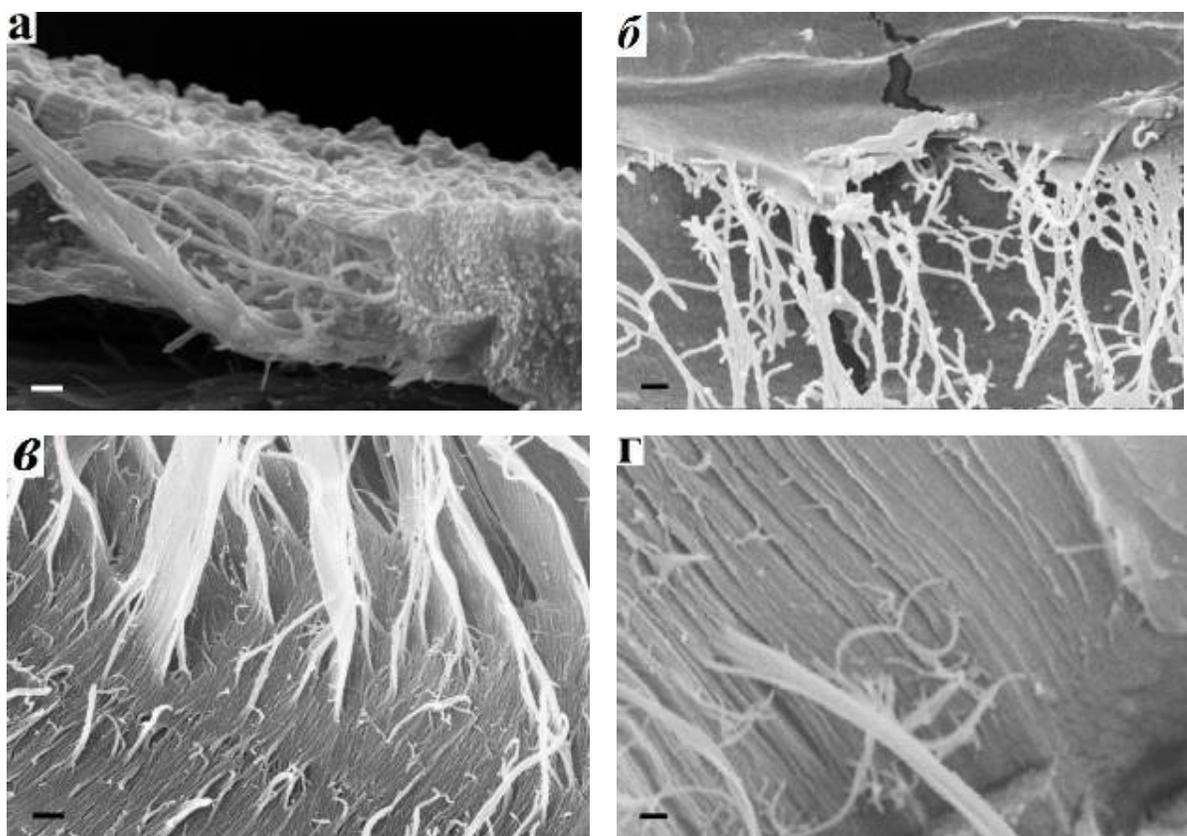


Рисунок 1 – Микрофибриллы целлюлозы растительного происхождения: а – скол клеточной стенки можжевельника; б – микрофибриллы слоя Р клеточной стенки ели; в – скол слоя  $S_1$  клеточной стенки березы; г – скол слоя  $S_2$  клеточной стенки соломы пшеницы (масштабная линейка: а, б, г – 200 нм, в – 100 нм)

Травянистые однолетние растения также имеют аналогичную локализацию слоев вторичной стенки, при которой внутренний слой  $S_2$  отличается высокой степенью ориентации микрофибрилл. Поперечный

размер микрофибрилл травянистых растений идентичен размеру микрофибрилл древесных пород.

Бактериальная целлюлоза (БЦ) не содержит примесей гемицеллюлоз и лигнина, обладает более упорядоченной структурой, чем другие виды природных целлюлоз. При синтезе БЦ в качестве продуцента использовали симбиотическую популяцию живых микроорганизмов, представляющую собой смешанную культуру уксуснокислых бактерий *Acetobacter* с дрожжами. Культивирование клеток проводили на синтетическом глюкозном субстрате. Нарращивание биомассы и культивирование продуцентов целлюлозы проводили с использованием термостата Environmental Shaker-Incubator ES-20 BioSan. Моделирование температуры и влажности среды обеспечивали в климатической камере Binder KBWF.

На рисунке 2 а-г представлены клетки *A. xylinum*, синтезирующие целлюлозные микрофибриллы.

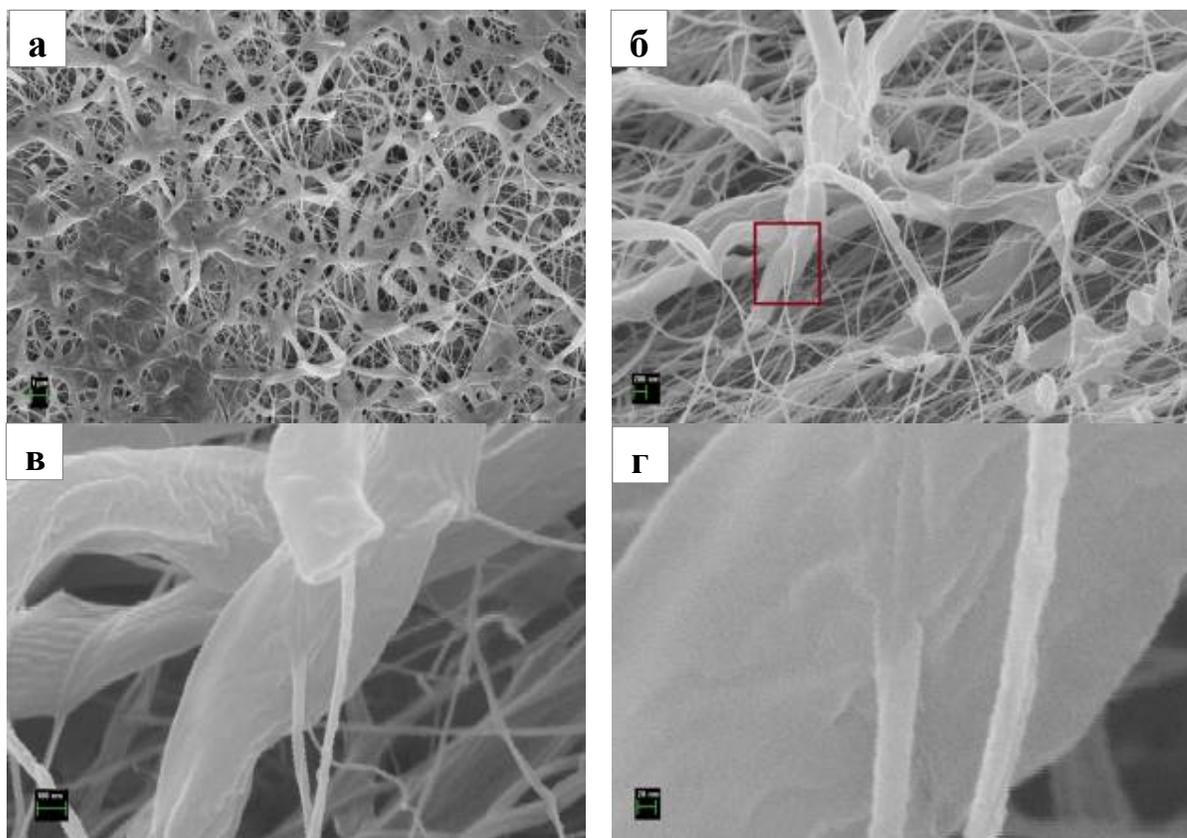


Рисунок 2 – Клетка *A. xylinum*, синтезирующая целлюлозные микрофибриллы, SEM Sigma VP ZEISS (масштабная линейка: а – 1 мкм; б – 200 нм; в – 100 нм; г - 20 нм)

Изображения на рисунке 2, в и г, позволяют сделать предположение, что ферменты, формирующие микрофибриллы целлюлозы, находятся примерно в 100 нм от точки синтеза кристаллической структуры. Таким образом, синтезирующие целлюлозные микрофибриллы ферменты не являются мембранными белками. Пучки микрофибрилл непосредственно

контактируют с клеточной оболочкой и остаются ассоциированными с клеткой.

Среднее значение толщины микрофибрилл целлюлозы слоя  $S_2$  древесины можжевельника обыкновенного составляет около 30 нм (рисунок 3). В отличие от растительной целлюлозы (РЦ), распределение микрофибрилл БЦ имеет два пика на гистограмме в диапазонах 25...35 и 45...50 нм, кривая распределения носит бимодальный характер. Пик в диапазоне 45...50 нм отвечает поперечным размерам «сдвоенных» микрофибрилл. Бимодальный характер кривой указывает на способность микрофибрилл к параллельной укладке и парной самоорганизации. Учитывая статистически близкое распределение размеров микрофибрилл целлюлозы растительного и бактериального происхождения, а также аналогичное кристаллическое строение образцов, можно предположить наличие идентичных этапов биосинтеза слоя  $S_2$  в растениях и бактериальной целлюлозе.

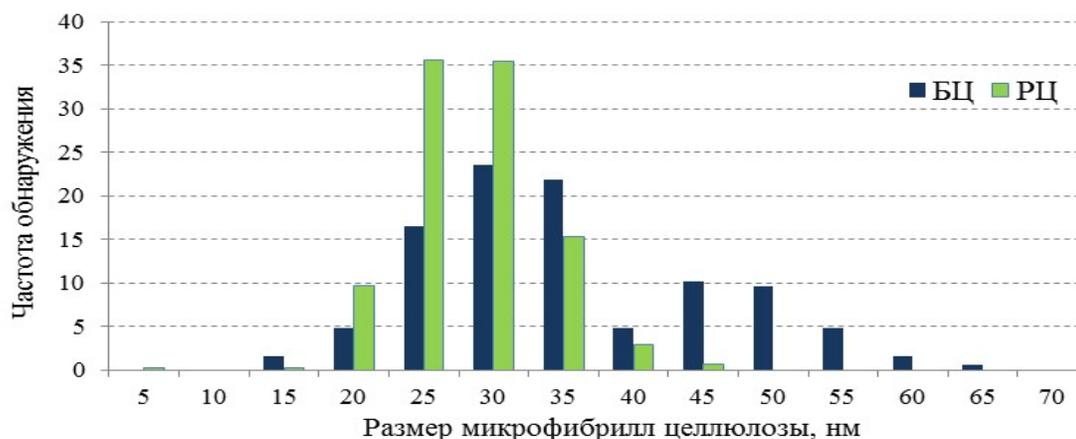


Рисунок 3 – Распределение по размеру микрофибрилл целлюлозы слоя  $S_2$  древесины можжевельника обыкновенного (РЦ) и бактериальной целлюлозы (БЦ)

БЦ обладает высоко упорядоченной структурой и может служить эталоном для сравнительного анализа степени кристалличности различных образцов целлюлозы. Для удаления низкомолекулярных примесей БЦ гомогенизировали и обрабатывали диоксидом хлора в течение 2 ч. Образец БЦ промывали, замораживали и лиофильно высушивали на установке FreeZone (Labconco, США). Образцы микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) получали из БЦ кипячением ее в 2,5 н HCl в течение 2,5...8 ч. Пробы отмывали от кислоты до нейтральной реакции и лиофильно высушивали. Оценку размера и формы микрокристаллитов МКЦ проводили методом электронной микроскопии на микроскопе SEM Sigma VP ZEISS. Для записи дифрактограмм использовали рентгеновский дифрактометр XRD-7000S (Shimadzu, Япония). Диапазон сканирования по углу  $2\Theta$ : 10...70°, скорость

сканирования 0,5 град/мин, шаг 0,02°. Степень кристалличности БЦ рассчитывали по новому методу [3], позволяющему с высокой точностью определять кристалличность веществ и их смесей, исключая различные субъективные факторы.

Степень кристалличности МКЦ бактериального происхождения имеет максимальное значение после гидролиза БЦ в течение 4 ч (рисунок 4).

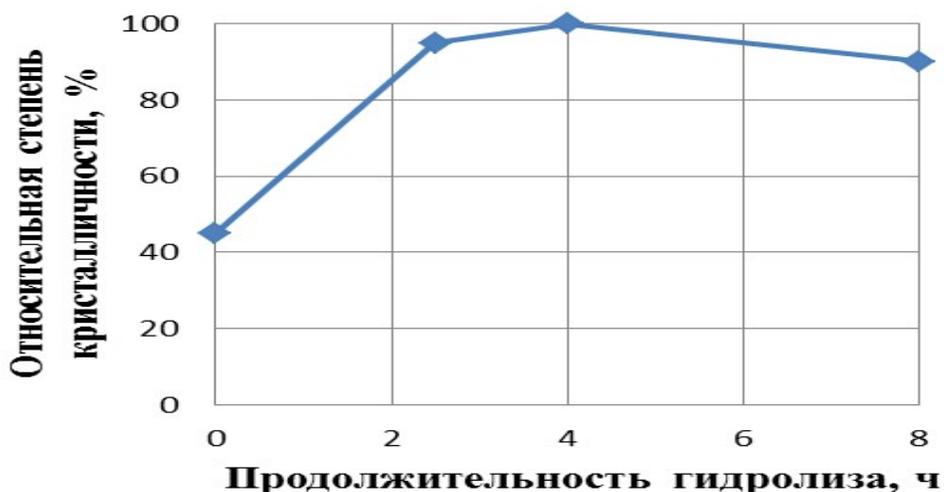


Рисунок 4 – Зависимость степени кристалличности МКЦ бактериального происхождения от продолжительности кислотного гидролиза БЦ

Значение этого показателя выше в 2 раза, чем у исходного образца БЦ. Степень кристалличности целлюлозосодержащих материалов относительно МКЦ из БЦ составляет для древесины ели – 35,7 %, для сульфатной хвойной беленой целлюлозы - 41,7 %, для МКЦ из хлопка – 72,7 %.

Обнаружены топохимические отличия образцов БЦ и растительной (хлопковой) целлюлозы после их кислотного гидролиза (рисунок 5).

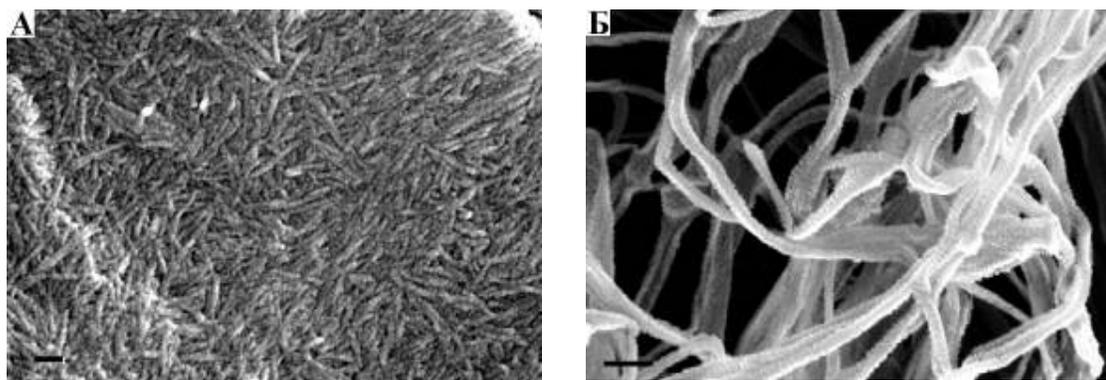


Рисунок 5 – Образцы микрокристаллической целлюлозы: а – МКЦ из хлопковой целлюлозы, б – МКЦ из бактериальной целлюлозы. Масштабная линейка 100 нм

В микрофибриллах хлопковой целлюлозы регулярно чередуются аморфные и кристаллические участки. После гидролиза аморфных участков

остаются веретенообразные кристаллиты длиной 200-300 нм (рисунок 5а). При гидролизе БЦ микрофибриллы уменьшаются в диаметре без укорочения (рис. 5б), то есть аморфные участки микрофибрилл БЦ расположены только на их поверхности.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО “Арктика” (САФУ им. М.В. Ломоносова).

#### **Список литературы:**

1. Сеницын, А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов [Текст] / А.П. Сеницын, А.В. Гусаков, В.М. Черноглазов: учеб. пособие. М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
2. Colvin J.R. The Mechanism of Formation of Cellulose-Like Microfibrils in a Cell-Free System from *Acetobacter xylinum* // *Planta*. – 1980. – Vol. 149. – No. 2. – P. 97–107.
3. Чухчин Д.Г., Малков А.В., Тышкунова И.В., Майер Л.В., Новожилов Е.В. Способ дифрактометрического определения степени кристалличности веществ // *Кристаллография*. – 2016. – № 3. – С. 375-379.

#### **КРИОФАРМАКОЛОГИЯ: ПРОДУКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

Шабунин С.В., Востроилова Г.А.

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, г. Воронеж, svshabunin@rambler.ru

*Статья посвящена новому направлению в ветеринарной фармакологии – криофармакологии, предмет изучения которой являются субстанции и лекарственные формы, полученные методом криофракционирования биологических тканей. Показан широкий спектр биологической активности тканевых препаратов на примере криофракционирования свиной плаценты. Установлено, что данные препараты не обладают тератогенным, канцерогенным, аллергенным, иммунотоксическим действием, не проявляют мутагенную активность.*

В последние годы в ветеринарной фармакологии наметилась тенденция к созданию и использованию препаратов, изготовленных из природного сырья, поскольку многие из них обладают разносторонней биологической активностью и, в то же время, безвредны для организма [1, 5].

Из всего спектра технологий получения БАВ из природного материала наиболее перспективными и преобладающими по ряду качественных характеристик являются криогенные технологии, при реализации которых перерабатываемое сырье находится при отрицательных температурах, что обеспечивает ингибирование окислительных процессов, денатурации и диссоциации наиболее важных молекулярных комплексов. И как результат,

получение биологически активной субстанции с наиболее полно сохраненной нативной структурой широкого спектра биологически активных веществ (белков, витаминов, минеральных веществ, фосфолипидов и т.д.) [2, 4].

К настоящему времени имеется большое количество публикаций об использовании различных органов и тканей для создания лекарственных средств, но наиболее эффективными из тканевых препаратов в медицине и ветеринарии являются биорегуляторы, получаемые из плаценты человека и животных [3, 5].

На основе липофильной фракции плаценты свиной разработан препарат **"липотон"**. Основное действующее вещество липотона – это комплекс липофильных веществ тканей плаценты свиной, включающий большое количество фосфолипидов, стерина, жирных кислот, витаминов и т.д. Анализ химического состава липотона позволяет отнести его к группе гепато- и мембранопротекторов.

Гидрофильная фракция свиной плаценты, содержащая свободные аминокислоты послужила источником действующего вещества для препарата **"аминотон"**.

Как сами субстанции: липофильная и гидрофильная фракция плаценты свиной, получаемые методом криофракционирования, так и разработанные на их основе препараты, по степени токсичности относятся к IV классу опасности – малоопасные вещества (ГОСТ 12.1.007-76). Препараты не обладают тератогенным, канцерогенным, аллергенным, иммунотоксическим действием, не проявляют мутагенную активность.

При изучении влияния липотона и аминотона на фагоцитарную активность макрофагов перитонеального экссудата мышей было установлено, что аминотон и липотон оказывают выраженное воздействие на одну из основных функций фагоцитов – их переваривающую способность, повышая индекс завершенности фагоцитоза с 19,1% в контроле до 67% (аминотон) и до 54% (липотон), т.е. данные препараты обладают достаточно выраженным иммуномодулирующим действием.

Изучение противовоспалительных свойств липотона и аминотона на различных моделях воспаления позволило установить, что препараты оказывают лечебное действие на стадии локального воспаления и их противовоспалительная активность сравнима с эффективностью ортофена и дексаметазона. Так липотон угнетал каррагениновое воспаление на 46%, аминотон – на 40,2%. Формалиновое воспаление липотон снижал на 52%, аминотон – на 43,6%. На модели асептического экссудативного воспаления, вызванного зимозаном, через 3 часа после введения суспензии зимозана увеличение объема лапы крыс было меньше, чем в контроле на 87% (липотон) и 51% (дексаметазон).

Противоязвенное действие липотона и аминотона изучали на модели, вызываемой совместным введением дексаметазона и диклофенака. В качестве препарата сравнения использовали ПДЭ и известный

противоязвенный препарат фамотидин. Под влиянием липотона происходит уменьшение количества язвенных поражений слизистой оболочки желудка (СОЖ), по сравнению с животными контрольной группы на 79,7%, а также в сравнении с животными, которым применяли ПДЭ - на 57,8%. Противоязвенный эффект липотона был соизмерим с эффективностью, известного противоязвенного препарата – фамотицина.

Репаративные свойства аминотона и липотона изучены на модели полнослойной раны. Наиболее эффективным оказался липотон. Полное заживление полнослойной раны у животных, которым липотон вводили внутримышечно, наступило на 15-17 день, при применении аминотона – на 16-18 день. У животных контрольной группы полное заживление раны наступило на 26-27 день после нанесения травмы.

На модели токсического повреждения печени, было установлено, что применение липотона значительно снижало степень увеличения активности трансаминаз в сыворотке крови. Применение эссенциале препятствовало цитолитическому действию гепатотоксина в несколько меньшей степени.

Наряду с этим, при применении липотона в меньшей степени (на 14,7%), чем при применении эссенциале (на 78,6%) повышалась активность и маркерного фермента холестаза – щелочной фосфатазы. Липотон в дозе 5,0 мкг/кг (по ДВ) при CCl<sub>4</sub>-интоксикации так же препятствовал росту уровня креатинина (на 8,7%), мочевины (на 24%) и холестерина (на 71,7%).

На модели эмоционально-физической нагрузки (тест плавания мышей), установлено, что липотон при внутримышечном введении эффективно повышает физическую выносливость животных на 61,7-63,7%. Наличие этого эффекта наблюдается в течение 2 суток (срок наблюдения). У аминотона же максимум активности установлен в течение первых суток после его применения в дозе 0,1 мл/кг. Длительность плавания мышей по сравнению с контролем возрастает на 35,5 %, соответственно. К концу 2-х суток эффективность аминотона несколько снижается.

На модели эмоционально-болевого стресса (иммобилизация) было показано наличие у плацентарных препаратов адаптогенного действия.

Установлено, что липотон и аминотон во всех изученных дозах, хотя и в разной степени, обеспечивают предупреждение стрессогенного снижения массы тела животных на 18,0-45,9%. При этом, антиульцерогенные свойства липотона проявляются на фоне действия всех испытанных доз.

Обобщив результаты доклинических исследований, с учетом широкого спектра биологической активности препаратов свиной плаценты, были проведены производственные испытания.

Установлено, что применение данных тканевых препаратов оказывало выраженное стимулирующее действие на показатели гуморального звена неспецифической иммунологической резистентности. У 2-месячных телят, обработанных **ЛИПОТОНОМ**, отмечено повышение в сыворотке крови бактерицидной активности на 16,6%, лизоцимной активности на 30,9% и

содержание общего комплемента – на 38,9%, по сравнению с контролем. Аналогичные изменения происходили и под влиянием **аминотона**.

Липотон обладает ярко выраженной терапевтической эффективностью при акушерско-гинекологических патологиях. Его применение за 20 дней до отела приводило к активизации родовой деятельности: время выведения плода сокращалось на 45,6%, время отделения последа – на 34,4%, по сравнению с контролем. При этом, в контрольной группе у 21,3% животных отмечалось задержание последа, в то время как в опытной группе (применение липотона) - у 5,6% коров.

Таким образом, с помощью криогенных технологий и выбора исходного сырья (плацента, эмбрионы, селезенка, костный мозг, ткани растительного происхождения и т.д.) можно получать субстанции с прогнозированной специфической активностью, а безвредность и высокая биологическая их активность обуславливает перспективность применения данных препаратов как в гуманной, так и в ветеринарной медицине.

#### **Список литературы:**

1. Грищенко, О.В. Достижения и перспективы развития клеточной и тканевой терапии / В.И. Грищенко // Международный медицинский журнал. – 1999. – т.5 (4). – С. 6-10.
2. Логай, И.М. Тканевая терапия по методу академика В.П. Филатова, основные направления и перспективы ее развития / И.М. Логай, В.П. Соловьева, Е.П. Сотникова // Офтальмологический журнал. –1995. – №2. – С. 68-72.
3. Нежданов, А.Г. Препарат «Плацента активное начало» и эффективность его применения для профилактики и терапии послеродовых заболеваний у коров / А.Г. Нежданов, К.А. Лободин, М.Г. Денисенко и др. // Новые фармакологические средства для животноводства и ветеринарии: матер. научно-практ. конф., Краснодар, 2001. – Т.2. – С. 91-92.
4. Обухова, Л.К. Молекулярные механизмы замедления старения антиоксидантами / Л.К. Обухова, Н.М. Эммануэль // Общие проблемы биологии / ВИНТИ. – 1984. – Т.4. – С. 44-80.
5. Пальчиков, А.Ю. Бионормализующее действие препарата из плаценты при задержании последа у коров / А.Ю. Пальчиков // Науч.-техн. Прогресс в животноводстве России – ресурсосберегающие технологии пр-ва экол. Безопаснос. Продукции животноводства. – Дубровицы, 2003. – Ч.2. – С.7-9.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЭКСТРАКТАХ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС  
Элькаиб Х.М., Феськова Е.В., Леонтьев В.Н., Игнатовец О.С.  
Учреждение образования «Белорусский государственный  
технологический университет», г. Минск, leontiev@belstu.by

*Методом ВЭЖХ-МС установлено, что в водно-спиртовых экстрактах пажитника сенного содержится изоориентин, ориентин, витексин и изовитексин; тимьяна обыкновенного – диосмин, байкалин, розмариновая кислота и эриодиктиол; ромашки аптечной – кверцимеритрин и герниарин; ладанника шалфеелистного – кемпферол.*

**Введение.** Флавоноиды, содержащиеся в различных лекарственных растениях, являются фармакологически активной группой биологических веществ и обладают противовоспалительным, спазмолитическим, дезинфицирующим, кровоостанавливающим, регенерирующим, кардиопротекторным, антиоксидантным и др. действием.

Большинство исследований по идентификации индивидуальных флавоноидов в лекарственных растениях основаны на определении их физико-химических характеристик, что требует высокой степени очистки образцов. Оптимальным методом по идентификации флавоноидов в экстрактах лекарственных растений является метод ВЭЖХ-МС (последовательное использование диодноматричного и масс-спектрометрического детекторов). Данный метод обладает большой информативностью и позволяет определять структуру флавоноидов.

Объектами исследования были лекарственные растения пажитник сенной (*Trigonella foenum-graecum* L.), тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris* L.), ромашка аптечная (*Matricaria chamomilla* L.), ладанник шалфеелистный (*Cistus salviifolius* L.), приобретенные на рынке Ливии.

Цель исследования – анализ и идентификация флавоноидов в экстрактах вышеперечисленных растений.

**Экспериментальная часть.** Водно-спиртовую экстракцию проводили 50%-м этиловым спиртом в течение 2 суток при 20°C. Экстракты анализировали при помощи хроматомасс-спектрометра (Waters, США) с использованием колонки BDS HYPERSIL C<sub>18</sub> 250×4,6 мм, 5мкм (Thermo Electron Corporation, США). Регистрацию хроматографического разделения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200–700 нм и масс-детектора с электроспреей ионизацией (ESI). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил : вода с 1% муравьиной кислоты в соотношении 20 : 80 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин.

Регистрацию масс-спектров осуществляли в области положительных ионов. Параметры ионизации: напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение

на конусе – 20 В, напряжение на экстракторе – 3 В, температура десольватации – 350°C, температура источника – 130°C, общий расход инертного газа (азота) – 480 л/час.

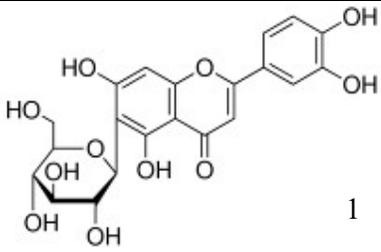
Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения «Mass Lynx».

Идентификацию флавоноидов проводили на основании масс- и электронных спектров, а также сравнением с литературными данными.

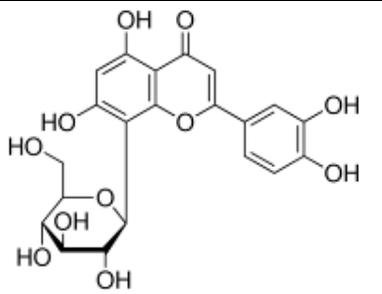
**Обсуждение результатов.** Результаты спектроскопического и масс-спектрометрического анализов представлены в таблицах 1-3. В экстракте флавоноидов пажитника сенного идентифицированы четыре соединения (таблица 1).

Таблица 1 – Флавоноиды, обнаруженные в экстракте пажитника сенного

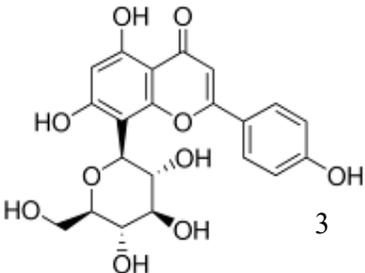
| Соединение | Время удержания, мин | Максимум поглощения, нм | (ESI) <sup>+</sup> m/z | Предполагаемое соединение |
|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| 1          | 6,33                 | 232, 270, 349           | 431,54; 449,49         | изоориентин               |
| 2          | 7,10                 | 232, 268, 348           | 449,49                 | ориентин                  |
| 3          | 9,56                 | 233, 268, 337           | 433,52                 | витексин                  |
| 4          | 10,23                | 233, 270, 337           | 415,51; 433,52         | изовитексин               |



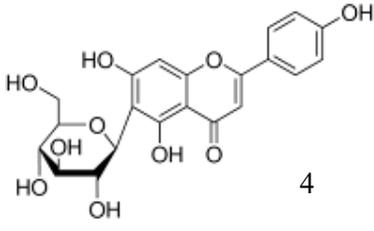
1



2



3



4

Электронные спектры соединений 1-4 имеют выраженные максимумы поглощения при 268-270 нм и при 337-349 нм, характерные для флавонов [2].

Для соединений 1 и 2 с временем удержания 6,33 и 7,10 мин был зарегистрирован пик молекулярного иона с m/z 449,49, а для соединений 3 и 4 был – пик молекулярного иона с m/z 433,52.

На основании электронных и масс-спектров сделали вывод о соответствии структуры соединений 1 и 2 флавону ориентину (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>), встречающегося в двух формах, ориентин (лютеолин 8-С глюкозид) и изоориентин (лютеолин 6-С глюкозид), соединений 3 и 4 – флавону витексину (апигенин 8-С глюкозид) (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>), встречающегося и в форме изовитексина (апигенин 6-С глюкозид).

Для флавонов моно-С-гексоз положение сахарного остатка может быть определено наличием в масс-спектре фрагмента  $[M-H_2O]$ . Фрагментация 6-С изомеров более обширная, дающая характерный ион  $[M-H_2O]$ , вероятнее всего из-за образования дополнительной водородной связи между 2''-гидроксильной группой сахара и 5- или 7-гидроксильной группой агликона [7].

Таким образом, наличие в масс-спектре соединения 1 молекулярного иона с  $m/z$  431,54  $[M-H_2O]^+$  свидетельствует о том, что моно-С-гликозилирование произошло в 6 положении и соединение 1 относится к изоориентину, соответственно отсутствие молекулярного иона с  $m/z$  431,54 для соединения 2 свидетельствует о том, что данное соединение – ориентин.

Наличие в масс-спектре соединения 4 молекулярного иона с  $m/z$  415,51 (таблица 1), соответствующего  $[M-H_2O]^+$ , свидетельствует о том, что соединение с временем удержания 10,23 мин является изовитексином, а соединение с временем удержания 9,56 мин – витексином.

В экстракте флавоноидов тимьяна идентифицированы четыре соединения (таблица 2).

Таблица 2 – Флавоноиды, обнаруженные в экстракте тимьяна обыкновенного

| Соединение | Время удержания, мин | Максимум поглощения, нм | (ESI) <sup>+</sup> m/z | Предполагаемое соединение |
|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| 5          | 19,89                | 233, 270, 342           | 301,70; 609,62         | диосмин                   |
| 6          | 21,98                | 235, 267, 332           | 271,68; 447,58         | байкалин                  |
| 7          | 25,18                | 235, 329                | 163,41; 461,67         | розмариновая кислота      |
| 8          | 41,68                | 235, 287                | 289,62                 | эриодиктиол               |

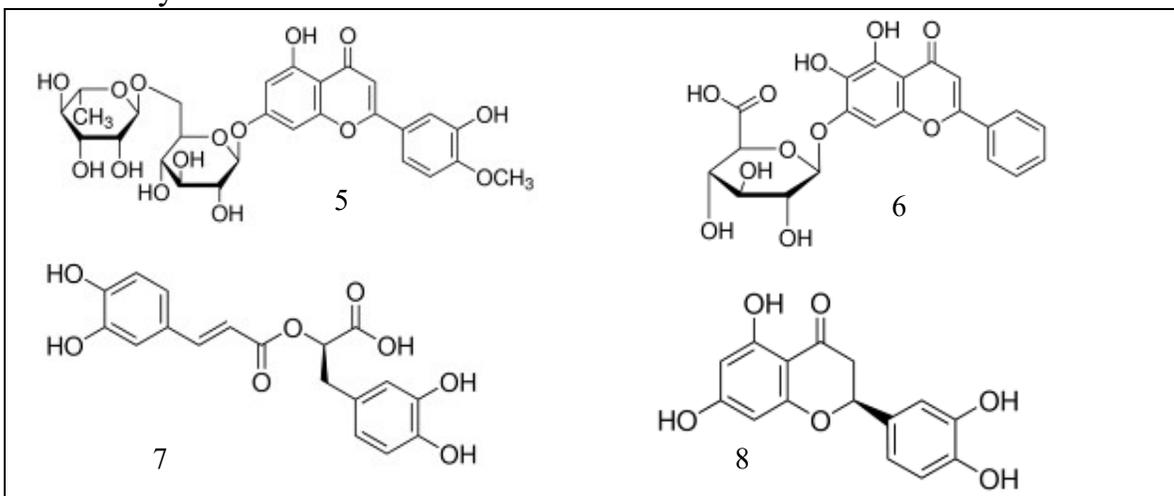
На основании данных электронного и масс-спектров, сделали вывод о соответствии структуры соединений 5 и 6 соответственно флавонам диосмину ( $C_{28}H_{32}O_{15}$ ) и байкалину ( $C_{21}H_{18}O_{11}$ ).

На масс-спектре молекулярный ион для соединения 5 с  $m/z$  609,62 соответствует  $[M+H]^+$ , наличие молекулярного иона с  $m/z$  301,70, относящегося к агликону диосмина – диосметину  $[M-2glu+H]^+$ , подтверждает структуру соединения 5. Аналогично для соединения 6 наличие в масс-спектре молекулярного иона с  $m/z$  271,68, относящегося к агликону байкалина – байкалеину  $[M-2glu+H]^+$ , и молекулярного иона с  $m/z$  447,58, соответствующего  $[M+H]^+$ , подтверждает, что соединения 6 относится к байкалину.

На основании данных электронного и масс-спектров, сделали вывод о соответствии структуры соединений 5 и 6 соответственно флавонам диосмину ( $C_{28}H_{32}O_{15}$ ) и байкалину ( $C_{21}H_{18}O_{11}$ ).

На масс-спектре молекулярный ион для соединения 5 с  $m/z$  609,62 соответствует  $[M+H]^+$ , наличие молекулярного иона с  $m/z$  301,70, относящегося к агликону диосмина – диосметину  $[M-2glu+H]^+$ , подтверждает структуру соединения 5. Аналогично для соединения 6 наличие в масс-

спектре молекулярного иона с  $m/z$  271,68, относящегося к агликону байкалина– байкалеину  $[M-2glu+H]^+$ , и молекулярного иона с  $m/z$  447,58, соответствующего  $[M+H]^+$ , подтверждает, что соединения 6 относится к байкалину.



Соединение 7 с временем удержания 25,18 мин имеет максимумы поглощения при 234 и 328 нм, что характерно для розмариновой кислоты ( $C_{18}H_{16}O_8$ ) [3-5]. В масс-спектре соединения 7 наблюдается молекулярный ион с  $m/z$  461,67, соответствующий  $[M+H]^+$  и характерный для розмариновой кислоты ион с  $m/z$  163,41, относящийся к  $[M-C_9H_{10}O_5+H]^+$  [6].

Максимум поглощения соединения 8 наблюдается при 286 нм, что соответствует максимуму поглощения флаванонов [2]. В области положительных ионов в масс-спектре наблюдается молекулярный ион с  $m/z$  289,62, что соответствует  $[M+H]^+$  (таблица 2). Таким образом соединение с временем удержания 41,66 мин можно отнести к эриодиктиолу ( $C_{15}H_{12}O_6$ ).

В экстракте флавоноидов ромашки аптечной идентифицированы соединения 9 и 10 (таблица 3).

Таблица 3– Флавоноиды, обнаруженные в экстракте ромашки аптечной

| Соединение | Время удержания, мин | Максимум поглощения, нм | (ESI) <sup>+</sup> m/z | Предполагаемое соединение |
|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| 9          | 9,40                 | 232, 255, 315, 374      | 465,65                 | кверцимеритрин            |
| 10         | 34,63                | 232, 321                |                        | герниарин                 |

По результатам анализа электронного спектра соединения 9 относится к флавонолам. В масс-спектре соединения 9 с временем удержания 9,40 мин наблюдается молекулярный ион с  $m/z$  465,65, что соответствует молекулярному иону кверцимеритрина (кверцетин-7-О-глюкозид,  $C_{21}H_{20}O_{12}$ ).

В электронном спектре соединения с временем удержания 34,63 мин наблюдаются две полосы поглощения при 232 нм и при 321 нм, характерные для кумаринов [1]. В масс-спектре идентифицируется молекулярный ион с  $m/z$  177,53. Эти факты дают возможность предположить, что соединение 10 является герниарином ( $C_{10}H_8O_3$ ).

Анализ электронных и масс-спектров экстракта ладанника шалфеелистного позволил установить только соединение с временем удержания 15,58 мин, которое является кемпферолом, что подтверждается стандартом коммерческого препарата (Sigma, Франция).

Таким образом, используя метод ВЭЖХ-МС, удалось идентифицировать флавоноиды в водно-спиртовых экстрактах пажитника сенного: изоориентин, ориентин, витексин и изовитексин; тимьяна обыкновенного: диосмин, байкалин, розмариновая кислота и эриодиктиол; ромашки аптечной: кверцимеритрин и герниарин; ладанника шалфеелистного – кемпферол.

#### **Список литературы:**

1. Фитохимический анализ растений и сырья, содержащих простые фенольные соединения и кумарины [Электронный ресурс] / ИГМУ. – Режим доступа: [https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/515a2a94\\_metodicheskoe\\_posobie\\_po\\_kumarinam.pdf](https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/515a2a94_metodicheskoe_posobie_po_kumarinam.pdf) – Дата доступа: 07.08.2017.
2. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды [Электронный ресурс] / ИГМУ. – Режим доступа: [https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/346ae99c\\_metodicheskoe\\_posobie\\_po\\_flavonoidam.pdf](https://www.ismu.baikal.ru/src/downloads/346ae99c_metodicheskoe_posobie_po_flavonoidam.pdf). – Дата доступа: 07.08.2017.
3. A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts / M. Öztürk [et al.] // Food Chemistry – 2010. – Vol. 123, Issue 4. – P. 1352-1356.
4. Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary / N. Troncoso [et al.] // Journal of Chromatography A – 2005. – Vol. 1100, Issue 1. – P. 20-25.
5. Identification, Separation and Quantification of Rosmarinic Acid from Extract of Orthosiphon by HPTLC / M.E. Craciun [et al.] // REVISTA DE CHIMIE – 2014. – Vol. 65, Issue 6. – P. 621-626.
6. Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0003572) [Electronic resource] / The Human Metabolome Database (HMDB). – Mode of access: [http://www.hmdb.ca/spectra/ms\\_ms/109957](http://www.hmdb.ca/spectra/ms_ms/109957). Date of access: 08.08.2017.
7. Sakalem M.E., Negri G., Tabach R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the Passiflora genus // Brazilian Journal of Pharmacognosy – 2012. – Vol.22, no.6. – P. 1219-1232.

**РАЗДЕЛ 2**  
**ИННОВАЦИОННЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ**  
**В МЕДИЦИНЕ, ВЕТЕРИНАРИИ, СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ**  
**И ДРУГИХ ОТРАСЛЯХ**

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ  
ПРИРОДНЫХ БАВНА ОСНОВЕ УНИВЕРСАЛЬНОГО  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО  
ПРОИСХОЖДЕНИЯ – МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Храмцов А.Г.

Северо-Кавказский федеральный университет,  
г. Ставрополь, akhramtcov@ncfu.ru

*В статье рассмотрены биотехнологические основы получения и применения молочной сыворотки – универсального сельскохозяйственного сырья животного происхождения.*

В соответствии с состоявшимся феноменом [2] и текущими новациями [3] молочная сыворотка всех видов – подсырная и творожная, жирная и нежирная являются **возобновляемым природным (экологически чистым) биологическим (живым) сырьем животного происхождения (БИОЭКОСЫРЬЕ)**. Она, как сливки, обезжиренное (нежирное) молоко и пахта, а так же (теперь) продукты мембранного разделения (микро,- ультра- и нанофилтраты) и биотрансформации должна на законодательном (смысл очевиден) уровне рассматриваться в парадигме **МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ**. Кстати, это положение было сформулировано великим Н. Н. Липатовым (ст.) и научно-практически обосновано В. А. Павловым (начальник РосГлавМолоко) в его докторской диссертации. Жаль, что до сих пор в отрасли существует графа – «отходы». К тому же следует напомнить уникальную цитату нашего соотечественника, великого физиолога, академика, лауреата Нобелевской премии И.П. Павлова о молоке и продуктах его переработки, как «изумительной пище созданной самой природой и незаменимой для человека». Этот постулат полностью (а может быть даже больше – вспомните притчу о узнике и сатрапе) относится и к молочной сыворотке.

Всего, по примерным расчетам (исходя из ассортимента сыров, творога и казеинов) в мире насчитывается более 15000 видов молочной сыворотки. В нашем Союзном Государстве видимо речь идет о тысячах видов. На практике дело имеют обычно с двумя категориями молочных сывороток – сладкая и кислая. Они являются побочными продуктами сыроделия (сладкая сыворотка) или от производства творога и казеина (кислая сыворотка).

В процессе самопроизвольной или целенаправленной биотехнологической обработки молока (коагуляция и синерезис) в молочную сыворотку переходит до 90% (наше определение «ноу-хау») исходного сырья, что очень важно и около 50% его сухих веществ. Это дает основание для термина «полумолоко». Закономерностей перехода компонентов молока пока не установлено, но совершенно очевидна взаимосвязь состояния и размеров компонентов (молекулярно-кинетическая теория). Состав молочной

сыворотки колеблется в значительных пределах и зависит для подсырной – от вида вырабатываемого сыра и его жирности; творожной – от способа производства творога и его жирности; казеиновой – от вида вырабатываемого казеина.

В молочной сыворотке, как и молоке (по А. Тепел) идентифицировано более 2000 соединений и содержится около 100000 молекулярных структур (по А.М. Осинцеву), которые находятся в растворенном (наноуровень) и коллоидно-дисперсном (кластеры) состояниях, а так же в виде суспензии (казеиновая пыль) и эмульсии (молочный жир).

С познавательной точки зрения молочная сыворотка – идеальная система для исследований сложно организованных объектов, синтезированных природой. С учетом наличия микробного пула и биологически синтезированной воды она может претендовать на универсальное сельскохозяйственное сырье, что было озвучено академиком Н.Н. Липатовым (ст.) в предисловии к основополагающей монографии немецких специалистов Синкевич и Ридель.

С практической точки зрения молочная сыворотка всегда являлась не «отходом», а резервом отрасли. При этом, безусловно, ошибочным является отнесение ее стоимости на основное производство.

В целом традиционная молочная сыворотка содержит половину сухих веществ молока и до 70 % лактозы, что позволяет считать ее углеводным сырьем и реализовано широкомасштабно на практике при получении молочного сахара во всех странах с развитым молочным делом, в т.ч. имело место быть в СССР. К сожалению, при переходе на рыночную экономику в России завоеванные позиции были потеряны и ждут своего логического возрождения. Теперь в комплексном федеральном проекте Молочного комбината «Ставропольский» и Северо-Кавказского федерального университета. В Беларуси, на государственном уровне, данная проблема практически решена.

Таким образом, совершенно однозначно молочную сыворотку следует считать биотехнологической системой (БТС). При этом БТС молочной сыворотки – один из видов возобновляемого молочного сельскохозяйственного сырья со всеми вытекающими последствиями по полному и рациональному использованию в рамках «умной экономики». Все положения по БТС молочного дела вообще и молочной сыворотки в частности в системном виде сформулированы совместно с нашими коллегами-аграриями и нуждаются в практической реализации, в т. ч. на законодательном уровне. При этом по сформировавшимся по факту «жизненного цикла» и принципам логистики положениям данный объект следует трактовать на трех взаимоувязанных уровнях – **молочная сыворотка, ее компоненты и их производные.**

Исходя из сформулированных выше положений, промышленная обработка молочной сыворотки и рациональное использование полученной

продукции является, в условиях рыночной экономики, важной, самостоятельной проблемой отрасли и может быть реализовано на трех уровнях по нескольким направлениям [1].

Оценивая биотехнологический потенциал молочной сыворотки, естественно логистически возникает потребность его полного и рационального использования. Именно в этом направлении сосредоточены усилия отрасли во всем мире. В целом отрасли представлен целый набор новых, инновационных продуктов для промышленного освоения с целью получения прибыли и исключения импорта. На первом месте – напитки, затем сгущенные концентраты и сухие продукты. Практически сформировано новое научно-практическое направление – синтез производных компонентов молочной сыворотки.

В системном виде Технологическая Платформа синтеза производных компонентов сухого остатка молочной сыворотки включает три составляющих по трансформации основных соединений – ЛипидОмику, ПротеОмику и Глико(Лакт)Омику. Особое место в производных компонентах молочной сыворотки занимает проблематика **ЛАКТОЗЫ – ГИДРОЛИЗ, МОДИФИКАЦИЯ, БИОТРАНСФОРМАЦИЯ**. И это вполне оправдано – 70% сухого вещества и размер на уровне идеализированного «карлика» – 1 нанометр.

Именно поэтому, конечно с учетом доказательности наших мотиваций, Международная Молочная Федерация (ММФ) согласилась с предложением Национального Комитета по молочному делу Российской Федерации и провела в 2007 году Симпозиум «Лактоза и ее производные» (Россия, г. Москва). Кстати Симпозиум был совмещен с Международной конференцией по кисломолочным напиткам и посвящен И.И. Мечникову, который более 100 лет назад ратовал за «МОЛОЧНОЕ БРОДИЛО» для лактотерапии (лечения молоком) и продления жизни «хомо-сапиес». Следует отметить, что поиск производных лактозы продолжается. Творческий коллектив проф. Е.И. Мельниковой (ВГУИТ) совсем недавно синтезировал фукозу и тагатозу. А в нашем творческом коллективе А.Д. Лодыгин сформировал систему пребиотических концентратов на основе производных сывороточных белков, лактозы и минерального комплекса из вторичных ресурсов отрасли. Проект ждет заинтересованного инвестора! В Беларуси данная проблематика на системном уровне рассмотрена в работах О.В. Дымар (докторская диссертация), В.П. Курченко (ждет обобщения) и реализована на государственном уровне в рамках специальной Программы.

В контексте производных лактозы следует обратить внимание на тематику по галактоолигосахаридам (ГОС), синтез которых ждет своей очереди в отрасли и востребован потребителями (особенно детское и диетическое питание). Лактосахароза, лактитол, лактозил-мочевина, линейка продуктов бренда «МиЛа» (минимум лактозы) и др. производные **«сахара жизни»** так же могут стать составляющей модернизации молочного дела для

внутреннего рынка и экспорта, что представляется важным в свете вступления нашей страны в ВТО.

Отдельного и специального рассмотрения заслуживают **БИОПРОИЗВОДНЫЕ** лактозы молочной сыворотки – бактериоцины (биогенные элисторы), но это самостоятельная тема для профессионалов. Она особенно актуальна именно для молочной сыворотки, как идеального сырьевого субстрата, подготовленного для ферментативной трансформации самой природой и руками мастеров-биотехнологов. Этой проблематике была посвящена творческая жизнь профессора Михаила Валентиновича Залашко (1929 – 2003 гг.), труды которого по микробному синтезу и биотехнологии применительно к «коду жизни» – молочной сыворотке не потеряли актуальности и востребованы. Нам остается только развивать начатое им в рамках биомембранной технологии, реализовать конкурентоспособные инновации с информационным сопровождением в отраслевой печати и публичных Саммитах уровня настоящих Нарочанских чтений.

#### **Список литературы:**

1. Гаврилов, Г. Б. Справочник по переработке молочной сыворотки. Технологии. Процессы и аппараты. Мембранное оборудование / Г. Б. Гаврилов, А. Ю. Просеков, Э. Ф. Кравченко, В. Г. Гаврилов. – Санкт-Петербург : Профессия, 2015. – 176 с.
2. Храмцов, А. Г. Феномен молочной сыворотки / А. Г. Храмцов. – Санкт-Петербург : Профессия, 2011. – 804 с.
3. Храмцов, А. Г. Новации молочной сыворотки / А. Г. Храмцов. – Санкт-Петербург : Профессия, 2016. – 490 с.

#### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХИТОЗАНА В СОСТАВЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЕКРОБАКТЕРИОЗА ЖИВОТНЫХ**

Албулов А.И.<sup>1</sup>, Фролова М.А.<sup>2</sup>, Мельник Н.В.<sup>2</sup>, Еремец В.И.<sup>2</sup>,  
Мурадян Ж.Ю.<sup>2</sup>, Гринь А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ООО «Биопрогресс», г. Щелково, Московской обл., [info@bioprogress.ru](mailto:info@bioprogress.ru)

<sup>2</sup> ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Московской обл.,  
[vnitibp@mail.ru](mailto:vnitibp@mail.ru)

*В статье представлены результаты изучения эффективности использования сукцината хитозана в качестве адъюванта в составе вакцины против некробактериоза животных. Использование сукцината хитозана в составе вакцины способствовало повышению титра антител и уменьшению воспалительного процесса в месте введения вакцины, увеличению продолжительности иммунного ответа.*

**Введение.** Поиск новых депонентов для вакцинных антигенов, сочетающих в себе адьювантные и сорбционные свойства при максимальной безвредности для прививаемых животных, является актуальной задачей.

Для ветеринарных вакцин принципиально важна не только высокая иммуногенность, но и низкая стоимость. Лишь при наличии экономически доступной и достаточно эффективной вакцины появляется возможность массовой иммунизации животных. С учетом экономической составляющей выбор адьювантов для ветеринарных вакцин существенно сокращается. Перспективными адьювантами для ветеринарных вакцин могут быть препараты на основе хитозана.

В последние годы учеными различных стран проведен цикл исследований по применению в качестве адьюванта хитозана и его производных в составе вакцин ветеринарного назначения. Ряд работ выполнены зарубежными учеными по включению модификатов хитозана в качестве адьювантов в вакцины против листериоза, псевдомоноза, бруцеллеза, ящура, гриппа и других инфекций [5, 6]. Известен положительный опыт применения нанохитозана для повышения иммунного ответа при конструировании бруцеллезных вакцин [4].

Адьювантные свойства хитозана обусловлены его высокомолекулярной структурой, позволяющей удерживать антигены внутримолекулярно. Низкая скорость расщепления хитозана в тканях обуславливает длительное присутствие антигена в месте введения. Это связано с неспецифичностью ферментов организма к данному полимеру. Применение хитозана в качестве адьюванта позволяет получить иммунный ответ на вводимые антигены на уровне или выше известных масляных и минеральных адьювантов, что свидетельствует о перспективности дальнейших исследований в этом направлении. Проявленные свойства хитозана позволяют предложить этот препарат в качестве адьюванта в производстве вакцинных препаратов [3].

#### **Материалы и методы исследований**

Экспериментальные исследования осуществляли в отделе получения БАВ ФГБНУ «ВНИТИБП», ООО «Биопрогресс», ФКП «Щелковский биокомбинат». В условиях ФКП «Щелковский биокомбинат» была изготовлена экспериментальная серия вакцины против некробактериоза животных. В качестве адьюванта использовали сукцинат хитозана (ММ 330кДа, Степень замещения 75,2%) производства ООО «Биопрогресс» в количестве 3,7% в пересчете на прививочную дозу. Иммуногенность производственной и экспериментальной серии вакцин определяли в РГА, реактогенность – на кроликах и белых мышах.

#### **Результаты исследований**

Некробактериоз – инфекционное заболевание сельскохозяйственных животных, проявляющееся гнойно-некротическими поражениями органов и тканей. Возбудитель некробактериоза *Fusobacterium necrophorum* широко распространен в природе, присутствует в почве, является нормальным

обитателем желудочно-кишечного тракта животных. Важным звеном в борьбе с некробактериозом являются ветеринарно-санитарные и лечебные мероприятия, включающие в себя вакцинацию, профилактику и лечение заболеваний конечностей животных [1, 2]. Профилактические меры с использованием вакцины против некробактериоза приобретает особое значение при ввозе импортного поголовья крупного рогатого скота.

В настоящее время в РФ выпускается пять вариантов вакцин против некробактериоза животных. Из них чаще применяется инактивированная эмульсин-вакцина ВИЭВ, которая обеспечивает надежную защиту в течение 6 месяцев. После чего должна осуществляться ревакцинация. Повторные прививки проводятся, как правило, в осенне-зимний период, требуют дополнительных затрат и создают ряд неудобств в условиях северных и восточно-сибирских регионов РФ. Поэтому актуальной остается задача удлинения срока эффективного действия вакцины до 9-12 месяцев и более.

В условиях производства ФКП «Щелковский биокомбинат» бала приготовлена экспериментальная серия вакцины против некробактериоза, которая содержала дополнительно сукцинат хитозана (ММ330кДа) в количестве 3,7% в пересчете на прививочную дозу. Иммуногенность производственной и экспериментальной серии вакцин определяли в РГА, реактогенность – на кроликах и белых мышах.

Как следует из данных, представленных в таблице 1, добавление хитозанового полисахарида дало повышение титра антител в четыре раза (1:512 в опыте, 1:128 – в контроле), а также способствовало уменьшению воспалительного процесса в месте введения вакцины, что выразилось в отсутствии абсцессов, снижении припухлости, отечности и болезненности и, следовательно, реактогенности вакцины. Хитозан как адсорбент и адъювант оказал положительное влияние на иммуногенные и реактогенные свойства экспериментальной серии вакцины против некробактериоза животных, что указывает на перспективность применения этого полимера в составе прививочных препаратов.

Использование полисахарида хитозана в составе вакцины против некробактериоза животных в качестве сорбента и адъюванта способствовало повышению титра антител и уменьшению воспалительного процесса в месте введения вакцины, увеличению продолжительности иммунного ответа.

### **Вывод**

Установлено, что включение 3,7% сукцината хитозана (ММ 330кДа) в состав прививочной дозы вакцины против некробактериоза животных способствовало повышению ее иммуногенности в РГА до 1:512 по сравнению с контролем 1:128. На месте введения вакцины наблюдается уменьшение воспалительных процессов.

Таблица 1 – Результаты проверки инактивированной сорбированной вакцины против некробактериоза животных на иммуногенность и реактогенность

| Вакцина                       | Иммуногенность | Реактогенность   |  |
|-------------------------------|----------------|--|--|
|                               |                | Опытные животные   | Степень локализованности воспалительного процесса  |
| Производственная              | 1:128          | Кролики  | 0,5 см <sup>3</sup> в/м ревакцинация через 12 дней   |
|                               |                |  | При введении масляной вакцины разлитое гемморагическое воспаление—размер 6X3см                                 |
|                               |                |  | 0.75 см <sup>3</sup> в/м учет на 12 сутки  |
|                               |                |  | На месте введения ограниченный абсцесс с творожистым выделением без запаха. Конечность напряжена и болезненна. |
|                               |                | Белые мыши (5 голов)   | 0,2 см <sup>3</sup> в/м (наблюдение 10 суток)  |
|                               |                |  | Абсцесс с творожистым выделением   |
| Экспериментальная с хитозаном | 1:512          | Кролики (3 головы)   | 0,5 см <sup>3</sup> в/м ревакцинация через 12 дней   |
|                               |                |  | На месте введения уплотнение не прощупывается  |
|                               |                |  | 0.75 см <sup>3</sup> в/м учет на 12 сутки  |
|                               |                | На месте введения вакцины припухлость в среднем от 1,5X1,0 см до 2X3 см. Болезненность не наблюдается. |  |
|                               |                | Белые мыши (5 голов)   | 0,2 см <sup>3</sup> в/м (наблюдение 10 суток)  |
|                               |                |  | Уплотнение 1X1 см тестовой консистенции  |

### Список литературы:

1. Гулюкин, М.И. Комплексная система мероприятий при некробактериозе животных / М.И. Гулюкин, Ю.Д. Караваев, И.Н.Семенова, Н.В. Мельник // Ж. «Ветеринария». – 2007. – №9. – С. 5.
2. Караваев, Ю.Д. Эффективность использования комплексной системы профилактики и борьбы с некробактериозом крупного рогатого скота и северных оленей / Ю.Д. Караваев, И.Н. Семенова, М.И. Гулюкин [и др.] // Ж. «Веткорм». – 2006. – №6. – С. 6-8.
3. Крыжановская, Е.В. Адсорбционные и адьювантные свойства хитозана / Е.В. Кражановская, А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко [и др.] // Ж. «Веткорм». – 2008. – №4. – С. 34-35.

4. Allison, C. Rice-ficht good or bad bruccellavaccine // Its Allin Delivery Brucellosis Int. Research Con. 2001. – P. 15.
- 5.Charg, H. Comparison of adjuvant efficacy of chitosan and aluminum hydroxide for intraperitoneally administered inactivated influenza H5N1 vaccine / H.Chang., X. Li., Y. Teng et al. // DNA Cekk Biol. – 2010 – No 29 (9). – P. 563-568.
- 6.Okawa Y., Kobayashi M., Comparative study of protective effects of chtin, chitosan, and N-acetyl chitohexoose against Pseudomonas aeruginosa and Listeria monocytogenes infections in mice Biol Pharm Bull. 2003 Jun; 26(6).-P. 902-904;

## ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КАЗЕИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИТОЗАНА

Алиева Л.Р.<sup>1</sup>, Евдокимов И.А.<sup>1</sup>, Варламов В.П.<sup>2</sup>, Тихонов В.Е.<sup>3</sup>,  
Буткевич Т.В.<sup>4</sup>, Курченко В.П.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биоинженерии, г. Москва,

<sup>3</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,  
г. Москва

<sup>4</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, kurchenko@tut.by

*Предложена технология получения казеина и сывороточных белков с использованием хитозана из обезжиренного молока. Показано, что при рН 6,3 происходит коагуляция мицелл казеинов и сывороточных белков с положительно заряженными молекулами хитозана с молекулярными массами 47 кДа, 25,4 кДа, 7,7 кДа. В результате ионного взаимодействия хитозана с белками обезжиренного молока достигается 90 - 92% выход целевого продукта. В его состав кроме незначительного количества хитозана входят все формы казеинов:  $\alpha_s$ -казеин,  $\beta$ -казеин,  $\kappa$ -казеин, а также значительное количество  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -лактальбумина.*

**Введение.** Для производства казеина используется два типа технологий: сычужный казеин, получаемый ферментативным осаждением и кислотный казеин, получаемый подкислением обезжиренного молока до изоэлектрической точки белка - рI 4,6. Основываясь на физико-химических свойствах казеина и хитозана, возможна разработка альтернативной технологии выделения казеина из обезжиренного молока [1, 2].

Основой такой технологии являются свойства фракций казеинов и хитозана. В молоке коров содержится шесть главных белков:  $\alpha_{S1}$ -казеин,  $\alpha_{S2}$ -казеин,  $\beta$ -казеин,  $\kappa$ -казеин,  $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактальбумин. Казеины составляют 78-85% от всех белков молока. Исследование фракционного состава казеина позволило выявить фракции:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\gamma$ . Они представляют собой комплекс основных и минорных фракций, включая генетические варианты. Казеины являются фосфопротеидами, а  $\kappa$ -казеин относится к

фосфогликопротеидам. В отличие от сывороточных белков они характеризуются высокой термоустойчивостью и выдерживают кипячение в течение нескольких часов. В казеине содержание группы  $\alpha_S$ -казеинов составляет 43-55%,  $\beta$ -казеин 24-35%,  $\kappa$ -казеин 8-15%,  $\gamma$ -казеинов – фрагментов  $\beta$ -фракции 3-7%. Они относятся к группе сферопотеинов. Первичная структура  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеина имеет невысокую гомологию. Все фракции казеинов имеют близкие изоэлектрические точки в области рН4,6 [2 - 5].

Фракция  $\alpha_{S1}$ -казеинов, состоит из полипептидной цепи, содержащей 199 аминокислотных остатков, включающей 8 остатков фосфорной кислоты. Она не содержит цистеин и имеет повышенное содержание аспарагиновой кислоты, лизина и тирозина. Эта фракция осаждается под действием ионов кальция, являясь кальцийнеустойчивой.

В  $\alpha_{S2}$ -казеине содержится 207 аминокислотных остатков. Он имеет четыре генетических варианта, которые отличаются содержанием от 10 до 13 фосфосериновых остатков, содержат два остатка цистеина и осаждается под действием ионов кальция [2, 6].

Полипептидная цепь  $\beta$ -казеина представлена 209 аминокислотными остатками, которые содержат пять остатков фосфорной кислоты. Он имеет семь генетических вариантов. Фракция характеризуется повышенным содержанием валина, лейцина, пролина, содержит меньше аланина и аспарагиновой кислоты при отсутствии цистеина. Осаждение  $\beta$ -казеина происходит в присутствии ионов кальция при температуре 35°C, в то время как при 4°C в охлажденном состоянии он не чувствителен к действию этих ионов. При низких температурах  $\beta$ -казеин растворим и без нарушения мицелл казеина может в значительных количествах переходить в плазму молока, где под действием плазмина происходит его частичный протеолиз с образованием  $\gamma$ -казеинов. Особенностью  $\gamma$ -казеинов является то, что под действием сычужного фермента белки этой фракции не осаждаются и уходят в сыворотку. Увеличение содержания  $\gamma$ -казеинов в молоке снижает степень использования белков в основу технологии которых положено сычужное свертывание белков: сычужные сыры, казеин сычужный, отдельные виды творога. Способность  $\beta$ -казеина и  $\alpha_S$ -казеинов осаждаться при действии сычужного фермента в присутствии ионов кальция лежит в основе технологии производства сычужных сыров и казеина [1, 2, 4, 6, 7].

Главный компонент  $\kappa$ -казеина представлен полипептидной цепью, состоящей из 169 аминокислотных остатков, в том числе двух цистеиновых. В отличие от  $\alpha_S$ - и  $\beta$ -казеинов  $\kappa$ -казеин содержит только один фосфосериновый остаток, поэтому практически не связывает ионы кальция, благодаря чему не теряет растворимости в их присутствии, являясь кальцийустойчивой фракцией белков молока. Растворимость  $\kappa$ -казеина также связана с присутствием в его структуре N-ацетилгалактозамина, галактозы и

N-ацетилнейраминовой кислоты, которые содержат большое количество лиофильных ОН-групп. Этот фосфогликопротеид характеризуется высоким отрицательным зарядом. При ассоциации с  $\alpha_S$ - и  $\beta$ -казеинами к-казеин образует стабильные мицеллы и, располагаясь большей частью на поверхности последних, выполняет роль защитного коллоида по отношению к этим кальцийнеустойчивым фракциям [2, 4, 8].

Молекулы  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - и к-казеинов имеют малоупорядоченную структуру за счет незначительного количества  $\alpha$ -спиральных участков составляющих от 1 до 6%. Также большинство форм казеина характеризуются невыраженной третичной структурой, лишенной дисульфидных мостиков [2, 4, 6, 8]. Казеины формируют четвертичную структуру образуя непрочно связанные друг с другом мицеллы. Мицелла казеина состоит из субмицелл диаметром 10-20 нм. В состав субмицелл входят  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - и к-казеины в соотношении 3:1:3:1. В мицелле казеинов выделяют центральную гидрофобную и периферическую гидрофильную области, в которой располагаются основные сайты фосфорилирования. В мицеллах казеинов связь между субмицеллами осуществляется через кальций-фосфатные мостики. Они располагаются таким образом, что гидрофобные участки фракций находятся внутри ядра, а гидрофильные участки к-казеина и фосфатные группы  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -и  $\beta$ -казеинов – на поверхности (рисунок 1). Так как фракции казеина являются фосфопротеидами, то в присутствии кальция, цитратов и фосфатов склонны самоассоциироваться и взаимодействовать друг с другом с образованием ассоциатов различных размеров. Электронномикроскопическими исследованиями установлено, что мицеллы имеют сферическую форму с диаметром от 40 до 300 нм и являются высокоорганизованными структурными единицами со средней молекулярной массой  $6 \cdot 10^8$  Да [4, 6-9].

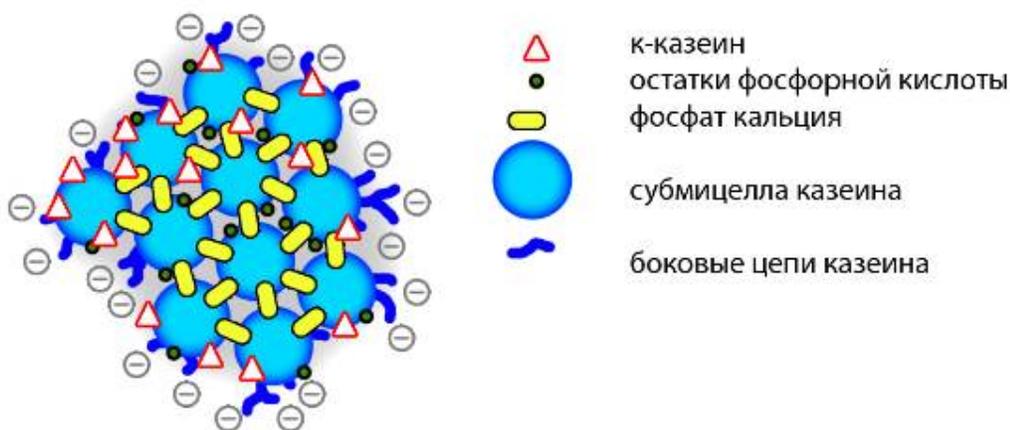


Рисунок 1 – Строение мицеллы казеина

Между фракциями казеина могут возникать связи различных типов: гидрофобные взаимодействия, ионные и водородные. Поверхность мицеллы

казеина за счет электростатического взаимодействия связывает значительное количество диполей воды. По мере утолщения слоя связанной воды новые ее молекулы все слабее удерживаются коллоидной частицей. Способность казеинов к ассоциации зависит от температуры, рН и ионной силы. При снижении в молоке величины рН ионы водорода связываются с ионизированными карбоксильными группами казеинов и число отрицательных зарядов на поверхности белковых частиц уменьшается. Потеря отрицательного заряда мицеллами казеинов ведет к нарушению гидратной оболочки и к снижению растворимости белка. При достижении величины рН близкой к изоэлектрической точке 4,6 казеины выпадают в осадок. На основании данных свойств получают кислотный казеин, путем подкисления обезжиренного молока до изоэлектрической точки [3, 4, 6-11].

Также фактором, влияющим на растворимость белков, является ионная сила, а именно концентрация солей кальция и магния в системе. При невысокой концентрации солей растворимость белков высокая. Белки адсорбируют ионы кальция и магния на своей поверхности, за счет чего повышается их суммарный заряд и упрочняются гидратные оболочки. При создании высоких концентраций солей происходит противоположное действие. Ионы кальция и магния конкурируют за связывание с казеиновыми частицами и вследствие повышенной плотности заряда снижается связывание воды. Лишенные гидратной оболочки белки образуют агрегаты и выпадают в осадок [9, 12].

Температурный фактор также играет большую роль в ассоциации белковых молекул. Тепловая обработка вызывает конформационные изменения в полипептидных цепях сыровоточных белков после чего они образуют комплексы друг с другом ( $\beta$ -лактоглобулин –  $\alpha$ -лактальбумин), которые способны взаимодействовать с казеиновыми мицеллами. Результатом такого взаимодействия является увеличение заряженной поверхности казеиновых мицелл и усиление их гидратационных свойств. Так как казеины относятся к термостабильной фракции белков молока, то при пастеризации (до 100°C) нарушения структуры казеина не происходит. Изменение структуры и распад мицелл казеина на субмицеллы возможен при нагревании до 120°C в течение 5 ч. Термическая денатурация белков не снижает их пищевой ценности [13].

Эти принципы положены в основу получения сычужного казеина. При воздействии сычужного фермента на поверхностную фракцию мицелл казеина происходит протеолиз к-казеина ведущий к потере отрицательного заряда субмицелл, дестабилизации и агрегации кальцийнеустойчивых  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеинов [1].

К сожалению, традиционные технологии далеки от совершенства. А анализ физико-химических свойств казеинов дает основание предложить новый способ получения казеина из обезжиренного молока. В его основе лежит использование хитозана, который является безвредной для здоровья

пищевой добавкой [14]. Он обладает рядом уникальных химических, физических и биологических свойств, что обуславливает его применение при производстве различных функциональных продуктов питания [15 - 18].

Большой теоретический и практический интерес представляет возможность использования хитозана для выделения белков из молока. Ранее нами показано, что казеины и сывороточные белки эффективно взаимодействуют с хитозаном, образуя коагулят [19 - 23]. Основой этого физико-химического явления служит неравновесное комплексообразование отрицательно заряженных мицелл казеина с катионным полисахаридом - хитозаном, в результате которого происходит образование анизотропных гелей и коацерватов белков [24, 25]. Такой процесс может быть пригоден для переработки обезжиренного молока, в результате которого будет получена белковая масса содержащая казеин и сывороточные белки.

Целью данной работы являлось разработка технологии коагуляции казеинов и белков сыворотки молока с использованием хитозана для получения белковой массы.

#### **Материалы и методы**

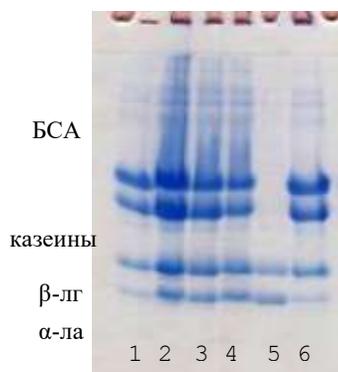
В работе использовали: хитозан с молекулярными массами 47 кДа, 25,4 кДа, 7,7 кДа и олигохитозан любезно предоставленные Варламовым В.П. и Тихоновым В.Е.; сукцинированный хитозан (производство «Биопрогресс», Россия). Молоко обезжиренное производства ОАО «Савушкин продукт».

Для коагуляции белков в молоко добавлялось различное количество хитозана. Образовавшийся коагулят отделяли центрифугированием. Белки молока анализировали с использованием денатурирующего и нативного электрофореза [26].

#### **Результаты и обсуждение**

При исследовании механизма взаимодействия хитозана с белками молока нами показано, что этот полисахарид эффективно взаимодействует с казеинами,  $\beta$ -лактоглобулином ( $\beta$ -лг),  $\alpha$ -лактоальбумином ( $\alpha$ -ла) и бычьим сывороточным альбумином (БСА) [18, 20, 24 - 27]. Такое комплексообразование основано на том, что белки молока характеризуются низкими значениями изоэлектрических точек и при рН 4,8 - 6,2 имеют отрицательный заряд, благодаря чему способны к ионному взаимодействию с положительно заряженными молекулами хитозана. Эффективность комплексообразования белков с хитозаном зависит от рН, ионной силы, концентрации хитозана и его молекулярной массы (рисунки 2, 3, 4). Это явление использовано для разработки технологии получения казеина из обезжиренного молока.

При добавлении к обезжиренному молоку при рН 6,3 раствора хитозана происходило образование коагулята казеинов, сывороточных белков и полисахарида. Состав полученной белковой массы анализировался с использованием денатурирующего электрофореза, результаты которого представлены на рисунке 2.

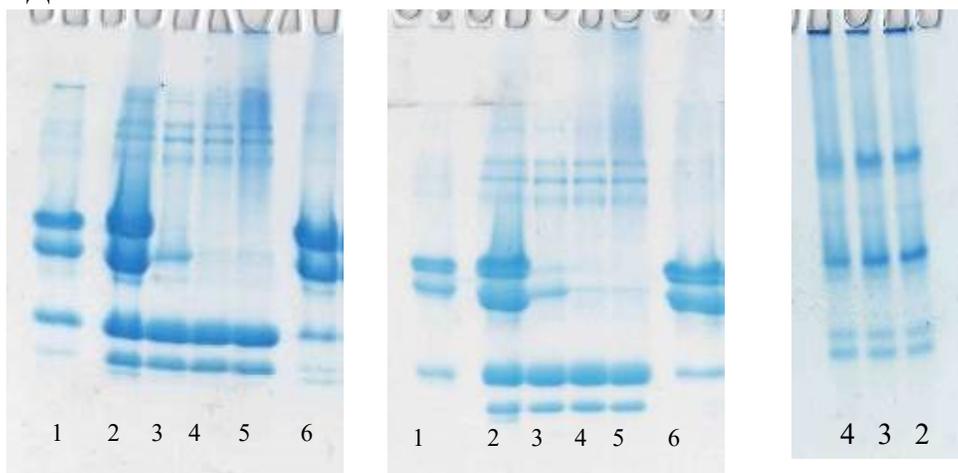


1. Молоко контроль;
2. Молоко с 0,01% раствором хитозана;
3. Молоко с 0,05% раствором хитозана;
4. Молоко с 0,1% раствором хитозана;
5. Молоко с 0,5% раствором хитозана;
6. Молоко с 0,5% раствором хитозана (осадок);

Рисунок 2 – Электрофореграмма белков молока в присутствии различных концентраций хитозана 46,7 кДа (дорожки 2 - 5) и коагулированного осадка белков (дорожка 6)

Анализ полученных результатов свидетельствует, что при температуре 60°C в течении 30 минут происходит эффективное взаимодействие хитозана с молекулярной массой 46,7 кДа в концентрации 0,5% с мицеллами казеинов и белками сыворотки обезжиренного молока.

При добавлении хитозанов с различными молекулярными массами процесс коагуляции мицелл казеина и сывороточных белков молока сохраняется и оптимален при их 0,5 % содержании в обезжиренном молоке. На рисунке 3 представлены электрофореграммы белков молока в присутствии различных концентраций хитозана с молекулярными массами 25,4 кДа, 7,7 кДа и олигохитозана с молекулярной массой около 358,3-716,7 Да.



1. Молоко контроль; 2. Молоко с 0,1% раствором хитозана;
3. Молоко с 0,2% раствором хитозана; 4. Молоко с 0,5% раствором хитозана;
5. Молоко с 1% раствором хитозана; 6. Молоко с 0,5% раствором хитозана (осадок);

Рисунок 3 – Электрофореграмма белков молока в присутствии различных концентраций хитозана 25,4 кДа (А), 7,7 кДа (Б) и олигохитозана (В, нативный электрофорез) (дорожки 2 - 5) и коагулированного осадка белков (дорожка 6)

Анализ результатов свидетельствует, что при рН 6,3 обезжиренного молока происходит коагуляция мицелл казеинов и сывороточных белков с положительно заряженными молекулами хитозана с молекулярными массами 47,6 кДа, 25,4 кДа, 7,7 кДа. Наиболее полное выделение белков происходит при 0,5 % концентрациях хитозана с различными молекулярными массами, при этом наиболее плотный коагулят образуется с хитозаном 47,6 кДа. Низкомолекулярные олигомеры хитозана не образуют коагулят, при этом они взаимодействуют с белками, меняя их электрофоретическую подвижность в нативном электрофорезе (рисунок 3 В). Это свидетельствует об невозможности олигохитозана к многоточечному связыванию с мицеллами казеина. В результате ионного взаимодействия хитозана с белками обезжиренного молока достигается 90 - 92% выход целевого продукта. Использование исследуемых хитозанов с различными молекулярными массами позволяет получить коагулят, в котором 1г хитозана связывает 6,0 - 6,2 г белков молока.

Белки молока при рН выше их изоэлектрических точек имеют отрицательный заряд, благодаря чему способны к ионному взаимодействию с положительно заряженными молекулами хитозана, результатом которого является образование коагулята. При исследовании взаимодействия отрицательно заряженных белков молока при рН 6,3 с отрицательно заряженным сукцинированным хитозаном коагулят не образуется. При этом происходит взаимодействие с белками молока, которое наблюдается в нативном электрофорезе (рисунок 4).



1. Молоко с 0,1% раствором сукцината хитозана;
2. Молоко с 0,2% раствором сукцината хитозана;
3. Молоко с 0,5% раствором сукцината хитозана;
4. Молоко с 1% раствором сукцината хитозана;

Рисунок 4 – Электрофореграмма нативных белков молока в присутствии сукцинированного хитозана

Процесс коацервации белков молока на молекулярном уровне может быть описан образованием электростатических комплексов между отрицательно заряженными молекулами к-казеинов мицелл и положительно заряженными группами хитозана (рисунок 5).

Мицеллы казеина можно считать макроионами, которые связываются с лигандом, в качестве которого выступает поликатионит - хитозан.

Происходит многоточечное ионное взаимодействие молекул хитозана с мицеллами казеина и белками сыворотки молока. Заряд полиионитного комплекса снижается по мере присоединения к хитозану отрицательно заряженных макроионов белков. В результате образуется электронейтральный комплекс хитозана с казеинами и белками сыворотки. Агрегация электронейтральных комплексов приводит к их выделению в виде комплексного коацервата.

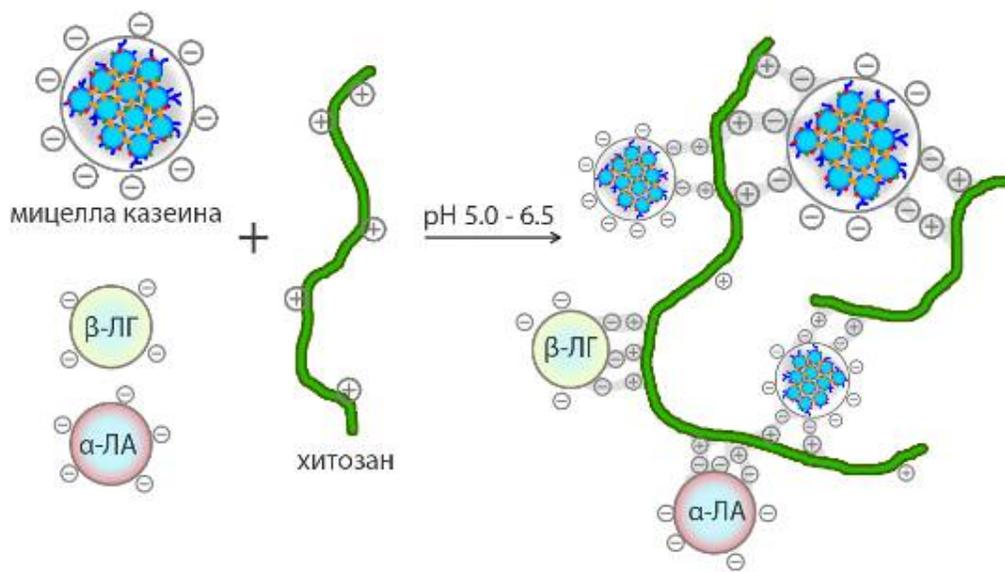


Рисунок 5 – Механизм коацервации мицелл казеина и сывороточных белков хитозаном

Состав фазы комплексного коацервата определяется стехиометрией нерастворимого электронейтрального комплекса. Агрегация частиц комплекса обусловлена их гидрофобным взаимодействием и образованием водородных связей. Необходимо отметить, что в состав полученной белковой массы кроме всех форм казеинов входят и сывороточные белки:  $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -ла [18, 20 - 22, 24, 25, 27]. Предлагаемую технологию получения казеинов с использованием хитозана отличает возможность повышения выхода целевого продукта, который достигает 90 – 92% белка обезжиренного молока, при этом сохраняется pH 6,3 полученной сыворотки, которая может быть использована в дальнейшем для получения концентрата сывороточных белков.

Полученные данные создают теоретические предпосылки к использованию хитозана в практической реализации оригинальной технологии получения казеина из обезжиренного молока.

#### Список литературы:

1. Walstra, P. On the stability of casein micelles / P. Walstra // J. Dairy Sci. – 1990. – № 73. – P. 1965–1979.

2. Horne, D.S. Casein micelle structure: models and muddles / D. S. Horne // *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 148–153.
3. Дымар, О.В. Производство казеина: основы теории и практики / О.В. Дымар, С.И. Чаевский // Минск. – 2007. – 70 с.
4. Остроумова, Т.А. Химия и физика молока / Т.А. Остроумова // Кемерово. – 2004. – 196 с.
5. Ельчанинов, В.В. Современные представления о структуре казеиновой мицеллы // В.В. Ельчанинов / *Молочная промышленность.* – 2011. – №4. – С. 76–78.
6. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy // Dalgleish D.G., Spagnuolo P.A., Douglas Goff H. / *International Dairy Journal*, 14 (2004), 12, 1025-1031.
7. Association of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\beta$ -Lactalbumin with the Casein Micelles in Skim Milk Heated in an Ultra-high Temperature Plant // Oldfield D.J., Singh H., Taylor M.W. / *International Dairy Journal*, 8 (1998), 9 (сентябрь), 765-770
8. Casein micelles and their internal structure // De Kruijff C.G., Huppertz T., Petukhov A.V., Urban V.S. / *Advances in Colloid and Interface Science*, 171-172 (2012), 36-52
9. Changes in the physico-chemical properties of casein micelles in the presence of sodium chloride in untreated and concentrated milk protein / Zhao Z., Corredig M. // *Dairy Science & Technology*, 95 (2015), 1, 87-99.
10. K-Casein terminates casein micelle build-up by its 'soft' secondary structure / Nagy K., Varo G., Szalontai B. // *European Biophysics Journal*, 41 (2012), 11, 959-968
11. Huang, G.Q.; Sun, Y.T.; Xiao, J.X.; Yang, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan // *Food Chem.* 2012, 135, 534–539.
12. Dutta, P.K.; Dutta, J.; Tripathi, V.S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J. Sci. Ind. Res.* 2004, 63, 20–31.
13. Kean, T.; Thanou, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, 62, 3–11.
14. Montilla, E.; Casal, E.; Moreno, F.J.; Belloque, J.; Olano, A.; Corzo, N. Isolation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin from complexes with chitosan. *Food Hydrocoll.* 2007, 17, 459–464.
15. Corredig, M.; Sharafbafi, N.; Kristo, E. Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocoll.* 2013, 25, 1833–1841.
16. Turgeon, S.L.; Schmitt, C.; Sanchez, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* 2007, 12, 166–178.
17. Hoven, V.P.; Tangpasuthadol, V.; Angkitpaiboon, Y.; Vallapa, N.; Kiatkamjornwong, S. Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydr. Polym.* 2007, 68, 44–53.

18. Evdokimov I. A., Alieva L. R., Varlamov V. P., Kharitonov V. D., Butkevich T. V., Kurchenko V. P. Usage of chitosan in dairy products production // Foods and raw materials. – 2015. – V. 3. № 2. – P. 29–39.
19. Головач, Т.Н. Аллергенность белков молока и пути ее снижения / Т.Н. Головач, В.П. Курченко // Труд. Белорусск. гос. ун-та. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем, 2010. – Т. 5, Ч. 1, С. 9–55.
20. Бакулин, А.В. Использование хитозана для выделения  $\beta$ -лактоглобулина из смеси белков молочной сыворотки/ А.В. Бакулин, Н.В. Гавриленко, Е.М. Червяковский, В.П. Курченко, В.П. Варламов // Биотехнология. – 2011, – №1. – С. 34–41.
21. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). / Л.А. Остерман. – Москва: Наука, 1981. – 288 с.
22. Хитозан. под ред: К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова – М.: Центр "Биоинженерия" РАН, 2013. – 593 с.
23. Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras, A. Functional characterization of chitin and chitosan. Current Chemical Biology, 2009. 3, 203-230.
24. В.П. Курченко, Л.Р. Алиева, Т.В. Буткевич, Н.В. Гавриленко Механизм взаимодействия хитозана с белками молочной сыворотки // Труды БГУ.– 2013. – Т.8, ч.1. – С. 45 – 51.
25. Буткевич, Т.В. Использование хитозана в производстве молочных продуктов / Т.В. Буткевич, В.П. Варламов, И.А. Евдокимов, Л.Р. Алиева, В.П. Курченко // Труды БГУ. – 2014, Т.9. Ч.2.
26. Варламов В.П., Щербинина Т.С., Бакулин А.В., Буткевич Т.В., Курченко В.П., Харитонов В.Д., Агаркова Е.Ю., Ботина С.Г. Выделение  $\beta$ -лактоглобулина из сыворотки: использование различных форм хитозана // Молочная промышленность. – 2013. – № 10. – С. 11–12.
27. Урьяш В.Ф., Ларина В.Н, Кокурина Н.Ю., Бакулин А.В., Каштанов Е.А., Варламов В.П. Зависимость степени упорядоченности и термохимических характеристик хитина и хитозана от их биологического происхождения // Журнал физической химии. – 2012. – Т.86. – №1.

## НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МИКРОПАРТИКУЛЯЦИИ В ПЕРЕРАБОТКЕ ТВОРОЖНОЙ СЫВОРОТКИ

Баранов С.А.<sup>1</sup>, Евдокимов И.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ООО «Кизельманн Рус», г. Москва, baranov@kiselmann.org

<sup>2</sup> Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

*Проведен анализ технологий сывороточных белков из сладкой молочной сыворотки. Показаны возможности метода микропартикуляции для обработки концентратов сывороточных белков творожной сыворотки.*

Современные предприятия по переработке молока должны становиться более экологичными, ежегодно снижая количество сбросов, к которым, в первую очередь, относится сыворотка, в окружающую среду. Применение на молочных предприятиях, производящих сыр или творог, современных линий по переработке сыворотки, позволит существенно улучшить экологические показатели предприятия, а также позволит сократить затраты на утилизацию. Большую проблему на сегодня представляет творожная сыворотка, поэтому исследования и разработка технологий её переработки имеют не только коммерческий, но и экологический аспект.

Сравнительный анализ технологий молочной продукции, которые использовались всего десятилетие назад, и того, что используется в настоящее время, позволяет сделать вывод, что современное предприятие более эффективно и экологично. В первую очередь, это касается установок мембранной фильтрации. Технологический рывок связан с расширением областей применения мембранных установок в молочной отрасли.

При изучении областей применения сыворотки производители сыра находятся в более выигрышном положении. Творожная сыворотка имеет кисло-соленый вкус, который обеспечивает молочная кислота и соли, а белковый концентрат приобретает желтовато-зеленоватый цвет. Наибольший интерес для обработки этой сыворотки представляют процессы нанофильтрации, электродиализа и микропартикуляции. Рассмотрим процесс микропартикуляции, в основе которого лежит термическое и механическое воздействие на  $\alpha$ -лактальбумин и  $\beta$ -лактоглобулин. Сывороточными белками принято называть смесь из  $\beta$ -лактоглобулина и  $\alpha$ -лактальбумина, коровьего сывороточного альбумина и иммуноглобулинов [1, 2]. В своем нативном состоянии они существуют в виде компактных шарообразных белков, поэтому могут быть выделены из сыворотки, которая образуется при приготовлении сыра, казеина или творогов. Наибольший коммерческий интерес представляют концентраты и изоляты сывороточных белков. Концентраты содержат от 35 % сывороточных белков в сухом веществе, а также существенное количество биоактивных компонентов и лактозу [3-5].

При микропартикуляции под действием температуры происходит денатурация сывороточных белков и их агрегация. После этого, полученная суспензия проходит механическую обработку для формирования агломератов сывороточных белков, аналогичных жировым шарикам. Важно, что полученная после микропартикуляции суспензия обладает белым цветом и насыщенным сливочным вкусом. Поэтому области применения микропартикулята очень широки, начиная от замещения казеина в продуктах и заканчивая производством спортивного питания. Например, при частичной замене молочного жира в сыре (вместо 30-40 %) на микропартикулят, получившийся продукт имеет низкое содержание жира (11-17 %), но обладает такими же вкусовыми свойствами, как и «обычные» сыры. Использование микропартикулята при производстве сыров позволяет

добиться существенного экономического эффекта. Объем микропартикулята в сырье для производства сыров (без негативных последствий на характеристики конечного продукта) может достигать от 2 до 15 % (от общей массы белка в продукте).

Процесс микропартикуляции сывороточных белков творожной сыворотки полностью решает вопрос с цветом. Образовавшееся суспензия микропартикулированных белков становится белого цвета, что, теоретически, открывает возможность их использования в производстве молочных продуктов. Предварительное сгущение творожной сыворотки на установках ультрафильтрации до (23-25) % СВ (концентрация сывороточных белков около 60%) перед микропартикуляцией, частично удаляет молочную кислоту из концентрата, умягчая вкус, и переводя использование микропартикулята из творожной сыворотки в практическую плоскость.

Задача состоит в использовании продуктов с достаточно высоким содержанием молочной кислоты и солей. По нашему мнению, это могут быть кисломолочные продукты, которые в классическом виде содержат достаточное количество солей. Например, полученный микропартикулят можно использовать на линиях по производству йогуртов, в так называемом «греческом стиле». Это соленые кисломолочные продукты, которые набирают популярность у европейских покупателей. Добавляемый объем микропартикулята в сырьё (без негативных последствий на характеристики конечного продукта) может достигать (5-10) %.

Таким образом, мембранные технологии микропартикуляции позволяют существенно снизить расходы на утилизацию молочной сыворотки и дают возможность создания линейки кисломолочных функциональных продуктов, тем самым, повышая конкурентоспособность и экономическую эффективность.

#### **Список литературы:**

1. Verheul, M., Roefs, S. P. F. M., Mellema, J., de Kruif, K. G. (1998a). Power law behaviour of structural properties of protein gels. *Langmuir.*, 14, 2263-2268.
2. Verheul, M., Roefs, S. P. F. M., de Kruif, K. G. (1998b). Kinetics of heat-induced aggregation of  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 896-903.
3. Verheul, M., Roefs, S. P. F. M. (1998). Structure of whey protein gels studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocol.*, 12, 17-24.
4. Hettiarachchy, N. S., Ziegler G. R. (1994). *Protein Functionality in Food Systems*, Marcel Dekker, Inc. NY.
5. Huppertz, T., Fox, P. F., de Kruif, K. G., Kelly, A.L. (2005). High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1764, 593-598.

## ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОЛИЗАТА $\beta$ -ЛАКТОГЛОБУЛИНА С ЗАДАННЫМ ХИМИЧЕСКИМ СОСТАВОМ И СВОЙСТВАМИ

Богданова Е.В., Мельникова Е.И., Пономарева Н.В.

Воронежский государственный университет инженерных технологий,  
г. Воронеж, ek-v-b@yandex.ru

*Наиболее перспективным подходом для снижения аллергенности молочных продуктов является биокаталитическая конверсия молочных белков, направленная на получение гидролизатов с заданным молекулярно-массовым распределением. По результатам проведенных исследований подобрана смесь ферментных препаратов, обеспечивающая снижение остаточной антигенности основного сывороточного белка молока  $\beta$ -лактоглобулина в ультрафильтрационном концентрате подсырной сыворотки для его последующего применения в технологии функциональных молочных продуктов.*

**Введение.** Ввиду дефицита сырья животного происхождения потенциал импортозамещения в продовольственном секторе в настоящее время тесно связан с ресурсосбережением и рациональной переработкой, в частности молочной сыворотки, объемы которой ежегодно растут [3]. Самый ценный ее компонент – сывороточные белки, содержащие все незаменимые аминокислоты, используемые организмом для структурного обмена. Сдерживающим фактором применения этих белков в пищевых технологиях является их аллергенность.

Одним из перспективных направлений снижения аллергенности молочных белков является их биокаталитическая конверсия, обеспечивающая получение гидролизатов с заданным молекулярно-массовым распределением и остаточной антигенностью.

Для наиболее эффективного гидролиза основного сывороточного белка молока  $\beta$ -лактоглобулина нами предложена предварительная модификация состава подсырной сыворотки, которая включает сбор сыворотки, сепарирование и очистку с применением вибросита, пастеризацию осветленной подсырной сыворотки, охлаждение и ультрафильтрационное концентрирование сывороточных белков. Фактор УФ-концентрирования (3,8 – 3,9) подбирали с учетом получения пищевой композиции с массовой долей белка 3,0 %, в том числе  $\beta$ -лактоглобулина свыше 1,0 % (этот диапазон обуславливает максимальную эффективность работы протеолитических ферментов).

В процессе ферментативного гидролиза происходит высвобождение пептидов и свободных аминокислот, которые изменяют вкусовые характеристики получаемого продукта. Основная технологическая проблема в этом случае – возникновение у белковых гидролизатов горького привкуса или послевкусия. Поэтому при разработке условий биоконверсии  $\beta$ -

лактоглобулина одним из параметров оптимизации является содержание свободных аминокислот (придающих горечь конечным продуктам), которое необходимо минимизировать. Помимо отрицательного влияния на органолептические свойства высокое содержание аминокислот приводит к увеличению осмотичности гидролизатов и снижению их биологической ценности, поскольку скорость всасывания свободных аминокислот в тонком кишечнике человека существенно ниже по сравнению с олигопептидами [1, 4].

Для изучения возможности снижения остаточной антигенности  $\beta$ -лактоглобулина проводили его биоконверсию с применением различных систем пищевых протеаз, специфичных к этому белку (таблица 1). С целью контроля длины пептидов, образующихся при гидролизе  $\beta$ -лактоглобулина, применяли ферментные препараты Flavorpro, которые представляют собой экзопептидазу с высокой активностью и образуют в процессе гидролиза короткоцепочечные пептиды, не обладающие горьким вкусом.

Гидролиз осуществляли в течение 6 ч в вибрационном инкубаторе при 50 °С и частоте вращения 175 об/мин. Для объективной оценки результатов экспериментов полученные гидролизаты проанализированы на содержание  $\beta$ -лактоглобулина методом эксклюзионной хроматографии (рисунок) и ВЭЖХ, а также с применением непрямого конкурентного ИФА.

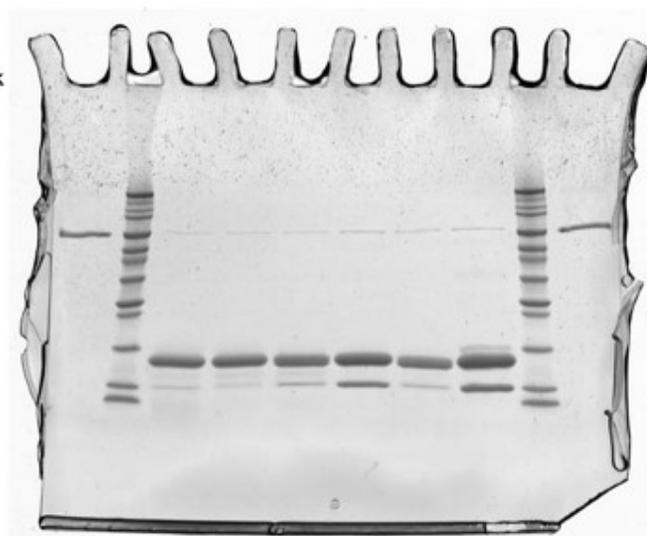
Таблица 1 – Характеристика ферментных препаратов

| Ферментный препарат | Происхождение                | Температура каталитической активности, °С | Оптимальный pH | Субстратная специфичность  |
|---------------------|------------------------------|---|----------------|--|
| Promod 523MDP       | Bacillus thermoproteolyticus | 45 – 60                                   | 6,0 – 9,0      | P1': Ile, Phe, Leu, Val, Ala, Met                                    |
| Flavorpro 750MDP    | Aspergillus spp.             | 45 – 55                                   | 5,5 – 7,5      | P'1: Leu   |
| Promod 439L         | Bacillus licheniformis       | 45 – 60                                   | 6,5 – 9,0      | P1: крупные незаряженные аминокислоты – Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp |
| Flavorpro 766MDP    | Mixed source                 | 45 – 55                                   | 5,0 – 7,5      | P1: незаряженные аминокислоты  |

Анализ остаточной антигенности базировался на сопоставлении последовательностей пептидов, образующихся при взаимодействии аллергенов с различными протеазами, и данных их эпитопного картирования, полученных методом непрямого конкурентного иммуноферментативного анализа [5]. Если протяженность совпадения последовательностей пептида и эпитопа составляла менее 5 а. о., данный пептид относился к потенциально неаллергенным, поскольку короткие олигопептиды (2 – 4 а. о.) теряют способность специфически связываться с иммуноглобулинами и Т-клеточными рецепторами [2].

Диапазон стандартных молекулярных весов (Да)

110000  
97000  
66000  
55000  
45000  
36000  
29000  
24000  
20000  
14200  
6500

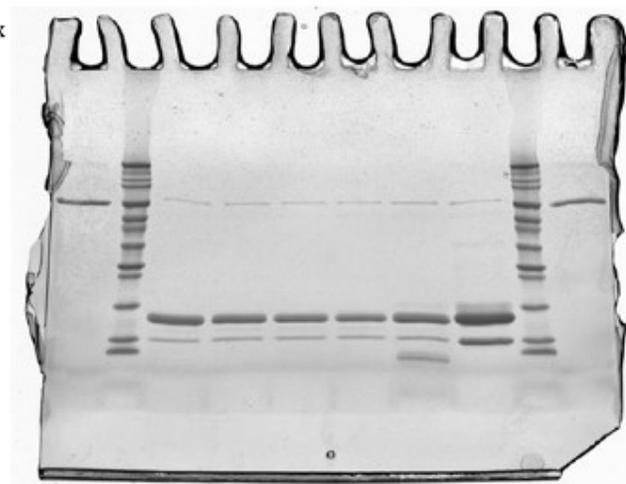


Столб. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1 – BSA; 2 – Широкий диапазон стандартов; 3 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 3 % P523MDP; 4 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 3 % P523MDP и 0,60 % F750MDP; 5 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 3 % P523MDP, 0,60 % F750MDP и 0,5 % P439L; 6 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 3 % F750MDP; 7 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 3 % F750MDP и 0,5 % P439L; 8 – 8 мкл раствора 1 к 20 образца без энзимов; 9 – Широкий диапазон стандартов; 10 – BSA.

Диапазон стандартных молекулярных весов (Да)

110000  
97000  
66000  
55000  
45000  
36000  
29000  
24000  
20000  
14200  
6500



Столб. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1 – BSA; 2 – Широкий диапазон стандартов; 3 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 3 % F750MDP и 0,5 % P439L; 4 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 3 % F750MDP и 0,75 % P439L; 5 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 3 % F750MDP и 1,0 % P439L; 6 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 3 % F750MDP и 1,5 % P439L; 7 – 8 мкл раствора 1 к 20 гидролизата, произведенного с 1,5 % P439L; 8 – 8 мкл раствора 1 к 20 образца без энзимов; 9 – Широкий диапазон стандартов; 10 – BSA.

Рисунок 1 – Распределение продуктов гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина по молекулярным массам ( $\tau = 6$  ч; pH = 6,6 и  $t = 50^\circ\text{C}$ )

Наименьшее количество оставшихся нерасщепленных эпитопов  $\beta$ -лактоглобулина наблюдается при использовании ферментного препарата F766MDP (таблица 2), однако, в этом случае полученный гидролизат будет иметь очень высокое содержание свободных аминокислот и обусловленный их присутствием горький вкус. Следовательно, наиболее перспективно применять ферментные препараты F750MDP и P439L.

Таблица 2 – Анализ остаточной антигенности продуктов гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина различными протеазами

| Аллерген<br>Bos taurus | Количество оставшихся эпитопов / число образовавшихся свободных аминокислотных остатков |         |       |         |
|------------------------|---|---------|-------|---------|
|                        | Ферментный препарат   |         |       |         |
|                        | P523L   | F750MDP | P439L | F766MDP |
| $\beta$ -лактоглобулин | 13/30   | 22/8    | 11/17 | 1/36    |

Установлено, что максимальная степень гидролиза  $\beta$ -лактоглобулина достигается при использовании смеси ферментных препаратов в соотношении 3 % F750MDP и 1,5 % P439L в течение 6 ч ( $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (рисунок). Полученный гидролизат может быть использован в технологии широкого ассортимента молочных и кисломолочных продуктов для частичной замены в рецептуре обезжиренного молока, снижения остаточной антигенности готовых продуктов и обогащения их минеральными веществами и витаминами.

#### Список литературы:

1. Головач, Т.Н. Аллергенность белков молока и пути ее снижения / Т.Н. Головач, В.П. Курченко // Труды Белорусск. госуд. ун-та. Сер: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2010. – Т. 5, Ч. 1. – С. 9 – 51.
2. Круглик, В.И. Теоретическое обоснование и практическая реализация технологий гидролизатов молочных белков и специализированных продуктов с их использованием : автореф. дис. ... докт. техн. наук : 05.18.04 / Круглик Владимир Иванович. – Кемерово, 2008. – 42 с.
3. Мембранное оборудование для переработки различных видов молочных ресурсов / М.С. Золоторева, Д.Н. Володин, В.К. Топалов, Б.В. Чаблин // Молочная промышленность. – 2016. – № 9. – С. 60 – 61.
4. Просеков, А.Ю. Получение ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с использованием протеолитических ферментов / А.Ю. Просеков, Е.В. Ульрих, Е.И. Мельникова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – №. 5. – С. 1089 – 1092.
5. ISO 14675 : 2003 (IDF 186 : 2003). Молоко и молочные продукты. Руководство по стандартизованному описанию методов конкурентного иммуноферментного анализа. Определение содержания афлатоксина M1. – ISO, 2003. – 10 с.

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ В ПРОЦЕССЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Будкевич Р.О., Мартак А.А., Будкевич Е.В., Еремина А.И.  
Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь,  
budkev@mail.ru

*В работе оценивали антиоксидантную активность гидролизатов белков молочной сыворотки на различных стадиях комплексного действия ферментов с параметрами, приближенными к физиологическим условиям пищеварения. Наибольшая антиоксидантная активность выявлена при гидролизе изолята сывороточного белка Prolacta-95 после последовательного действия: 30 минут пепсина и 30 минут панкреатина. Антиоксидантная активность других образцов была ниже.*

**Введение.** Разработка пищевых продуктов с заданными функциональными свойствами является одной из приоритетных задач пищевой биотехнологии. Актуальная проблема в этой области заключается в производстве антиоксидантов в пищевых матрицах, которые могут быть применены в широком спектре пищевых продуктов. В последние годы отмечается рост использования казеинатов и концентратов сывороточных белков для улучшения как текстуры, так и функциональных свойств молочных продуктов [5, 6, 9]. Было показано, что сывороточные белки являются богатыми источниками биоактивных пептидов с высокой антиоксидантной активностью [4, 7, 8, 10, 11]. Исследование, проведенное Mohan и др. [8], связанное с ферментативным гидролизом сывороточных белков, показало, что даже низкая степень гидролиза вызывает значительные структурные изменения, которые приводят к образованию гидролизатов с повышенной антиоксидантной активностью. Поэтому субстраты на основе сыворотки можно считать перспективным источником антиоксидантов для широкого ассортимента молочных и кондитерских изделий.

Целью исследования было оценить антиоксидантную активность (АОА) с использованием амперометрического метода на различных стадиях гидролиза при действии протеолитических ферментов.

### **Материалы и методы**

Объектами исследований являлись концентрат и изоляты сывороточных белков молока от различных производителей и с различным процентным содержанием белка: концентрат сывороточного белка (КСБ) 80% Lactomin-80 (Германия), изолят сывороточного белка (ИСБ) 90% Lactoprot-90 (Германия) и изолят сывороточного белка 95% Prolacta-95 (Франция). Массовая доля белка в концентратах определена по методу Кьельдаля (таблица 1).

На основании опубликованных данных, в настоящем исследовании был смоделирован процесс пищеварения в желудке, с параметрами, приближенных к физиологическим условиям пищеварения [3]. В качестве

ферментных препаратов были использованы пепсин свиной (100000 ЕД.) производства «ШАКО» (Россия) и панкреатин медицинский «Креон 25000» (амилаза 18000 ЕД, липаза 25000 ЕД, протеазы 1000 ЕД) производства «Эбботт Продактс ГмбХ» (Германия). Для установления оптимальной рН использовались NaOH и HCl.

Уровень антиоксидантной активности гидролизатов сывороточных белков, полученных путём комплексного воздействия протеолитических ферментов, был определён на приборе «Цвет Яуза-01-АА» с амперометрическим детектором. Калибровка прибора проводилась по галловой кислоте. Исследования проведены на базе НИЛ «Нанобиотехнология и биофизика» ЦБИ СКФУ в соответствии с инструкцией к прибору и ГОСТ Р 54037-2010.

На первом этапе эксперимента оценивали АОА восстановленных концентратов и изолятов сывороточных белков (К(И)СБ), затем белки были подвергнуты воздействию пепсина (30 минут), а, далее, панкреатина с отбором проб на 30, 60, 90, 120, 150 и 180 минутах его действия.

Таблица 1. – Основные характеристики К(И)СБ

| К(И)СБ | Белок, %   | Жиры, % | Углеводы, % | Содержание сухих веществ (СВ), % |
|--------|------------|---------|-------------|----------------------------------|
| КСБ 80 | 80,61±0,06 | 4,0     | 7,1         | 95,0                             |
| ИСБ 90 | 91,70±0,42 | 1,0     | 3,0         | 95,0                             |
| ИСБ 95 | 97,00±0,42 | 0,4     | 3,0         | 95,0                             |

### Результаты и их обсуждение

Концентрат и изоляты сывороточных белков восстанавливались в дистиллированной воде до массовой доли сухих веществ 30%. Восстановленные белки проявляли низкий уровень АОА в диапазоне 0,29 - 0,51 мг/дм<sup>3</sup>. Результаты полученных данных АОА представлены на рисунке 1.

Действие пепсина не повлияло на уровень АОА, что может быть связано с участием фермента в разрушении центральных пептидных связей, образованных с участием аминокислот - тирозина и фенилаланина, с разрушением белков до полипептидов. Ранее в наших исследованиях уже было показано, что ряд образцов сывороточных белков проявляют низкую АОА, а действие пепсина не позволял получить гидролизаты с повышенной АОА в условиях приближенных к пищеварению [1].

Продолжение гидролиза с использованием панкреатина во всех исследованных образцах К(И)СБ привело к росту АОА образцов гидролизата. Образец КСБ Lactomin-80 проявлял наименьший уровень АОА, с максимумом через 60 минут действия панкреатина. Гидролизат ИСБ Lactoprot-90 характеризовался ростом всех значений АОА в сравнении с КСБ-80, достигая наибольшего уровня на 120 минуте действия панкреатина. Наилучшие результаты АОА отмечены при гидролизе ИСБ Prolacta-95. Максимальные значения АОА достигнуты через 30 минут действия фермента. Сопоставление полученных данных с ранее опубликованными

показателями уровня белка [2] указывают на соответствие действия пепсина резкому падению уровня белка, что не изменяло уровень АОА. Начало реакции с панкреатином соответствует росту АОА при понижении уровня белка до 11,5 мг/мл, что может служить косвенным показателем оптимального уровня повышения АОА.

Таким образом, действие пепсина не влияет на АОА, но подготавливает белки для дальнейшего гидролиза. Наибольшая антиоксидантная активность выявлена при гидролизе изолята сывороточного белка Prolacta-95 после последовательного действия: 30 минут пепсина и 30 минут панкреатина. Антиоксидантная активность других образцов была ниже.

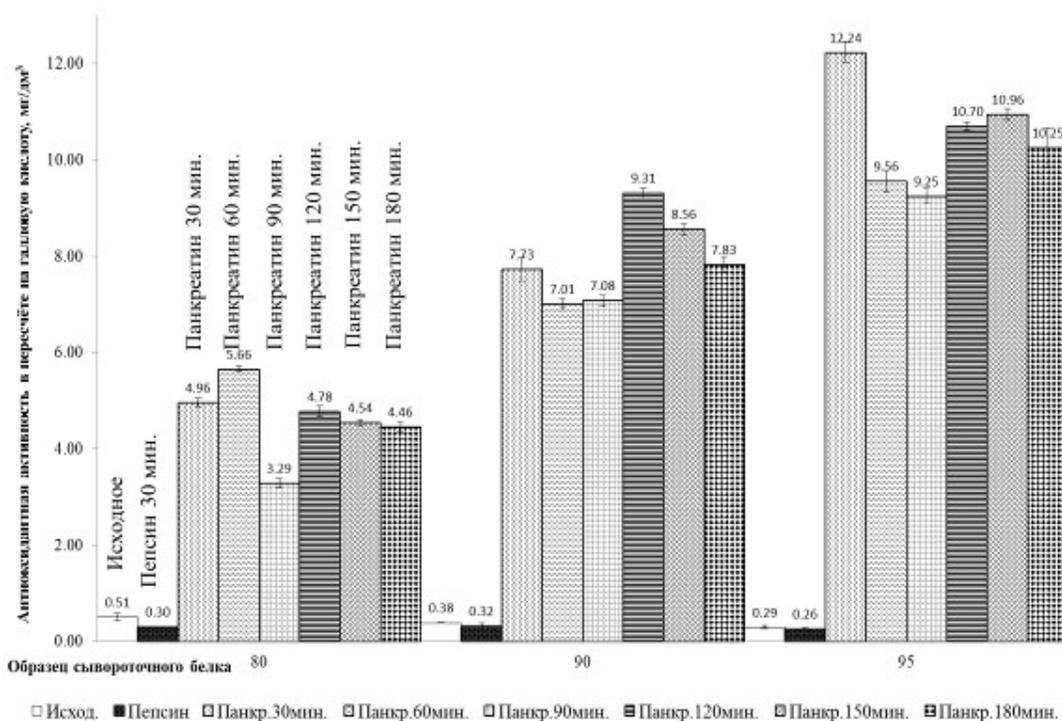


Рисунок 1 – Антиоксидантная активность на этапах гидролиза белков молочной сыворотки при комплексном воздействии протеолитических ферментов

### Список литературы:

1. Будкевич Р.О. Антиоксидантная активность гидролизатов сывороточных белков молока, полученных с применением фермента пепсина / Р.О. Будкевич, А.В. Чаликова, С.А. Емельянов, Г.В. Слюсарев // Вестник АПК Ставрополя. – 2015. № 3 (19). – С. 18-21.
2. Мартак А.А. Применение комплексного воздействия протеолитических ферментов для гидролиза белков молочной сыворотки / А.А. Мартак, Р.О. Будкевич, Е.В. Будкевич, А.И. Еремина // Биоразнообразии, биоресурсы, вопросы химии, биотехнологии и здоровье населения Северо-Кавказского региона: Материалы V (62-й) ежегодной

научно-практической конференции «Университетская наука – региону» Северо-Кавказского федерального университета. – Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2017. – С.53 – 56.

3. Рытченкова, О.В. Оптимизация процесса получения ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с применением протеолитических ферментов / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 8. – С. 663 – 666.
4. Colbert L B and Decker E A (1991) Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey. *Journal of Food Science* 56 1248–1250.
5. Delikanli B and Ozcan T (2014) Effects of various whey proteins on the physicochemical and textural properties of set type nonfat yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* 67 495–503.
6. Gauthier S F and Pouliot Y (2003) Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Journal of Dairy Science* 86 E78–E87.
7. Hernandez-Ledesma B, Davalos A, Bartolome B and Amigo L (2005) Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC–MS / MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 588–593.
8. Mohan A, Udechukwu M C, Rajendran S R C K and Udenigwe C C (2015) Modification of peptide functionality during enzymatic hydrolysis of whey proteins. *RSC Advances* 5 97400–97407.
9. Philippopoulos C D and Papadakis M T (2001) Current trends in whey processing and utilization in Greece. *International Journal of Dairy Technology* 54 14–19.
10. Sugiarto M, Ye A and Singh H (2009) Characterisation of binding of iron to sodium caseinate and whey protein isolate. *Food Chemistry* 114 1007–1013.
11. Tong L M, Sasaki S, McClements D J and Decker E A (2000) Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 1473–1478.

## ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТИНА И ХИТОЗАНА В БИОТЕХНОЛОГИИ

Варламов В.П.

ФГУ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт биоинженерии,  
г. Москва varlamov@biengi.ac.ru

*В статье представлен обзор перспективных направлений использования хитина и хитозана в различных отраслях биотехнологии.*

В настоящее время практическое использование природных полисахаридов, а также их разнообразных модификаций неуклонно растёт. Исследования роли углеводсодержащих биополимеров являются одной из

«горячих точек» современной биотехнологии и родственных научных дисциплин, объединенных под общим названием «Науки о жизни» или «Живые системы». Следует особо отметить такой природный полисахарид как хитин и его дезацетилированное производное – хитозан. За последние годы исследования этих полисахаридов стали отдельной отраслью науки, называемой «хитинологией» [9].

Успешному развитию фундаментальных и практических исследований хитина и хитозана в России, безусловно, способствовало создание в марте 2000 года Общероссийской общественной организации «Российское Хитиновое Общество» ([www.chitin.ru](http://www.chitin.ru)), под эгидой которого регулярно проводятся научные конференции.

Важной особенностью хитина и хитозана является практически неограниченные возможности направленной химической и ферментативной модификации, что позволяет получать структуры любого молекулярного веса – от 1 000 000 Да вплоть до мономерных производных (путем химического, физического или ферментативного гидролиза) [3,4,6,10]. Наличие у хитозана свободной аминогруппы открывает широкие возможности его химической модификации с получением производных с самыми разнообразными группами [5]. И, наконец, путем определенных физико-химических воздействий существует возможность получения стабильных наночастиц (10–100 нм) с дзэта-потенциалом от +40 до –40 мВ [11,12,13].

Также следует подчеркнуть выраженную способность хитозана образовывать комплексы с другими полисахаридами, белками, нуклеиновыми кислотами, меланинами. Это позволяет создавать полиэлектролитные композиты для адресной доставки лекарств, для переноса генетической информации, для удаления аллергенов из молочной сыворотки, для получения БАДов с экстрактами лекарственных растений. Следует также отметить использование хитозана в качестве радиопротектора, для очистки сточных вод, для удаления радионуклидов, для получения антикоагулянтов и создания эффективных раневых покрытий и медицинских имплантов [1,7,8].

Работы выполнены при поддержке гранта РНФ (Соглашение № 16-14-00046).

### **Список литературы:**

1. Богословская О.А., Рахметова А.А., Глущенко Н.Н., Овсянникова М.Н., Ольховская И.П., Варламов В.П., Левов А.Н., Ильина А.В., Зубарева А.А. Препарат, ускоряющий ранозаживление. Патент РФ на изобретение № 2 460 532. Опубликовано: 10.09.2012. Бюлл. № 25.
2. Варламов В.П., Лопатин С.А., Алиева Л.Р., Буткевич Т.В., Гавриленко Н.В., Курченко В.П., Харитонов В.Д., Ботина С.Г. Механизмы комплексообразования белков молочной сыворотки с хитозаном // Молочная промышленность. 2014. № 1. С. 60–64.

3. Васильева Т.М., Лопатин С.А., Варламов В.П. Получение низкомолекулярных форм хитина и хитозана в электронно-пучковой плазме// Химия высоких энергий, 2016, т.50, №2, стр. 155-159
4. Васильева Т.М., Васильев М.Н., Лопатин С.А., Варламов В.П. Способ получения низкомолекулярного водорастворимого хитина в электронно-пучковой плазме, Патент РФ на изобретение № 2 595 162 . Опубликовано: 20.06.2016. Бюлл. № 23.
5. Ильина А.В., Варламов В.П. Нейтрализация активных форм кислорода хитозаном и его производными *in vitro/vivo* // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 1. С.5-20 (обзор).
6. Ильина А.В., Варламов В.П. Противоопухолевая активность гетерохитоолигосахаридов в опытах *in vitro* // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 5–14 (обзор).
7. Куликов С.Н., Тихонов В.Е., Безродных Е.А., Лопатин С.А., Варламов В.П. Сравнительная оценка антибактериальных свойств олигохитозанов в отношении *Klebsiella pneumoniae* // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41. № 1. С. 67–73.
8. Рахметова А.А., Богословская О.А., Ольховская И.П., Жигач А.Н., Ильина А.В., Варламов В.П., Глущенко Н.Н. Совместное действие наночастиц органической и неорганической природы на примере наночастиц хитозана и меди в составе мази на процесс ранозаживления и бактериальные клетки // Российские нанотехнологии. 2015. Т.10. № 1-2, С. 119-123.
9. Хитозан. Под. ред. К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. 593 с. Монография. ISBN 978-5-4253-0596-1.
10. Шагдарова Б.Ц., Лопатин С.А., Коновалова М.В., Ильина А.В., Албулов А.И., Варламов В.П. Способ получения низкомолекулярного хитозана и олигомеров хитозана. Патент РФ на изобретение № 2627870. Опубликовано: 14.08.2017. Бюлл. № 23.
11. Zubareva A., Ilyina A., Prokhorov A., Kurek D., Efremov M., Varlamov V., Senel S., Ignatyev P., Svirshchevskaya E. Characterization of protein and peptide binding to nanogels formed by differently charged chitosan derivatives // *Molecules*. 2013. V. 18. P. 7848–7864.
12. Zubareva A.A., Shcherbinina T.S., Varlamov V.P., Svirshchevskaya E.V. Biodistribution of doxorubicine-loaded succinoyl chitosan nanoparticles in mice injected via intravenous or intranasal routes // *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*. 2014. V. XIX. P. 145–154. DOI: 10.15259/PCACD.19.18
13. Zubareva A.A., Shcherbinina T.S., Varlamov V.P., Svirshchevskaya E.V. Intracellular sorting of differently charged chitosan derivatives and chitosan-based nanoparticles// *Nanoscale*, 2015, v.7, p.7942-7962. DOI: 10.1039/c5nr00327. IF=6.23

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ  
РАСТВОРИМОГО ПЕЧЕНЬЯ ДЛЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА  
Гершончик К.Н.<sup>1</sup>, Кондратова И.И.<sup>1</sup>, Лодыгина С.В.<sup>2</sup>, Лодыгин А.Д.<sup>2</sup>,  
Курченко В.П.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию г. Минск

<sup>2</sup> Северо-Кавказский государственный университет, г. Ставрополь

<sup>3</sup> Белорусский государственный университет, Минск, г. kurchenko@tut.by

*Изучено влияние процесса ферментации клейковины нейтралой при изготовлении детского растворимого печенья. Показано, что происходит значительный протеолиз глиадинов и частично глютеинов с образованием низкомолекулярных пептидов. Процесс ферментации повышает намокаемость и снижает плотность печенья.*

В возрасте 4-6 месяцев у ребенка значительно возрастает потребность в витаминах, минеральных веществах и энергии в связи с интенсивной двигательной активностью, быстрым ростом и ежемесячной прибавкой массы тела. В связи с этим ребенку вводят прикорм [4]. Одним из продуктов прикорма является растворимое печенье. Для детей с 6 месяцев печенье предварительно растворяют в теплом молоке и кормят ребенка из бутылочки или с ложечки. Для детей старше 7 месяцев печенье используют в качестве дополнения к основным блюдам без предварительного растворения. Реологические характеристики теста и структура готовых изделий обуславливают его намокаемость и растворимость. Косвенной характеристикой структуры печенья является плотность: с понижением плотности увеличивается пористость и хрупкость печенья и, как следствие, повышаются его намокаемость и растворимость.

При изготовлении мучных кондитерских изделий находят применение ферментные препараты протеолитического действия, которые позволяют корректировать свойства муки, снижать упруго-эластичные свойства теста, ускорять набухаемость белков, улучшать качества готовой продукции. Кроме того, добавление протеаз в тесто приводит к гидролизу высокомолекулярных белков пшеницы до пептидов, которые легко перевариваются в желудочно-кишечном тракте ребенка. Фермент в процессе выпечки подвергается термоинактивации.

Важным фактором, обуславливающим качество мучных кондитерских изделий, является качество используемой муки. При изготовлении мучных кондитерских изделий преимущественно используют муку пшеничную. В своем составе пшеничная мука содержит от 7,0 до 26,0 % белков, фракционный состав которых представлен альбуминами, глобулинами, глиадинами и глютеинами. Уникальными свойствами глиадиновой и глютеиновой фракции белков пшеницы, в отличие от белков семян других растений, является способность набухать с образованием упругой,

пластичной массы, называемой клейковиной. Основополагающими технологическими свойствами пшеничной муки являются содержание клейковины и ее качество, в значительной степени определяющие структурно-механические свойства теста и качество готовых изделий [1, 2].

Целью работы являлось изучение влияния ферментного препарата и вида пшеничной муки с различным содержанием клейковины на качество растворимого печенья для детского питания.

**Материалы и методы исследования.** Для проведения исследований использовали нейтразу (КФ 3.4.24.28, protease from *Bacillus amyloliquefaciens*, протеолитическая активность 0,9 Е/г, «Sigma», США) и муку пшеничную высшего сорта производства ОАО «Лидахлебопродукт» с содержанием клейковины 25, 28 и 32 %, при этом количество белка в муке составило 10,2, 10,3 и 10,5 % соответственно. Качество клейковины исследуемых видов муки составляет 70-79 усл. ед., мука с содержанием клейковины 25 и 32 % относится к первой группе качества (хорошая), а с содержанием клейковины 28 % – ко второй (удовлетворительно слабая).

Степень протеолиза белков растворимого печенья анализировали методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле [3]. В качестве стандартов молекулярных масс использовали:  $\alpha$ -лактоальбумин - 14,2 кДа;  $\beta$ -лактоглобулин - 18,3 кДа; пепсин - 34,5 кДа; пероксидаза хрена - 40 кДа; бычий сывороточный альбумин - 66 кДа; лактоферрин - 80 кДа. Для оценки электрофореграмм применяли графический редактор Adobe Photoshop.

#### **Результаты и их обсуждение.**

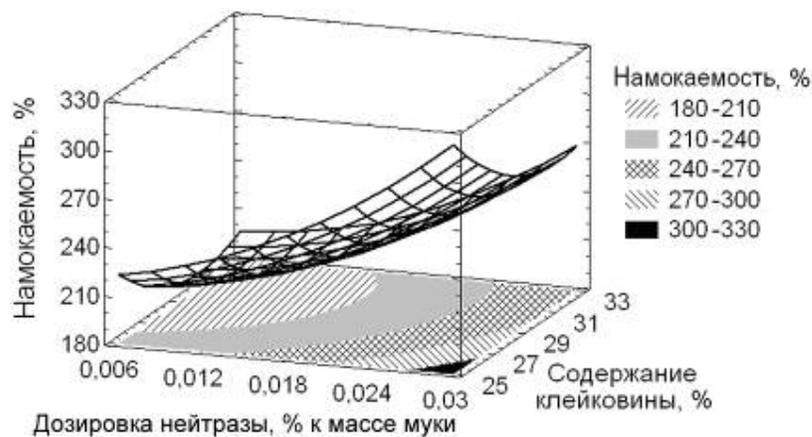
Из муки с различным содержанием клейковины изготавливалось печенье с добавлением нейтразы и без ее внесения (контроль). На стадии замеса теста вносили нейтразу в количестве 0,006, 0,018 и 0,03 % к массе муки. Ферментацию теста осуществляли в течение 30 минут при температуре 35°C.

По результатам органолептической оценки печенья можно сделать заключение, что все образцы имеют правильную круглую форму, вкус и запах – свойственные печенью. С увеличением дозировки фермента улучшается состояние поверхности печенья: снижается количество трещин, поверхность становится более гладкой. Цвет печенья изменяется от светлого до желтого и светло-коричневого за счет накопления продуктов протеолиза, вступающих в реакцию образования меланоидных структур. Печенье приобретает более пористую и хрупкую структуру за счет снижения упруго-эластичных свойств клейковины. Наиболее интенсивный цвет имеют образцы, изготовленные из муки с содержанием клейковины 32 %. Влажность исследуемых образцов печенья находилось в пределах 7-10 %.

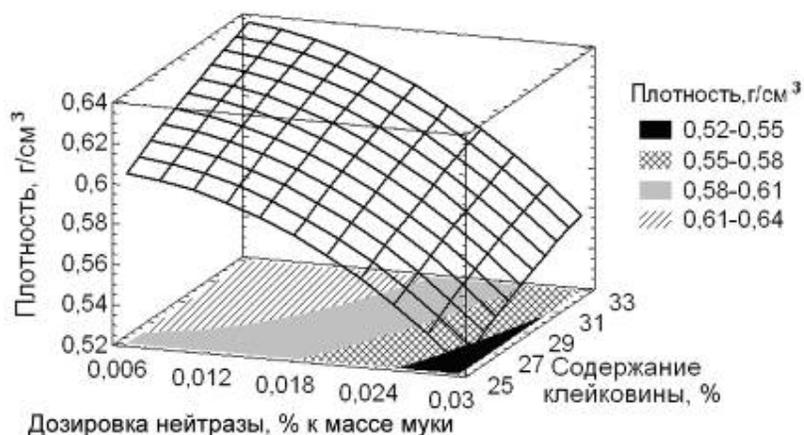
Для оценки намокаемости и снижения плотности печенья в зависимости от содержания фермента и клейковины использовали графическую систему Statgraphics Plus for Windows. Критерием оценки влияния выбранных

факторов на качество растворимого печенья являются функции отклика: намокаемость  $Y_1$  и плотность  $Y_2$ .

На рисунке 1 представлены поверхности отклика, которые отражают влияние нейтразы и муки с различным содержанием клейковины на намокаемость и плотность печенья.



А – намокаемость печенья



Б – плотность печенья

Рисунок 1 – Влияние дозировки нейтразы и содержания клейковины в муке на намокаемость и плотность печенья

Как следует из рисунка 1А, с увеличением дозировки фермента намокаемость всех образцов печенья увеличивается. Печенье, изготовленное из муки с содержанием клейковины 28 и 32 %, имеет близкие значения намокаемости: от 195 до 282 %. Контрольные образцы печенья без добавления нейтразы имеют намокаемость 172 и 168 % соответственно. Максимальную намокаемость имеет печенье, изготовленное из муки с содержанием клейковины 25 %. В зависимости от количества фермента намокаемость печенья составляет 214 - 315 %, что на 10 - 45 % выше, чем у аналогичных образцов с более высоким содержанием клейковины. При этом контрольный образец печенья имеет намокаемость 174 %.

С увеличением дозировки фермента плотность печенья (рисунок 1Б) снижается. Печенье с содержанием клейковины в муке 25 % имеет минимальную плотность 0,61-0,53 г/см<sup>3</sup>. Плотность печенья, изготовленного из муки с содержанием клейковины 28 и 32 %, находится в пределах от 0,63 г/см<sup>3</sup> до 0,54 г/см<sup>3</sup>.

Наряду с достижением необходимых физико-химических показателей качества растворимого печенья, немаловажным является увеличение усвояемости продукта за счет низкомолекулярных пептидов. Электрофоретические исследования показали, что при дозировке нейтразы в количестве 0,006, 0,018 и 0,03 % к массе муки происходит незначительный протеолиз белка.

С целью определения оптимальной дозировки фермента проведены лабораторные выпечки печенья из муки пшеничной высшего сорта с содержанием клейковины 25 %, в которых содержание нейтразы увеличивали до 0,3 % к массе муки с интервалом 0,03 %.

С увеличением фермента до 0,24 % эластичность теста увеличивается, и оно легко поддается прокатке и формованию. При дозировке нейтразы 0,24-0,30 % тесто становится липким, что затрудняет формование тестовых заготовок и снижает качество готовых изделий.

Анализ органолептических показателей качества печенья показал, что с увеличением дозировки фермента цвет продукта изменяется от светло-серого до коричневого, кроме того увеличивается его хрупкость, печенье приобретает более пористую структуру. При использовании нейтразы в количестве более 0,24 % печенье приобретает горький вкус, что обусловлено образованием низкомолекулярных пептидов. Влажность исследуемых образцов печенья находится в пределах от 7,6 до 9,3 %.

Влияние дозировки нейтразы на намокаемость и плотность печенья представлено на рисунке 2.

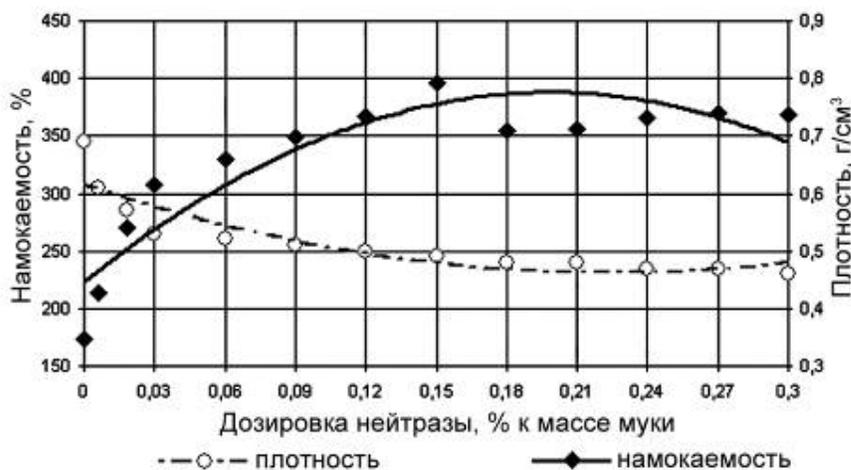


Рисунок 2 – Влияние дозировки нейтразы на намокаемость и плотность печенья

Анализ физико-химических показателей качества печенья (рисунок 2) показывает, что содержание нейтразы от 0 до 0,15% способствует увеличению намокаемости печенья с 174 до 396% и снижению плотности с 0,69 г/см<sup>3</sup> до 0,49 г/см<sup>3</sup>. Дальнейшее увеличение дозировки фермента приводит к некоторому снижению намокаемости печенья: до 338-372%, плотность при этом изменяется незначительно и составляет 0,47-0,49 г/см<sup>3</sup>.

Электрофореграмма белков растворимого печенья, изготовленного с различной содержанием нейтразы, и результаты количественного обсчета электрофореграммы представлены на рисунке 3.

1. Стандарты молекулярных масс; 2. Пшеничная клейковина; 3. Мука пшеничная высшего сорта; 4. Контроль: печенье без нейтразы; 5. 0,006 % нейтразы; 6. 0,018 % нейтразы; 7. 0,03 % нейтразы; 8. 0,06 % нейтразы; 9. 0,09 % нейтразы; 10. 0,12 % нейтразы; 11. 0,15 % нейтразы; 12. 0,24 % нейтразы; 13. 0,27 % нейтразы; 14. 0,3 % нейтразы.

Рисунок 3 – Электрофореграмма белков растворимого печенья, изготовленного с различной дозировкой нейтразы

Анализ результатов влияния количества фермента, добавленного в тесто на стадии его замеса, на содержание глиадиновой и глютениновой фракции и нерастворимых белков пшеничной муки в образцах печенья показал их снижение. Наряду с этим возрастает количество низкомолекулярных пептидов. Наиболее существенное изменение белкового комплекса происходит при дозировке нейтразы 0,15 % к массе муки, при которой количество продуктов гидролиза с молекулярной массой 15 кДа и 20 кДа увеличивается в два раза. Содержание белков с молекулярной массой более 80 кДа (глютенины) снижается в 7 раз, глиадинов и нерастворимых белков - в 2 раза, при этом глютенин расщепляется полностью (рисунок 4). Дальнейшее

увеличение дозировки нейтразы не приводит к существенному изменению контролируемых показателей.

Рисунок 4 – Состав продуктов протеолиза белков в зависимости от дозировки нейтразы

Таким образом, добавление в тесто на стадии его замеса ферментного препарата протеолитического действия – нейтразы, позволяет изготовить растворимое печенье с увеличенной намокаемостью и пониженной плотностью, что положительно отражается на органолептических показателях качества готовых изделий. Установлено, что для изготовления растворимого печенья целесообразно использовать муку пшеничную высшего сорта с содержанием клейковины 25 % и оптимальной дозировкой ферментного препарата 0,15 % к массе муки. Эти условия обеспечивают необходимый протеолиз белков клейковины, высокую намокаемость (396 %) и низкую плотность (0,49 г/см<sup>3</sup>) готового детского печенья.

**Список литературы:**

1. Зубченко, А.В. Физико-химические основы технологии кондитерских изделий / А.В. Зубченко. – 2-е изд. – Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., 2001. – 323 с.
2. Козаков, Е.Д. Биохимия зерна и хлебопродуктов / Е.Д. Козаков, Г.П. Карпиленко. – Санкт-Петербург: ГИОРД, 2005. – С. 83-84.
3. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., 1981.
4. Технология продуктов детского питания / Н.В. Попова [и др.]; под общ. ред. Э.С. Токаева. – Минск: ДеЛи принт, 2009. – С. 37-38.

**ВЛИЯНИЕ САХАРА И ЖИРА НА ПРОЦЕСС  
ФЕРМЕНТАЦИИ КЛЕЙКОВИНЫ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ  
РАСТВОРИМОГО ПЕЧЕНЬЯ ДЛЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА**  
Гершончик К.Н. <sup>1</sup>, Кондратова И.И. <sup>1</sup>, Лодыгина С.В. <sup>2</sup>, Лодыгин А.Д. <sup>2</sup>,  
Курченко В.П. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию, г. Минск

<sup>2</sup> Северо-Кавказский государственный университет, г. Ставрополь

<sup>3</sup> Белорусский государственный университет, Минск, kurchenko@tut.by

*При разработке технологии изготовления детского растворимого печенья изучено влияние процесса ферментации клейковины нейтразой. Показано, что происходит значительный протеолиз глиадинов и частично глютеинов с образованием низкомолекулярных пептидов. Установлено, что сахар по сравнению с жиром обладает более высокой ингибирующей активностью по отношению к нейтразе. В связи с этим, его дозировка при изготовлении растворимого печенья не должна превышать 28 % к массе муки. В качестве жирового ингредиента целесообразно использовать подсолнечное и крестьянское масло в количестве до 17 % к массе муки. Полученные данные позволили научно обосновать и оптимизировать рецептурный состав растворимого печенья по сахару и жиру.*

Продукты для питания детей должны обладать необходимой пищевой и энергетической ценностью, что достигается использованием различных по составу и свойствам рецептурных компонентов. Так, согласно требованиям ТНПА [1-3], содержание белка в растворимом печенье должно составлять 5-11 %, жира – 6-12 %, углеводов – 65-80 %, энергетическая ценность – 330-440 ккал на 100 г продукта, количество добавленных углеводов из сахарозы, сиропа глюкозы, меда, фруктозы не должно превышать 7,5 г/100 ккал.

Основными рецептурными компонентами, входящими в состав растворимого печенья, наряду с мукой, являются сахар, жир и молочные продукты. При изготовлении такого печенья находят применение ферментные препараты протеолитического действия, которые позволяют корректировать свойства муки, снижать упруго-эластичные свойства теста, ускорять набухаемость белков, улучшать качества готовой продукции [4]. Внесение сахара, жира может снижать активность протеаз и, тем самым, влиять на водопоглотительную способность клейковины, процесс образования теста и его структурные свойства, а, следовательно, и на качество печенья [4].

В связи с этим, целью работы являлось изучение влияния сахара и жира вносимых совместно с ферментным препаратом протеолитического действия, на показатели качества растворимого печенья.

**Материалы и методы исследования.** Для проведения исследований использовали муку пшеничную высшего сорта с содержанием клейковины 25

% и ферментный препарат протеолитического действия Нейтразу 1,5 МГ (далее по тексту – ФП) в количестве 0,15 % к массе муки. Ферментацию теста осуществляли в течение 30 минут при температуре 35°С. В качестве жирового компонента использовали подсолнечное масло и масло крестьянское с содержанием белка 0,8 % с соответствующим пересчетом по жиру.

Продукты ферментативного гидролиза белков печени анализировали при помощи SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [5]. Для оценки электрофореграмм применяли графический редактор Adobe Photoshop. Степень протеолиза определяли как относительное количество гидролизованного белка, выраженное в процентах.

**Результаты и их обсуждение.** При изучении белкового комплекса клейковины и пшеничной муки было установлено, что типичными белковыми фракциями для них являются белки с молекулярными массами 15, 20, 30-33, 37-38, 50, 66, 100, 129, 151 кДа, а также низко- и высокомолекулярные (нерастворимые) белки [4]. В результате анализа унифицированных рецептов печени отобраны рецептуры, соответствующие по пищевой и энергетической ценности требованиям, предъявляемым к продуктам детского питания. Установлено, что дозировки сахара и жира в данных рецептурах составляют 18-38 и 8-17 % к массе муки соответственно.

Проведены лабораторные выпечки образцов печени, в которых содержание сахара изменяли от 18 до 38 % с шагом 5 %, жира – от 8 до 17 % с шагом 2,25 %. Для изготовления растворимого печенья оптимальная дозировка ФП составляет 0,15 % к массе муки [4]. Количественный состав белков и пептидов растворимого печенья, изготовленного без ФП и с добавлением ФП в количестве 0,15 % представлен в табл. 1.

Таблица 1 – Количественный состав белков и пептидов растворимого печенья

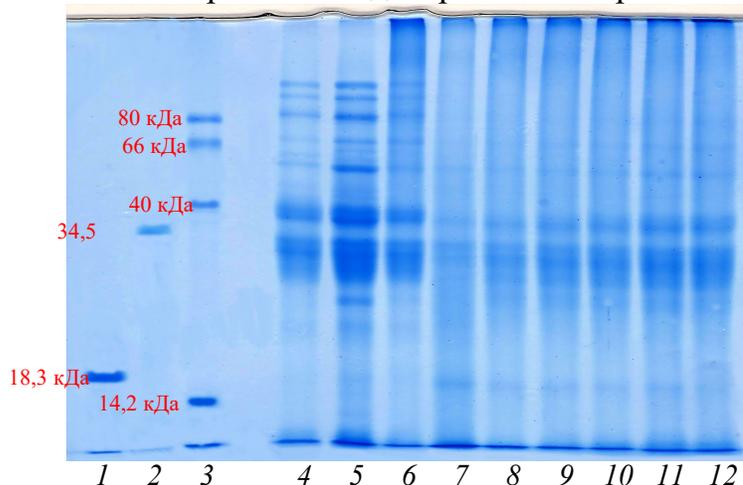
| Дозировка ФП        | Состав белков, %   |                                  |    |       |       |     |     |     |     |     |                     |
|---------------------|--------------------|----------------------------------|----|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
|                     | низко молекулярные | белки с молекулярной массой, кДа |    |       |       |     |     |     |     |     | высоко молекулярные |
|                     |                    | 15                               | 20 | 30-33 | 37-38 | 50  | 66  | 100 | 129 | 151 |                     |
| Контроль (без ФП)   | 23                 | 19                               | 7  | 100   | 100   | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100                 |
| Печенье с 0,15 % ФП | 70                 | 37                               | 24 | 69    | 61    | 66  | 61  | 12  | 5   | 5   | 43                  |

Анализ таблицы 1 показывает, что при внесении ФП белки с молекулярной массой более 30 кДа гидролизуются на 30-88 % относительно их первоначального количества; при этом количество образующихся в результате протеолиза низкомолекулярных белков и пептидов с молекулярной массой 15 и 20 кДа увеличивается в 2-3,5 раза.

В детское печенье вносится значительное количество сахара, который существенно влияет на структуру теста и может оказывать ингибирующие

действие на ферментативную активность нейтразы. Это приведет к изменению намокаемости и плотности печенья.

На рисунке 1 представлены результаты электрофоретического исследования состава белков и пептидов ферментированного растворимого печенья, изготовленного с различной дозировкой сахара.



- |   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1-3. стандарты молекулярных масс;         | 8. 0,15 % ФП, 18 % сахара;  |
| 4. пшеничная клейковина;                  | 9. 0,15 % ФП, 23 % сахара;  |
| 5. мука с содержанием клейковины 25 %;    | 10. 0,15 % ФП, 28 % сахара; |
| 6. контроль: печенье без ФП и без сахара; | 11. 0,15 % ФП, 33 % сахара; |
| 7. 0,15 % ФП, без сахара;                 | 12. 0,15 % ФП, 38 % сахара  |

Рисунок 1 – Электрофореграмма растворимого печенья, изготовленного с различной дозировкой сахара

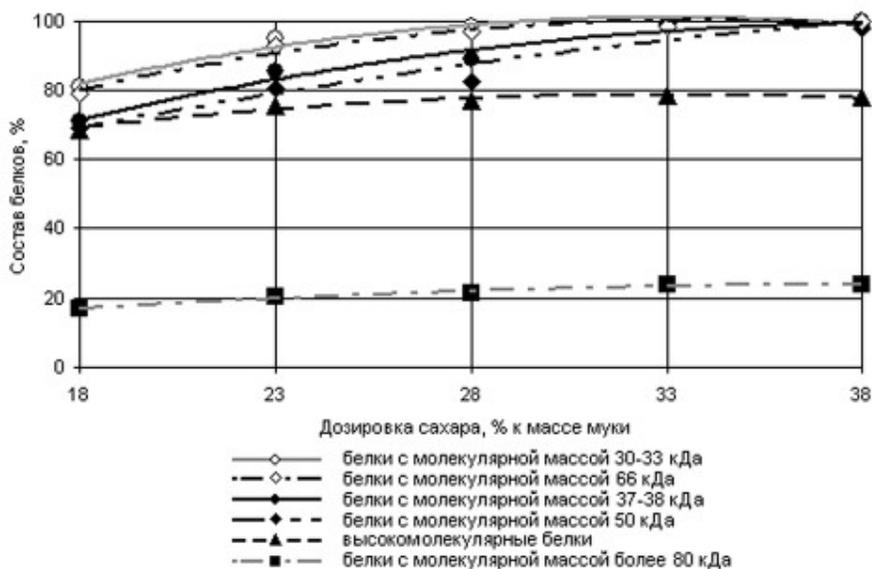


Рисунок 2 – Состав белков растворимого печенья в зависимости от дозировки сахара

Анализ данных, представленных на рисунках 1, 2 и в таблице 1, позволяет сделать вывод, что добавление сахара в растворимое печенье, изготовленное с применением ФП, значительно снижает его активность. Наибольшее влияние сахар оказывает на протеолиз глиадиновой фракции белков с молекулярными массами 30-33 и 66 кДа, который замедляется на 17-52 % при добавлении сахара в количестве до 23 %, а при увеличении его дозировки до 28 % – не происходит. Схоже протекает процесс протеолиза белков с молекулярными массами 37-38 и 50 кДа: при добавлении сахара до 28 % их количество снижается на 16-46 %, а с увеличением его дозировки до 33 % данные фракции не подвергаются гидролизу. Скорость протеолиза белков с молекулярной массой 100, 129, 151 кДа в присутствии сахара снижается в 1,4-2 раза, но инактивации фермента при этом не происходит, так как даже при максимальной дозировке сахара данные фракции гидролизуются на 76 % и 22 % соответственно.

Снижение скорости протеолиза высокомолекулярных белков при добавлении сахара приводит к уменьшению количества продуктов протеолиза – низкомолекулярных белков и белков с молекулярными массами 15 и 20 кДа (рисунок 3).

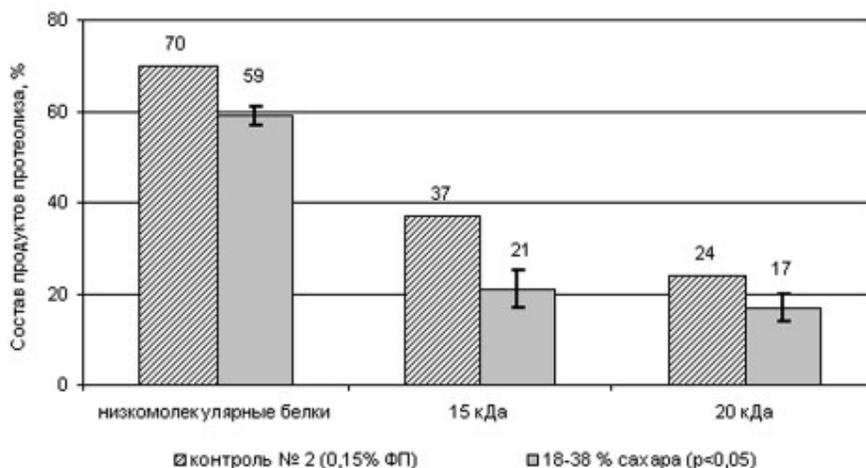


Рисунок 3 – Состав продуктов протеолиза белков детского печенья в зависимости от дозировки сахара

Содержание низкомолекулярных белков, образующихся в результате протеолиза (рисунок 3), уменьшается на 13-19%, белков с молекулярной массой 15 кДа – на 32-54%, а белков с молекулярной массой 20 кДа – на 17-42%. Необходимо отметить, что снижение количества продуктов протеолиза происходит при минимальной дозировке сахара, а с увеличением его содержания, изменения в составе белков и пептидов не достигают контроля.

Таким образом, сахар в количестве более 28 % ингибирует действие протеолитического фермента, при этом протеолиз белков с молекулярными массами 100, 129, 151 кДа снижается в 1,4-2 раза, а белки с молекулярными массами от 30 до 66 кДа не подвергаются гидролизу.

Влияние подсолнечного и сливочного масла на процесс протеолиза белков в составе растворимого печенья представлено на электрофореграмме (рисунок 4) и в таблице 2.

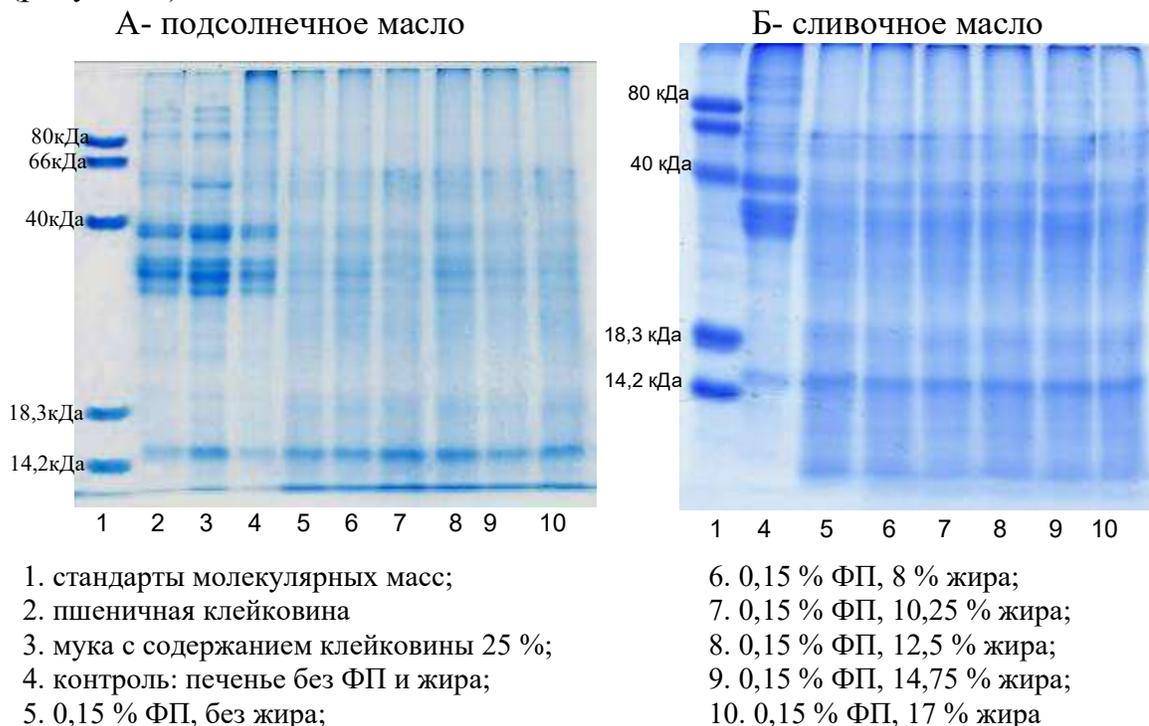


Рисунок 4 – Электрофореграммы белков и пептидов в растворимом печенье с подсолнечным (А) и сливочным (Б) маслом

Таблица 2 – Состав белков растворимого печенья с добавлением жира

| Дозировка жира,<br>% к массе муки                                | Состав белков, %          |                                  |      |       |       |      |      |                     |                            |
|--|---------------------------|----------------------------------|------|-------|-------|------|------|---------------------|----------------------------|
|  | низко<br>молеку<br>лярные | белки с молекулярной массой, кДа |      |       |       |      |      |                     | высоко<br>молеку<br>лярные |
|  |                           | 15                               | 20   | 30-33 | 37-38 | 50   | 66   | 100,<br>129,<br>151 |                            |
| Печенье с 0,15%<br>ФП  | 70                        | 37                               | 24   | 69    | 61    | 66   | 61   | 12                  | 43                         |
| Печенье с 0,15%<br>ФП, 8-17 %<br>подсолнечного<br>масла (p<0,05) | 66±4                      | 39±4                             | 27±3 | 75±3  | 69±2  | 77±5 | 70±3 | 15±2                | 46±4                       |
| Печенье с 0,15%<br>ФП, 8-17 %<br>крестьянского<br>масла (p<0,05) | 65±2                      | 36±2                             | 23±1 | 78±4  | 70±4  | 68±1 | 59±4 | 14±2                | 40±1                       |

Анализ данных, представленных на рисунке 4 и в таблице 2, позволяет сделать вывод, что добавление подсолнечного и сливочного масла снижает протеолиз белков с молекулярной массой 30-33 и 37-38 кДа на 4-21 %. В то же время исследуемые жиры оказывают различное влияние на белки с

молекулярной массой более 50 кДа. Подсолнечное масло замедляет на 8-42% протеолиз белков с молекулярными массами 50, 66, 100, 129, 151 кДа. Количество высокомолекулярных белков при этом уменьшается на 16 %. При внесении сливочного масла содержание белков с молекулярной массой 100, 129, 151 кДа снижается на 33%, а скорость протеолиза белков с молекулярной массой 50, 66 кДа и высокомолекулярных белков не изменяется. Количество низкомолекулярных белков при добавлении исследуемых жиров снижается на 11 %, а состав белков с молекулярными массами 15 и 20 кДа практически не изменяется.

Таким образом, внесение в тесто ферментного препарата в сочетании с подсолнечным и сливочным маслом снижает реологические свойства конечного продукта. Это происходит за счет ингибирования активности нейтразы высокими концентрациями сахара и масел. При этом максимальное снижение процесса протеолиза клейковины происходит при внесении жира в количестве до 8 %.

### **Выводы**

1. Изучено влияние сахара и жира на процесс протеолиза кондитерского теста при изготовлении растворимого печенья для детского питания. Результаты исследований позволили научно обосновать и оптимизировать дозировки сахара и жира, которые с одной стороны обеспечивают необходимые показатели качества растворимого печенья, его пищевую ценность, а с другой стороны позволяют управлять процессом протеолиза кондитерского теста.

2. Для изготовления растворимого печенья дозировка сахара не должна превышать 28 % к массе муки, в качестве жирового ингредиента целесообразно использовать подсолнечное и сливочное масло в количестве до 17 % к массе муки.

### **Список литературы:**

1. Рецептуры на печенье: утв. Госагропромом СССР. – М., МТ РСФСР, 1986. – 248 с.
2. Технология продуктов детского питания / Н.В. Попова [и др.]; под общ. ред. Э.С. Токаева. – Минск: ДеЛи принт, 2009. – С. 152.
3. Мэнли, Д. Мучные кондитерские изделия / Д. Мэнли; пер. с англ. В.Е. Ашкинази; науч. ред. И.В. Матвеева. – СПб.: Профессия, 2008. – С. 222-224.
4. Кондратова, И.И. Исследование влияния протеолитического фермента и вида пшеничной муки на процесс протеолиза кондитерского теста при изготовлении растворимого печенья для детского питания / И.И. Кондратова, К.Н. Гершончик, В.П. Курченко, Н.В. Гавриленко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – Минск, 2012. – №2. – С. 111-118.
5. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М., 1981.

ФЕРМЕНТАЦИЯ БЕЛКОВ МОЛОКА МЕЗОФИЛЬНЫМИ  
ЛАКТОКОККАМИ И ТЕРМОФИЛЬНЫМИ СТРЕПТОКОККАМИ  
Головач Т.Н.<sup>2</sup>, Жабанос Н.К.<sup>1</sup>, Фурик Н.Н.<sup>1</sup>, Катович В.Е.<sup>3</sup>, Емельянов С.А.<sup>3</sup>,  
Лодыгин А.Д.<sup>3</sup>, Курченко В.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> РУП «Институт мясо-молочной промышленности», Минск

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет, Минск

<sup>3</sup> Северо-Кавказский государственный университет, г. Ставрополь

*Получены экспериментальные данные об особенностях гидролиза белков казеиновой фракции при ферментации обезжиренного молока мезофильными лактококками и термофильными стрептококками, влиянии активной кислотности среды на количество расщепленных субстратов. Уровень протеолитической активности *Lactococcus* spp. и *Streptococcus* spp. установлен на основании данных спектрофотометрических исследований и результатов ДСН-электрофоретического разделения образцов ферментированного обезжиренного молока.*

Молочнокислые бактерии (МКБ): *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. и *Streptococcus* spp. – являются Грам-положительными, неспорообразующими, каталаза-отрицательными и факультативно-анаэробными бактериями с ферментативным метаболизмом [1]. Они выделены из различных источников: кисломолочных продуктов, напитков, кормов [8]. В качестве заквасочных культур МКБ нашли широкое применение для получения ферментированных молочных продуктов. Большое экономическое значение имеют штаммы *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Кроме того, некоторые МКБ применяют как пробиотические микроорганизмы [11] и продуценты биологически активных пептидов [5, 9].

Для роста МКБ необходимы экзогенные источники пептидов и аминокислот. Они образуются путем гидролиза казеина – основного белка молока. Протеолиз казеина инициируется расщеплением бактериальной протеиназой, связанной с клеточной стенкой. Образовавшиеся олигопептиды поглощаются МКБ с участием специфического пептидного транспорта и в дальнейшем под действием различных внутриклеточных пептидаз гидролизуются на короткоцепочечные пептиды и аминокислоты [2, 7].

Сравнительный анализ протеиназ клеточной стенки (ПКС) гидролизующих казеин различными штаммами лактококков [13, 14] позволил выявить два типа этих ферментов: 1) НР- или РІ-тип, предпочтительно расщепляющий  $\beta$ -казеин с/без незначительным количеством  $\alpha_{s1}$ -казеина в течение 24 ч ферментации; 2) АМІ- или РІІІ-тип, гидролизующий  $\alpha_{s1}$ - и  $\beta$ -казеин, но с иной сайт-специфичностью, чем РІ-тип.

Интерес к протеолитической системе МКБ связан с их широким применением в различных отраслях пищевой промышленности, в частности,

сыроделии [10], при изготовлении йогуртов [15], заквасок [12] и обработке мяса [3]. Исследования в данном направлении связаны с выявлением и количественной оценкой протеолитической активности МКБ, специфичностью действия.

Цель работы – установление особенностей ферментации белков молока протеолитическими системами мезофильных лактококков и термофильных стрептококков.

### Материалы и методы

Для получения образцов ферментированных молочных белков применяли молоко обезжиренное сухое распылительной сушки по СТБ 1858 с м.д. белка 30% и производства «Fluka» (Швейцария) с м.д. белка 33,8%; в качестве маркеров использовали  $\alpha$ -казеин (м.д. белка  $\geq 70\%$ ),  $\beta$ -казеин (м.д. белка 98%) и  $\kappa$ -казеин (м.д. белка  $\geq 70\%$ ) производства «Sigma» (США). Перечень исследуемых штаммов МКБ (из Централизованной отраслевой коллекции РУП «Институт мясо-молочной промышленности») для получения ферментированного обезжиренного молока представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Перечень лактококков, используемых в эксперименте

| Паспортный номер                 | Видовая принадлежность                                     | Оптимальные условия культивирования |       |
|----------------------------------|--|-------------------------------------|-------|
|                                  |  | pH                                  | T, °C |
| <b>Мезофильные лактококки</b>    |  |                                     |       |
| 1031 M-A                         | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>             | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 2344 M-A                         | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>             | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 1940 M-ADf                       | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>      | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 2071 M-ADf                       | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>      | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 981 M-A                          | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>             | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 100 M-A                          | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>             | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 947 M-ADG                        | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>      | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 1335 M-ADG                       | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>      | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 1557 M-A                         | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>             | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 2325 M-A                         | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>             | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 970 M-AD                         | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>      | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| 17 M-AD                          | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>      | 6,6–6,8                             | 30±1  |
| <b>Термофильные стрептококки</b> |  |                                     |       |
| 439 ST-A                         | <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> | 6,6–6,8                             | 42±1  |
| 438 ST-A                         | <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> | 6,6–6,8                             | 42±1  |
| 613 ST-AV                        | <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> | 6,6–6,8                             | 42±1  |
| 1134 ST-AV                       | <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> | 6,6–6,8                             | 42±1  |

Определение протеолитической активности молочнокислых бактерий (согласно модифицированной методике [4]). Готовили 10% раствор сухого обезжиренного молока (СОМ) в дистиллированной воде; для отделения нерастворимого осадка полученный раствор центрифугировали при 4 g в течение 20 мин; отделяли супернатант и пастеризовали его при 85°C в течение 15 мин. МКБ культивировали в пастеризованном 10% растворе СОМ

в течение 18 ч при оптимальной температуре (таблица 1) и оценивали полученный сгусток (1-я перевивка); далее ферментированным СОМ, полученным на стадии 1-й перевивки, инокулировали очередную порцию пастеризованного молока (2-я перевивка), выдерживали в течение 24 ч; образцы хранили при 8°C. Для получения бактериальной суспензии образцы ферментированного СОМ смешивали с фосфатно-цитратным буфером (рН 7,0) в соотношении 2 : 3, центрифугировали при 6 g, 10 мин – 1-й цикл. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере, центрифугировали при 8 g, 20 мин – 2-й и 3-й циклы. Отобрали супернатант до конечного объема осадка 1,5 мл и измерили ОП<sub>600</sub> полученной бактериальной суспензии. С целью приготовления реакционной смеси 0,5 мл бактериальной суспензии смешивали с 0,5 мл фосфатно-цитратного буфера рН 5,5 и рН 6,5. В качестве субстрата использовали 0,5% раствор СОМ («Fluka», Швейцария) в фосфатно-цитратном буфере (рН 5,5/6,5).

Контрольная проба: 150 мкл субстрата смешивали с 150 мкл бактериальной суспензии и немедленно отбирали 50 мкл образца для ДСН-электрофореза. Для инактивации протеаз в 250 мкл смеси вносили 500 мкл 12% ТХУ и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре; центрифугировали при 13 g, 5 мин.

Опытные образцы: 150 мкл субстрата смешивали с 150 мкл бактериальной суспензии, инкубировали при оптимальной температуре (таблица 1) в течение 24 ч, отбирали 50 мкл для электрофоретического анализа; далее вносили 12% ТХУ и готовили аналогично контрольным образцам.

*Определение протеолитической активности МКБ спектрофотометрическим методом.* Полученные супернатанты опытных и контрольных образцов (после осаждения белка 12% ТХУ) оставляли для последующего определения ПА методом М. Kunitz (1946) [6] согласно описанию [4]. Принцип метода заключается в измерении количества неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктов бактериального протеолиза. Расчет ПА в ед. Kunitz производили исходя из стандартной бактериальной суспензии с ОП<sub>600</sub>=1,0.

*Контроль степени протеолиза ферментированных белков молока* осуществляли согласно модифицированной методике (P. Kabadjova-Hristova et al., 2006), предполагающей использование ДСН-электрофоретического анализа в полиакриламидном геле [16].

Приготовление контрольных и опытных образцов ферментированного обезжиренного молока для нанесения на полиакриламидный гель: 50 мкл образца (реакционной смеси) немедленно ресуспендировали в 50 мкл буфера разделяющего геля, вносили 50 мкл диссоциирующей смеси и инкубировали на кипящей водяной бане, 10 мин; вносили 50 мкл раствора для окрашивания; полученные образцы наносили на гель и осуществляли электрофоретическое разделение белковой смеси [16].

Количественную оценку электрофорезов проводили с помощью системы гель-документации Image Master VDS–SL и программного обеспечения ImageMaster ID Software version 4.20 (Amersham Bioscience, США). В качестве единицы протеолитической активности (ПА) принято относительное изменение интенсивности окрашивания белковых полос (в отн. ед.), соответствующих на ДСН-электрофореграмме общему казеину или  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинам, в результате ферментации субстрата бактериальной суспензией со значением  $ОП_{600}=1,0$ .

### Результаты и их обсуждение

Изучены особенности ферментации белков молока (казеиновой и сывороточной фракций) мезофильными лактококками и термофильными стрептококками. В качестве объекта исследований использовали молочнокислые бактерии, перечень которых представлен в таблице 1.

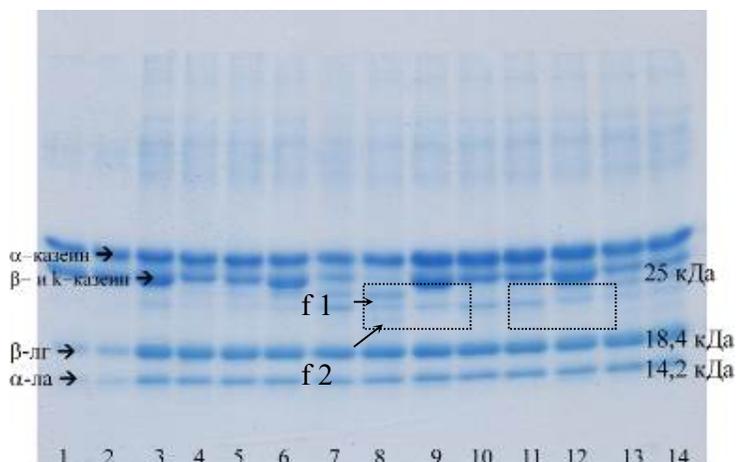
Протеолитическую активность анализировали при pH 5,5 и pH 6,5 в связи с тем, что значение активной кислотности исходного восстановленного СОМ составляет 6,5–6,6 ед. и оптимальные условия культивирования показаны при pH 6,6–6,8 (таблица 1), тогда как при ферментации молока значение активной кислотности понижается до  $\leq$ pH 5,5.

Осуществлен сравнительный анализ продуктов протеолиза белков молока ферментными системами представителей группы мезофильных лактококков: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (далее *Lc. lactis*) 1031 М-А, *Lc. lactis* 2344 М-А, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (далее *Lc. diacetylactis*) 1940 М-ADf, *Lc. diacetylactis* 2071 М-ADf. В результате 2-х перевивок в пастеризованном обезжиренном молоке образовались плотные сгустки. Полученные бактериальные суспензии инкубировали с СОМ (2,5 мг/мл) при 30°C. На рисунке 1 представлена электрофореграмма продуктов микробного протеолиза. Очевидно, что большее количество субстрата расщепляется протеолитической системой *Lc. lactis* 2344 М-А при pH реакционной смеси 6,5. Для *Lc. lactis* 1031 М-А, *Lc. diacetylactis* 1940 М-ADf и 2071 М-ADf влияние активной кислотности на количество расщепленных  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеина не установлено. В пептидном профиле СОМ, ферментированного *Lc. diacetylactis* 1940 М-ADf, выявлен 1 промежуточный продукт протеолиза f 2 (рисунок 1, дорожки 9–11), тогда как при использовании *Lc. lactis* 2344 М-А и *Lc. diacetylactis* 2071 М-ADf обнаруживаются 2 крупных пептида (f 1 и f 2) с аналогичной молекулярной массой и другие минорные компоненты (рисунок 1, дорожки 6–8 и 12–14). Это обусловлено сходными продуктами расщепления  $\kappa$ - и  $\beta$ -казеинов, которые преимущественно подвергаются гидролизу. Кроме того, количество нативных сывороточных белков при ферментации СОМ не изменяется.

Определена протеолитическая активность мезофильных лактококков: *Lc. lactis* 981 М-А, *Lc. lactis* 100 М-А, *Lc. diacetylactis* 947 М-ADG и *Lc. diacetylactis* 1335 М-ADG. Все перечисленные штаммы обладали высокой

сбраживающей активностью, что сопровождалось образованием сгустков плотной консистенции.

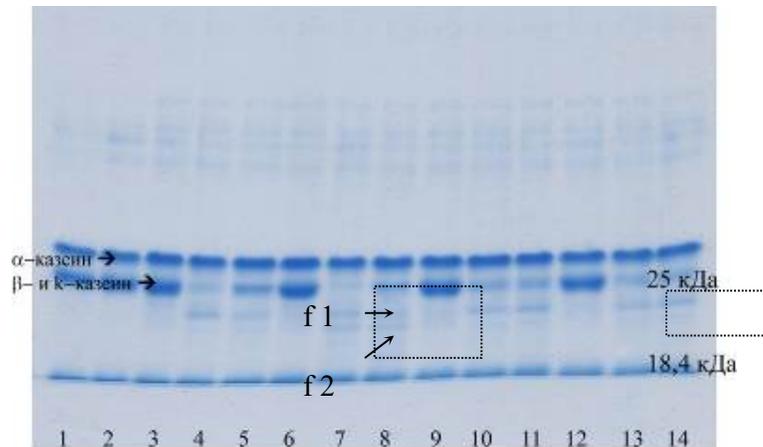
Бактериальную суспензию использовали для определения ПА, что предусматривало применение ДСН-электрофореза (рисунок 1).



- 1 – контроль СОМ (2,5 мг/мл), рН 5,5, 2 – контроль СОМ (2,5 мг/мл), рН 6,5;  
 3 – *Lc. lactis* 1031 М-А (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при рН 5,5, 5 – при рН 6,5; 6 – *Lc. lactis* 2344 М-А (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при рН 5,5, 8 – при рН 6,5;  
 9 – *Lc. diacetylactis* 1940 М-АDf (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при рН 5,5,  
 11 – при рН 6,5; 12 – *Lc. diacetylactis* 2071 М-АDf (контроль, суспензия),  
 13 – продукты протеолиза при рН 5,5, 14 – при рН 6,5

Рисунок 1 – ДСН-электрофореграмма (12% ПААГ) образцов СОМ, ферментированного *Lc. lactis* 1031 М-А и 2344 М-А, *Lc. diacetylactis* 1940 М-АDf и 2071 М-АDf

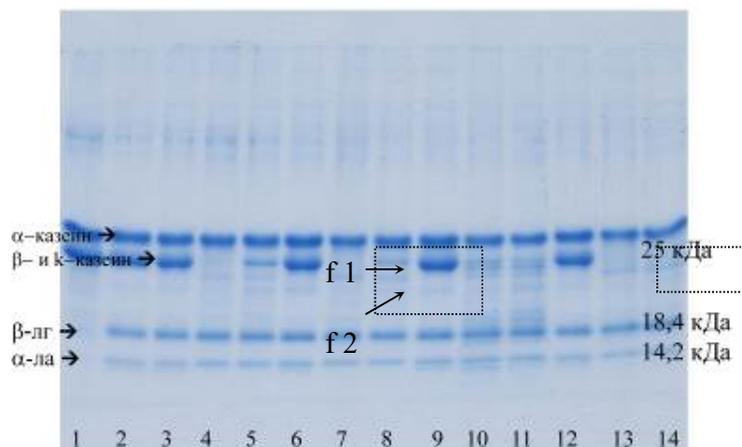
В пептидном профиле СОМ, подвергнутого ферментации *Lc. lactis* 100 М-А, установлено наличие двух крупных пептидов (f 1 и f 2) (рисунок 2, дорожки 6–8), тогда как в случае *Lc. lactis* 981 М-А, *Lc. diacetylactis* 947 М-АDГ и *Lc. diacetylactis* 1335 М-АDГ обнаружен фрагмент f 1 и следовые количества f 2 (рисунок 2, дорожки 3–5 и 9–14). Это, вероятно, указывает как на сходную сайт-специфичность бактериальных эндопептидаз (1), так и различную глубину гидролиза белковых субстратов: κ- и β-казеинов (2); α-казеин практически не расщепляется. В целом, для исследованных штаммов характерны аналогичные продукты протеолиза с молекулярной массой ( $m_r$ ) 18,4 кДа <math>m\_r</math> < 25 кДа. Для *Lc. lactis* 1031 М-А и *Lc. lactis* 2344 М-А очевидно возрастание количества гидролизованной казеиновой фракции при рН 5,5; в то же время для *Lc. diacetylactis* 1940 М-АDf и *Lc. diacetylactis* 2071 М-АDf влияние активной кислотности среды на глубину протеолиза белковых субстратов не установлено.



- 1 – контроль СОМ (2,5 мг/мл), рН 5,5, 2 – контроль СОМ (2,5 мг/мл), рН 6,5;  
 3 – *Lc. lactis* 981 М-А (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при рН 5,5, 5 – при рН 6,5; 6 – *Lc. lactis* 100 М-А (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при рН 5,5, 8 – при рН 6,5; 9 – *Lc. diacetylactis* 947 М-АДГ (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при рН 5,5, 11 – при рН 6,5;  
 12 – *Lc. diacetylactis* 1335 М-АДГ (контроль, суспензия),  
 13 – продукты протеолиза при рН 5,5, 14 – при рН 6,5

Рисунок 2 – ДСН-электрофореграмма (9% ПААГ) образцов СОМ, ферментированного *Lc. lactis* 981 М-А, *Lc. lactis* 100 М-А, *Lc. diacetylactis* 947 М-АДГ и *Lc. diacetylactis* 1335 М-АДГ

Изучены особенности ферментации белков молока представителями группы мезофильных лактококков: *Lc. lactis* 1557 М-А, *Lc. lactis* 2325 М-А, *Lc. diacetylactis* 17 М-АД и *Lc. diacetylactis* 970 М-АД. Для всех исследуемых штаммов после 2-х перевивок показано образование плотных сгустков. В СОМ, ферментированном *Lc. lactis* 1557 М-А, *Lc. lactis* 2325 М-А и *Lc. diacetylactis* 970 М-АД, выявлены аналогичные продукты микробного протеолиза (f 1 и f 2) (рисунок 3, дорожки 3–8 и 12–14). В то же время в пептидном профиле образца, полученного с применением *Lc. diacetylactis* 17 М-АД, показаны многочисленные промежуточные пептиды (рисунок 3, дорожки 9–11). Так сходный состав белков и пептидов характерен для СОМ, ферментированного *Lc. lactis* 1557 М-А и *Lc. lactis* 2325 М-А, тогда как для представителей другой группы – *Lc. diacetylactis* 17 М-АД и *Lc. diacetylactis* 970 М-АД – обнаружены существенные отличия в сайтах расщепления казеинов. Согласно данным ДСН-электрофоретического анализа,  $\alpha$ -казеин гидролизуеться значительно медленнее, чем  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеин, а микробные протеазы практически не реагируют с сывороточными белками. Большая протеолитическая активность наблюдается при рН 5,5 при инкубации СОМ с *Lc. lactis* 1557 М-А; для *Lc. diacetylactis* 17 М-АД, *Lc. diacetylactis* 970 М-АД и *Lc. lactis* 2325 М-А значение активной кислотности среды (рН 5,5 и рН 6,5) не влияет на эффективность расщепления белков молока.

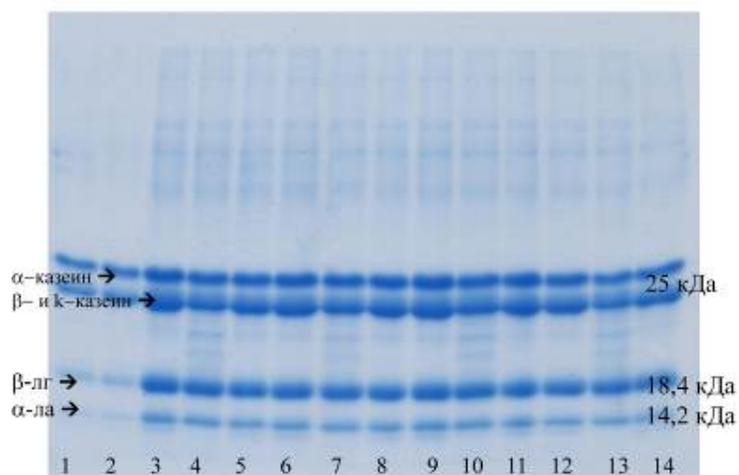


- 1 – контроль (смесь  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов), 2 – контроль СОМ (2,5 мг/мл); 3 – *Lc. lactis* 1557 М-А (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при рН 5,5, 5 – при рН 6,5; 6 – *Lc. lactis* 2325 М-А (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при рН 5,5, 8 – при рН 6,5; 9 – *Lc. diacetylactis* 17 М-АD (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при рН 5,5, 11 – при рН 6,5; 12 – *Lc. diacetylactis* 970 М-АD (контроль, суспензия), 13 – продукты протеолиза при рН 5,5, 14 – при рН 6,5

Рисунок 3 – ДСН-электрофореграмма (9% ПААГ) образцов СОМ, ферментированных *Lc. lactis* 1557 М-А и 2325 М-А, *Lc. diacetylactis* 17 М-АD и 970 М-АD

Определена протеолитическая активность термофильных МКБ: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 439 ST-A, *Str. thermophilus* 438 ST-A, *Str. thermophilus* 613 ST-AV и *Str. thermophilus* 1134 ST-AV. Образование плотных сгустков при сквашивании СОМ (1–2-я перевивки) показано для всех перечисленных штаммов *Str. thermophilus*. Продукты ферментации СОМ термофильными МКБ отражены на рисунке 4. Гидролиз преимущественно проходил при рН 5,5, о чем также свидетельствовало образование промежуточных пептидов (рисунок 4, дорожки 4, 7, 10 и 13). Установлено, что протеолитические системы исследованных *Str. thermophilus* гидролизуют  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеин предпочтительнее, чем  $\alpha$ -казеин; основные сывороточные белки:  $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактальбумин не используются в качестве источника белкового азота.

Согласно полученным экспериментальным данным исследованные штаммы разделены на группы в соответствии с уровнем протеолитической активности, оптимумом рН, субстратной специфичностью (таблица 2). К группе с минимальной ПА (0–0,5 отн. ед.) отнесены термофильные МКБ: *Str. thermophilus* 439 ST-A, *Str. thermophilus* 438 ST-A, *Str. thermophilus* 613 ST-AV, *Str. thermophilus* 1134 ST-AV. Для большинства мезофильных лактококков (11 из 12 штаммов) значение ПА установлено в диапазоне 0,5–1,0 отн. ед.



- 1 – контроль СОМ (2,5 мг/мл), рН 5,5, 2 – контроль СОМ (2,5 мг/мл), рН 6,5;  
 3 – *Str. thermophilus* 439 ST-A (контроль, суспензия), 4 – продукты протеолиза при рН 5,5, 5 – при рН 6,5;  
 6 – *Str. thermophilus* 438 ST-A (контроль, суспензия), 7 – продукты протеолиза при рН 5,5,  
 8 – при рН 6,5; 9 – *Str. thermophilus* 613 ST-AV (контроль, суспензия), 10 – продукты протеолиза при рН 5,5, 11 – при рН 6,5; 12 – *Str. thermophilus* 1134 ST-AV (контроль, суспензия),  
 13 – продукты протеолиза при рН 5,5, 14 – при рН 6,5

Рисунок 4 – ДСН-электрофореграмма (12% ПААГ) образцов СОМ, ферментированного *Str. thermophilus* 439 ST-A, 438 ST-A, 613 ST-AV и 1134 ST-AV

Из них наиболее активными являются *Lc. lactis* 2344 M-A, *Lc. lactis* 2325 M-A и *Lc. diacetylactis* 970 M-AD (ПА достигает 0,83–1,02 отн. ед.). Так как исследованные мезофильные лактококки с низкой эффективностью гидролизуют  $\alpha$ -казеин, они не могут быть отнесены к группе МКБ с высокой протеолитической активностью. В то же время по данным спектрофотометрических исследований у 9 из 12 штаммов мезофильных лактококков значение ПА составило 20–40 ед. Kunitz (таблица 2).

Для представителей термофильных МКБ: *Str. thermophilus* 439 ST-A, *Str. thermophilus* 438 ST-A, *Str. thermophilus* 613 ST-AV, *Str. thermophilus* 1134 ST-AV – максимальное количество расщепленных белковых субстратов установлено при рН 5,5. Мезофильные лактококки *Lc. lactis* (3 из 6 штаммов) эффективнее гидролизуют казеиновую фракцию белков молока при значении рН реакционной смеси 5,5. Для всех штаммов *Lc. diacetylactis* не выявлено изменение ПА при исследуемых значениях активной кислотности (рН 5,5 и 6,5) (таблица 2). Отличия в уровне ПА и при различных показателях рН могут быть обусловлены образованием крупных промежуточных продуктов протеолиза (рисунок 1–3), видимых на ДСН-электрофореграмме, но осаждаемых трихлоруксусной кислотой, что приводит к заниженным значениям ПА при использовании спектрофотометрического метода.

Таблица 2 – Характеристика *Lactococcus* spp. и *Streptococcus* spp. согласно уровню протеолитической активности, оптимума pH, субстратной специфичности

| Группы МКБ                              |   | Перечень МКБ  |
|---|---|---|
| Уровень протеолитической активности, ПА | низкий<br>0–0,5 отн. ед.<br>0–20 ед. Kunitz     | <i>Lc. diacetylactis</i> 1940 M-ADf*, <i>Str. thermophilus</i> 439 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 438 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 613 ST-AV, <i>Str. thermophilus</i> 1134 ST-AV   |
|   | средний<br>0,5–1,0 отн. ед.<br>20–40 ед. Kunitz | <i>Lc. lactis</i> 1031 M-A, <i>Lc. lactis</i> 2344 M-A**, <i>Lc. lactis</i> 981 M-A**, <i>Lc. lactis</i> 100 M-A**, <i>Lc. lactis</i> 1557 M-A, <i>Lc. lactis</i> 2325 M-A, <i>Lc. diacetylactis</i> 2071 M-ADf, <i>Lc. diacetylactis</i> 947 M-ADG, <i>Lc. diacetylactis</i> 1335 M-ADG, <i>Lc. diacetylactis</i> 17 M-AD, <i>Lc. diacetylactis</i> 970 M-AD   |
| Предпочтительное значение pH            | pH 5,5  | <i>Lc. lactis</i> 981 M-A, <i>Lc. lactis</i> 100 M-A, <i>Lc. lactis</i> 1557 M-A, <i>Str. thermophilus</i> 439 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 438 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 613 ST-AV, <i>Str. thermophilus</i> 1134 ST-AV   |
|   | pH 6,5  | <i>Lc. lactis</i> 2344 M-A  |
|   | не влияет                                       | <i>Lc. lactis</i> 2325 M-A***, <i>Lc. lactis</i> 1031 M-A, <i>Lc. diacetylactis</i> 1940 M-ADf, <i>Lc. diacetylactis</i> 2071 M-ADf, <i>Lc. diacetylactis</i> 1335 M-ADG, <i>Lc. diacetylactis</i> 17 M-AD, <i>Lc. diacetylactis</i> 970 M-AD, <i>Lc. diacetylactis</i> 947 M-ADG   |
| Субстратная специфичность               | $\alpha$ -казеин                                | –   |
|   | $\beta$ - и $\kappa$ -казеин                    | <i>Lc. lactis</i> 1031 M-A, <i>Lc. lactis</i> 981 M-A, <i>Lc. lactis</i> 100 M-A, <i>Lc. lactis</i> 1557 M-A, <i>Lc. lactis</i> 2325 M-A, <i>Lc. lactis</i> 2344 M-A, <i>Lc. diacetylactis</i> 1940 M-ADf, <i>Lc. diacetylactis</i> 2071 M-ADf, <i>Lc. diacetylactis</i> 1335 M-ADG, <i>Lc. diacetylactis</i> 17 M-AD, <i>Lc. diacetylactis</i> 970 M-AD, <i>Lc. diacetylactis</i> 947 M-ADG, <i>Str. thermophilus</i> 439 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 438 ST-A, <i>Str. thermophilus</i> 613 ST-AV, <i>Str. thermophilus</i> 1134 ST-AV |

Примечания: \* – по данным спектрофотометрических исследований штамм отнесен к группе со средним и \*\* – низким уровнем ПА; \*\*\* – оптимум pH 5,5.

Среди исследованной выборки мезофильных лактококков и термофильных стрептококков большая часть преимущественно гидролизует  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеин, тогда как  $\alpha$ -казеин практически не используется в качестве субстрата или расщепляется менее эффективно. Кроме того, анализ ДСН-электрофореграмм позволил установить, что микробные протеазы не гидролизуют основные сывороточные белки ( $\beta$ -лактоглобулин и  $\alpha$ -лактальбумин).

### Заключение

Охарактеризована протеолитическая активность представителей различных групп молочнокислых бактерий (*Lactococcus* spp. и

*Streptococcus* spp.) на основании ДСН-электрофоретического анализа при сопоставлении с результатами спектрофотометрических исследований. Данные, полученные спектрофотометрическим и электрофоретическим методами, в совокупности позволяют наиболее полно оценить как уровень ПА и влияние на него активной кислотности среды (по количеству неосаждаемых продуктов ферментативной реакции), так и качественный и количественный состав отдельных фракций (согласно белковым и пептидным профилям ДСН-электрофореграмм).

Результаты научно-исследовательской работы в дальнейшем позволят планировать компонентный состав ферментированных молочных продуктов на основе знаний об уровне ПА используемых МКБ, оптимальных значений каталитической активности микробных протеиназ, особенностей гидролиза белков казеиновой и сывороточной фракций с целью получения источника молочного белка с приемлемыми органолептическими свойствами и физико-химическими показателями.

#### **Список литературы:**

- 1 Axelsson, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology / L. Axelsson // In: Salminen S, von Wright A (eds) Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, New York – 1998. – P. 1–72.
- 2 Christensen, J.E. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria / J.E. Christensen [et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1999. – Vol. 76. – P. 217–246.
- 3 Hammes, W.P. Lactic acid bacteria in meat fermentation / W.P. Hammes, A. Bantleon, S. Min // FEMS Microbiol Rev. – 1990. – Vol. 87. – P. 165–174.
- 4 Kabadjova-Hristova, P. Evidence for proteolytic activity of lactobacilli isolated from kefir grains // P. Kabadjova-Hristova, S. Bakalova, B. Gocheva, P. Moncheva // Biotechnol. Equip. - 2006. – Vol. 20. – P. 89–94.
- 5 Korhonen, H. Food-derived bioactive peptides - opportunities for designing future foods / H. Korhonen, A.M. Pihlanto // Curr Pharm Des. – 2003. – Vol. 9 – № 16. – P. 1227–1230.
- 6 Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties / M. Kunitz // J. Gen. Physiol. - 1946. – Vol. 30. – P. 291–310.
- 7 Kunji, E.R.S. The proteolytic systems of lactic acid bacteria / E.R.S. Kunji [et al.] // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1996. – Vol. 70. – P. 187–221.
- 8 Leroy, F. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry / F. Leroy, L. Devuyst // Trends Food Sci Technol. – 2004. – Vol. 15. – P. 67–78.
- 9 Meisel, H. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties / H. Meisel, W. Bockelman // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1999. – Vol. 76. – P. 207–215.
- 10 Peterson, S.D. Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: a review / S.D. Peterson, R.T. Marshall // J. Dairy Sci. – 1990. – Vol. 73. – P. 1395–1410.

- 11 Saxelin, M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms / M. Saxelin, S. Tynkkynen, T. Mattila-Sandholm, de W. Vos // *Curr Opin Biotechnol.* – 2005. – Vol. 16. – P. 204–211.
  - 12 Spicher, G. Proteolytic activity of sourdough bacteria / G. Spicher, W. Nierle // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1988. – Vol. 28. – P. 487–492.
  - 13 Visser, S. Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein / S. Visser [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1986. – Vol. 52. – P. 1162–1166.
  - 14 Visser, S. Specificity of a cell-envelope-located proteinase (PIII-type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AMI in its action on bovine  $\beta$ -casein / S. Visser, A.J.P.M. Robben, C.J. Slangen // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1991. – Vol. 35. – P. 477–483.
  - 15 Zourari, A. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review / A. Zourari, J.P. Accolas, M.J. Desmazeaud // *Lait.* – 1992. – Vol. 72. – P. 1–34.
- Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. – М.: Наука; 1981. – С. 56–65.

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ЛАКТОЗЫ

Евдокимов И.А., Анисимов Г.С., Шрамко М.И.

Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь,

ievdokimov@ncfu.ru

*Проведен анализ мировой патентной ситуации в области получения лактозы, методов очистки сырья, кристаллизации и сушки. Выявлено стабильное развитие производства лактозы в мире, что подтверждает мировой рынок. Показана возможность получения аморфно-кристаллической формы лактозы из «идеального сырья» – пермеата обезжиренного молока.*

Лактоза широко используется в пищевой промышленности: сухие смеси для детского питания, кондитерские изделия, приправы, заправки для салатов, хлебопечение, джемы, мармелады, напитки, мясопродукты, а также в фармацевтической промышленности: наполнитель таблеток, спреи, антибиотики, гомеопатические препараты и др. В нашей стране нет собственного производства фармакопейной, рафинированной и пищевой лактозы, мы импортируем лактозу фармацевтическую и пищевую из-за рубежа [2]. Востребованность лактозы на внутреннем и мировом рынках, а также имеющиеся ресурсы вторичного молочного сырья в России, дают возможность организовать производство этого продукта пищевого и фармакопейного качества в нашей стране.

В последние годы за рубежом остается стабильным спрос на лактозу пищевую и фармацевтическую. Среди лидеров: ЕС, более 60 % лактозы в используется в пищевой и фармацевтической продукции; США, около 66 % лактозы применяется в сухих продуктах детского питания. По прогнозам экспертов IDF в 2017 году мировой рынок лактозы достигнет 1,23 млрд. \$, в котором лидерами-потребителями являются США, Ирландия, Нидерланды, а также Индия, Китай, Новая Зеландия и Южная Корея, где прогнозируемый региональный темп роста составит 3,8 %/год [2]. Все это способствует стабильному развитию производства лактозы в мире. Это подтверждает и анализ мировой патентной ситуации,- динамика патентования (рисунок 1а) и кумулятивная кривая (рисунок 1б).

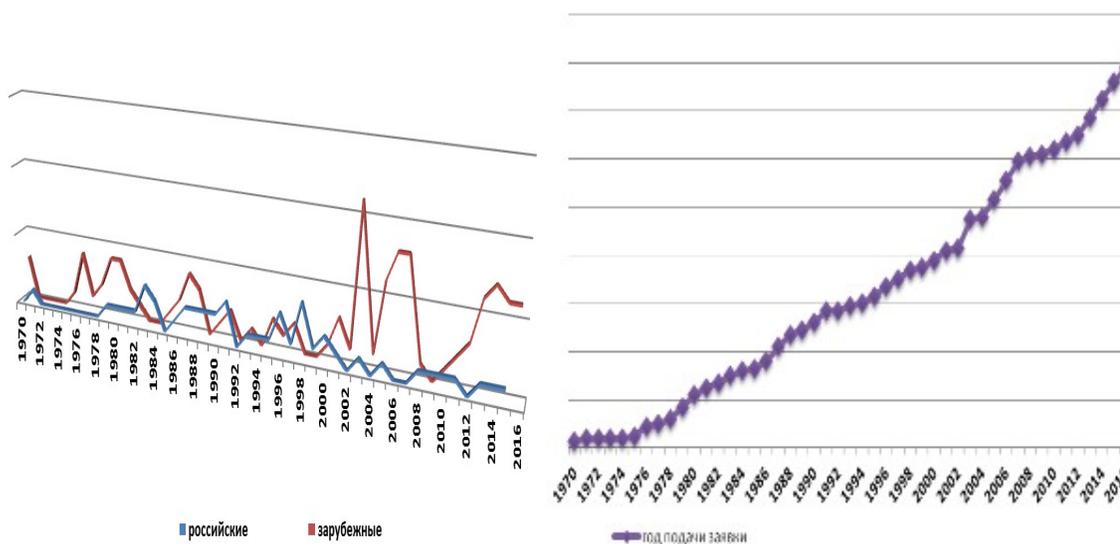


Рисунок 1 – Динамика патентования (а) и кумулятивная кривая динамики патентования (б) патентных документов

Кумулятивная кривая характеризует растущую интенсивность патентования, при чем, точки перегиба (2003, 2007, 2012 г.г.) характеризуют увеличение патентной активности и возрастание интереса к лактозе. На основании анализа патентных документов выявлены ведущие страны, проявляющие повышенный интерес к технологии лактозы (рисунок 2).

Ведущими странами в патентовании технологий и оборудования для производства лактозы являются Россия (RU), США (US), Китай (CN) и Европейское патентное ведомство (EP). В нашей стране наибольшее количество патентных документов имеет «Северо-Кавказский федеральный университет» (г. Ставрополь), и «Вологодская государственная молочнохозяйственная академия им. Н.В. Верещагина». Анализ патентных показывает, что наибольшей активности в поиске сбыта своих разработок проявляют Япония, Нидерланды, Франция и Дания, у которых зарубежных заявок больше, чем национальных.

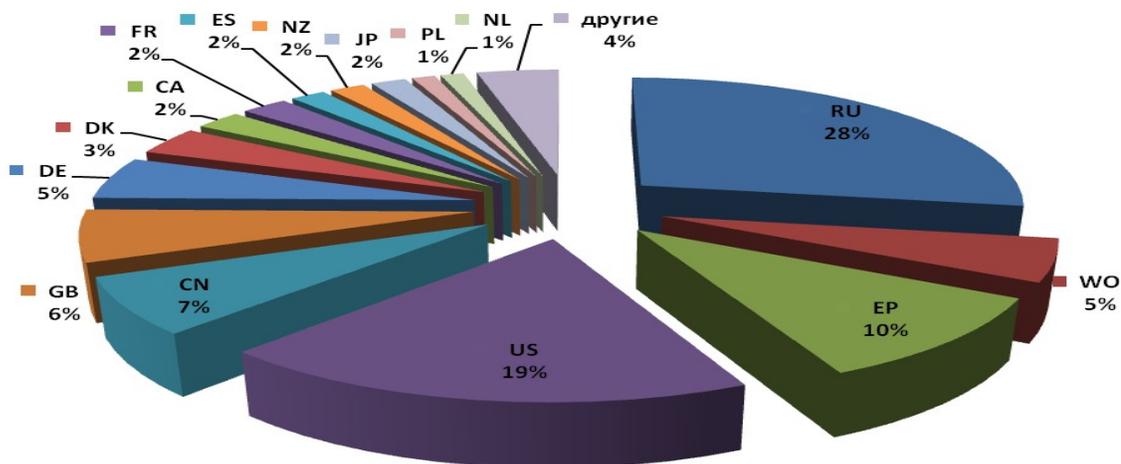


Рисунок 2 – Соотношение патентных документов по лактозе в мире

Теоретически, для производства лактозы можно использовать лактозосодержащее сырье (ЛСС) [1], но на практике применяется подсырная молочная сыворотка и её пермеат, полученный мембранными методами. По проекту\* планируется организовать централизованную переработку ЛЛС на АО «МКС «Ставропольский». Цель и основные задачи проекта заключаются в разработке гибкой технологии, позволяющей за счет комбинирования мембранных и сорбционных методов очистки ЛЛС, получать пищевую и фармацевтическую лактозу в зависимости от требований рынка.

Сущность гибкой технологии сводится к получению кристаллического порошка из пересыщенных растворов. На основании теоретических проработок и результатов исследований разработана концептуальная схема, где предложены варианты получения аморфной, аморфно-кристаллической с мгновенной кристаллизацией и кристаллической лактозы с различным уровнем качества (пищевая, фармацевтическая).

По нашему мнению, пермеат обезжиренного молока является практически идеальным сырьем для получения лактозы [3, 5]. Поэтому на первом этапе проекта апробирована технология получения лактозы из пермеата обезжиренного молока, полученного методом ультрафильтрации и подвергнутого электродиализной обработке [4].

Таким образом, полученный сухой пермеат с мгновенной кристаллизацией, является аналогом лактозы и имеет те же области применения: в производстве хлебобулочных изделий, супов, кондитерских, колбасных и молочных продуктов.

Дальнейшая реализация проекта предусматривает разработку инновационной технологии с получением кристаллов лактозы пищевой из различного ЛСС, которое в мире еще никогда не использовалось. Проблемы, в первую очередь, коснутся стандартизации ЛСС либо по содержанию лактозы и примесей, либо по доброкачественности.

Таблица 1 – Показатели пермеата обезжиренного молока

| Наименование показателя,<br>массовая доля | Натуральный | Концентрированный |         | Сухой   |
|---|-------------|-------------------|---------|---------|
|   |             |                   |         |         |
| Сухих веществ,%                           | 4,5-5,5     | 18-20             | 58-60   | 95-96   |
| Белка, %                                  | 0,17-0,2    | 0,7-0,9           | 2,5-2,8 | 3,0-3,5 |
| Лактозы,%                                 | 4,2-4,5     | 17-18             | 54-58   | 82-88   |
| Золы,%, в т.ч.                            | 0,4-0,5     | 1,6-1,8           | 5,2-5,5 | 8-8,5   |
| - деминерализованный<br>пермеат*          | 0,12-0,15   | 0,5-0,6           | 1,5-1,7 | 2,3-2,6 |
| Кислотность титруемая, Т                  | 7-10        | 30-40             | 120-140 | 10**    |
| Активная кислотность, рН                  | 6,5-6,7     | 6,5-6,7           | 6,5-6,7 | 6,5-6,7 |

\*Уровень деминерализации 70%; \*\* восстановленный до СВ (4,5-5,5)%

### Список литературы:

1. Евдокимов, И.А. Классификация лактозосодержащего сырья / И.А. Евдокимов // Молочная промышленность. – 1995. – № 6. – С. 25.
2. Евдокимов, И.А. Импортозамещающие технологии: молочный сахар или лактоза / И.А. Евдокимов, Г.С. Анисимов, М.И. Шрамко // Молочная промышленность. – 2017. – № 5. – С. 18-20.
3. Евдокимов, И.А. Деминерализованный пермеат как альтернатива молочному сахару / И.А. Евдокимов, Д.Н. Володин, В.К. Топалов, В.А. Михнева // Молочная промышленность. – 2013. – № 2. – С. 38.
4. Евдокимов, И.А. Комплексный подход к разработке наилучших доступных технологий в области переработки пермеатов молочного сырья / И.А. Евдокимов, М.В. Крохмаль, М.И. Шрамко // Материалы МНПК «Экологические, генетические, биотехнологические проблемы и их решение при производстве и переработке продукции животноводства», Т. 2. – Волгоград: ООО «Сфера», 2017. – С.86-90.
5. Золоторева, М.С. Технология молочного сахара и его аналогов с применением мембранных и ионообменных процессов / М.С. Золоторева, Д.Н. Володин, И.А. Евдокимов и [др.] // Молочная промышленность. – 2016. – № 11. – С. 19-20.

\* Работа выполняется при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, договор МОН 03.G25.31.0241

АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИСТЕРИОЗА  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ИЗ ШТАММА «АУФ»  
ЖИВОЙ СУХОЙ «ЛИСТЕКС» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ  
ИММУНОСТИМУЛЯТОРА БИОПРЕПАРАТА «БИФЕРОН-Б»  
ПРОИЗВОДСТВА ООО «НПЦ «ПРОБИОТЕХ»»  
(РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ)

Заерко В.И.<sup>1</sup>, Абакин С.С.<sup>2</sup>, Потапович М.И.<sup>3</sup>, Прокулевич В.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФКП «Ставропольская Биофабрика», г. Ставрополь

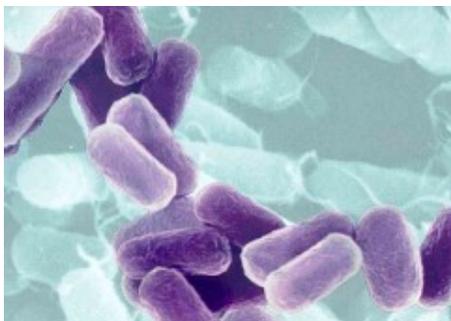
<sup>2</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт овцеводства и козоводства», г. Ставрополь

<sup>3</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск

*ФКП «Ставропольская биофабрика» на протяжении 20 лет ведет наработку и выпуск вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» живой сухой «Листекс». Вакцина эффективно применяется при эпизоотических вспышках заболевания в осенне-зимний период. Заболевание в основном возникает при изменении рациона кормления, при переходе на силосный сбалансированный корм (силосная болезнь).*

**Листериоз** – острая природно-очаговая зооантропонозная инфекционная болезнь многих видов животных и птиц, характеризующаяся поражением центральной нервной системы, сепсисом, абортами и маститами. Листериозом болеет и человек.

На сегодняшний день листериоз животных широко распространен и зарегистрирован в 47 странах мира. Экономический ущерб, наносимый листериозом, определяется высокой летальностью от этой болезни которая достигает 47%, а при нервных формах болезни может достигать 98-100%, снижением продуктивности животных, абортами, большими средствами, затрачиваемыми на проведение лечебно-профилактических и карантинно-ограничительных мероприятий. Возбудитель болезни — листериамонocyтoгенес (*Listeriamonocyto*genes), полиморфная, не образующая спор и капсул аэробная, мелкая (0,3-0,5 \* 0,8-2микрон) бактерия с закругленными концами; встречаются также овоидные, кокковидные формы возбудителя.



Листерии обладают значительной устойчивостью во внешней среде. В почве, навозе, в скотных дворах, возбудитель сохраняет свою жизнеспособность до 11 месяцев, в сене - до 20, в силосе и мясокостной муке - до 4, в овсе - до 9 (при минусовой температуре - до 33 месяцев), в трупах, зарытых в землю — до 4 месяцев, в прудовой воде - до года. Листерии погибают в 5%-ных растворах карболовой кислоты, лизола, креолина и в растворе хлорной извести с 3% активного хлора в течение 10 минут. Пастеризация при 75 градусах убивает листерии за 20 минут, кипячение - за 5 минут.

Эпизоотологические данные: к листериозу восприимчивы по нисходящей - овцы, козы, крупный рогатый скот, свиньи, лошади кролики, куры, гуси, утки, индейки. Болезнь может поражать животных всех возрастов, но особую чувствительность проявляют молодые и беременные животные. К листериозу восприимчив и человек.

Исключительная важность профилактики листериоза подчеркивается зоонозным характером данной болезни и большой опасностью, которую она представляет для людей.

**Материалы и методы.** Работа проведена в ФКП "Ставропольская Биофабрика", лаборатории инфекционных, незаразных болезней и паразитарных болезней (ФГБНУ ВНИИОК). Объектом исследования служили крупный рогатый скот, морские свинки, сыворотка крови.

Эффективность вакцинации животных зависит от определения количественным методом вакцинирующей дозы препарата. Метод основан на высевах вакцины в чашки Петри с агаром Хоттингера с добавлением стимуляторов роста в виде глюкозы, альбумина, гидролизата дрожжей. После двухсуточного культивирования проводится подсчет выросших колоний и определяется концентрация микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> вакцины. Исходя из концентрации, определяется иммунизирующая доза.

Учитывая, что после сублимационной сушки вакцинный штамм *Listeria monocytogenes* находится в состоянии анабиоза, очень важным моментом для достоверного определения живых бактерий в сублимированном продукте являются элективные свойства плотной питательной среды в чашках Петри. Поэтому питательная среда должна обладать высокими ростовыми свойствами для вакцинного штамма листерий для полного определения всех живых форм после сушки. Этот показатель способствует снижению антигенной нагрузки за счет исключения нежизнеспособных микроорганизмов в вакцинирующей дозе биопрепарата. Для определения живых листерий штамма «АУФ» после сублимационной сушки используется метод кратных разведений вакцины физиологическим раствором с посевом каждого разведения на чашки Петри. По истечении 48 часов культивирования ведется подсчет выросших колоний 10<sup>-8</sup> и 10<sup>-9</sup>, выводится средний показатель концентрации живых микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> вакцины. Полученная таким путем концентрация лежит в основе

подсчета одной иммунизирующей дозы для каждого вида животных: овцы ИД<sub>50/мл</sub>= 7,5 млрд., КРС ИД<sub>50/мл</sub>=10 млрд., свиньи ИД<sub>50/мл</sub>=15 млрд. микробных клеток.

**Результаты исследований.** Нами предложен модифицированный метод определения живых микробных клеток путем замены растворения физиологическим раствором на ресуспензирование сухого продукта иммуностимулятора «Биферон-Б» разработанного ООО «НПЦ «ПроБиоТех»», Республика Беларусь. В эксперименте использовали две промышленные серии полуфабриката вакцины листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» живой сухой «Листекс» для проведения сравнительного контроля по определению концентрации живых листерий и иммуногенной активности на морских свинках. Данные представлены в таблице 1 и таблице 2.

Таблица 1 – Сравнительная оценка результатов контроля по показателю «концентрация живых листерий» в вакцине «Листекс»

| Опытные образцы вакцины | Вид растворителя                     | Количество микробных клеток, степень разведения |                  | Концентрация живых листерий, млрд/см <sup>3</sup> | Количество доз во флаконе |
|-------------------------|--------------------------------------|---|------------------|---|---------------------------|
|                         |                                      | 10 <sup>-8</sup>                                | 10 <sup>-9</sup> |   |                           |
| образец №1 от 21.04.17  | МПБ с 20% сыворотки КРС и 1% глюкозы | 22  | 2                | 21  | 28                        |
|                         |                                      | 24  | 2                |   |                           |
|                         |                                      | 19  | 2                |   |                           |
| образец №2 от 21.04.17  | Биферон-Б                            | 20  | 2                | 24  | 32                        |
|                         |                                      | 20  | 3                |   |                           |
|                         |                                      | 23  | 3                |   |                           |
| образец №3 от 21.04.17  | МПБ с 20% сыворотки КРС и 1% глюкозы | 28  | 3                | 30  | 40                        |
|                         |                                      | 30  | 3                |   |                           |
|                         |                                      | 32  | 3                |   |                           |
| образец №4 от 21.04.17  | Биферон-Б                            | 35  | 3                | 36  | 48                        |
|                         |                                      | 37  | 4                |   |                           |
|                         |                                      | 33  | 4                |   |                           |

Данные представленные в таблице 1 свидетельствуют о более полном выявлении живых микробных клеток вакцинного штамма «АУФ» при использовании в качестве растворителя «Биферон-Б».

Следующим этапом работы является сравнительная оценка иммуногенной активности образцов вакцины с разными методами определения жизнеспособности. Были отобраны 4 группы опытных животных (n=10) и контрольная (n=10).

Анализируя данные, представленные в табл.2, можно сделать вывод, что применение иммуностимулятора «Биферон-Б» при определении степени иммуногенности вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» живой сухой «Листекс» не влечет за собой снижение иммуногенной активности вакцины.

Таблица 2 – Сравнительная оценка иммуногенной активности вакцины «Листекс» с разными методами определения иммунизирующей дозы в вакцине

| Опытные образцы вакцины | Вид растворителя      | Кол-во доз во флаконе | Дата вакцинации | Дата заражения | УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ |      |          |      |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|----------------|------------------|------|----------|------|
|                         |                       |                       |                 |                | Вакцинированные  |      | Контроль |      |
|                         |                       |                       |                 |                | Живы             | Пали | Живы     | Пали |
| образец №1 от 21.04.17  | физраствор рН 7,2-7,4 | 28                    | 27.07.17        | 10.08.17       | 9                | 1    | -        | 10   |
| образец №2 от 21.04.17  | Биферон –Б            | 32                    | 27.07.17        | 10.08.17       | 10               | -    |          |      |
| образец №3 от 21.04.17  | физраствор рН 7,2-7,4 | 40                    | 27.07.17        | 10.08.17       | 8                | 2    |          |      |
| образец №4 от 21.04.17  | Биферон –Б            | 48                    | 27.07.17        | 10.08.17       | 9                | 1    |          |      |

Профилактическая эффективность вакцины ресуспензированной биопрепаратом «Биферон-Б» составила 95% против 85% - вакциной, ресуспензированной традиционным физиологическим раствором.

**Заключение.** Результаты исследований подтверждают эффективность использования биопрепарата «Биферон-Б» в качестве растворителя для вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» живой сухой «Листекс». Биопрепарат нетоксичен в используемых дозах, не вызывает побочных реакций в организме, стимулирует гуморальный и клеточный иммунитет.

Использование биопрепарата «Биферон – Б» в качестве растворителя вакцин позволит достичь более напряженного иммунного ответа при вакцинациях животных.

#### Список литературы:

1. Бакулов, И.А. Листериоз сельскохозяйственных животных / И.А. Бакулов. – М.: Колос, 1967. – 296 с.
2. Гильмутдинов, Р.Я. Инфекционные болезни экзотических и диких животных / Р.Я. Гильмутдинов, А.В. Иванов, А.Н. Панин. – М.: Колос, 2010. – 668с.
3. Калишин, Н.М. Листериоз крупного рогатого скота / Н.М. Калишин. – Л.: Колос. Ленингр. отделение, 1987. – 96 с.
4. Методические рекомендации по лабораторной диагностике листериоза животных и людей. – Москва, 1987.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОСПИННИНГА  
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ 3D-СКАФФОЛДОВ  
С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ КУРКУМЫ

Капустин М.А.<sup>1</sup>, Чубарова А.С.<sup>1</sup>, Курченко В.П.<sup>1</sup>, Лодыгин А.Д.<sup>2</sup>,  
Ржепаковский И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет, г. Минск  
maximkapustin84@gmail.com

<sup>2</sup> Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

*Разработана технология создания композитных нановолокнистых материалов с включением комплексов гидрофобных органических соединений с циклодекстринами в структуру нановолокон. С использованием метода электроспиннинга получены композитные 3D-скаффолды на основе пуллулана с включением в структуру нанонитей биологически активных веществ *Curcuma longa* L – куркумина, деметоксикуркумина и бисдеметоксикуркумина. Показано, что равномерное распределение куркуминоидов в структуре формирующихся скаффолдов наблюдается в случае внесения в рабочий раствор пуллулана комплексов включения диарилгептаноидов с циклическими олигосахаридами – бета-циклодекстрином и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрином.*

### **Введение**

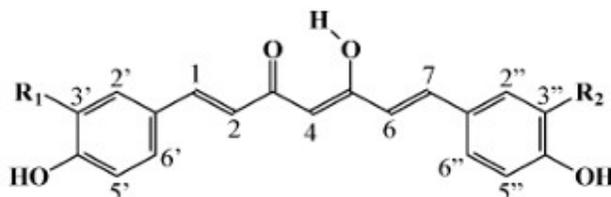
Электроспиннинг, или электроформование, представляет собой процесс получения нановолокон из раствора различных полимеров под действием электростатических сил. При наличии высоковольтного потенциала, из раствора, подаваемого в иглу-капилляр, происходит вытягивание тонкого волокна. При этом происходит испарение растворителя и формируется тонкая полимерная нить, которая, укладываясь на подложку, формирует покрытие из нанонитей – скаффолды. Толщину нитей можно варьировать, используя различные режимы нанесения покрытия и различные концентрации полимеров [1, 2].

С использованием технологии электроспиннинга можно получать различные биосовместимые материалы для использования в медицине в процессе лечения различных травматических повреждений, ожогов, обморожений и пр.; в качестве основы для выращивания стволовых клеток, при производстве имплантантов, при послеоперационном лечении онкологических заболеваний. В качестве основы для таких покрытий можно использовать различные биополимеры белковой (коллаген, желатин) и углеводной природы (хитозан, пуллулан). При добавлении к раствору полимера различных биологически активных веществ (БАВ), происходит включение частиц БАВ в структуру полимерных нанонитей, и, в процессе электроспиннинга, можно получить композитный нетканый материал. При этом возможно получать наноструктуры с несколькими модификаторами [2,

7]. При нанесении таких покрытий на поверхность раны будет происходить контролируемое пролонгированное высвобождение молекул БАВ или факторов роста, антибиотиков и прочих соединений, что положительно скажется на динамике заживления и значительно сократит сроки выздоровления [7].

При исследовании биологических активностей препарата куркумина, был выявлен ряд фармакологических эффектов, проявляющихся при применении этой субстанции для лечения пациентов, страдающих раковыми заболеваниями, заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Фармакологические эффекты применения препаратов куркуминоидов проявлялись при лечении артритов, язвенных колитов, гастрита, витилиго, псориаза, атеросклероза, диабета, холециститов, болезни Паркинсона, хронических бактериальных простатитов и пр. Для препарата куркумина обнаружено более 195 возможных разнообразных мишеней участвующих в регулировании клеточных процессов [6].

Препарат куркумина представляет собой смесь трех основных диарилгептаноидов: 75–77 % составляет куркумин (диферулоилметан), 15–18 % – деметоксикуркумин, 5–7 % – бис-деметоксикуркумин. По химической структуре куркумин, представляет собой бис- $\alpha$ ,  $\beta$ -ненасыщенный  $\beta$ -дикетон, образующийся в результате конъюгации двух молекул феруловой кислоты, соединенных посредством метиленового мостика. В растворе молекулы куркуминоидов находятся в кето-енольной форме, стабилизированной водородными связями. На рисунке 1 приведены структурные формулы основных диарилгептаноидов [4, 6].



**C: R1=OCH<sub>3</sub>, R2=OCH<sub>3</sub>**

**DMC: R1=OCH<sub>3</sub>, R2=H**

**BDMC: R1=H, R2=H**

Рисунок 1 – Структурные формулы куркумина (C), деметоксикуркумина (DMC), бисдеметоксикуркумина (BDMC)

Куркуминоиды практически не растворимы в водных системах, а также нестабильны под действием света и легко окисляются. В результате образования наноструктур с бета-циклодекстрином и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрином, для препарата куркумина наблюдается увеличение водорастворимости, а также термо- и фотостабильности, что обуславливает увеличение их биодоступности и пролонгирование биологических эффектов [3, 5].

Целью исследования являлось получить нетканые композитные нанопокрывтия (скаффолды) на основе пуллулана с комплексами включения куркумина и циклических олигосахаридов.

### **Материалы и методы**

Для получения скаффолдов нами использовалась установка для электроформования Yflow® StartUp Electrospinning Machine (Испания). Процесс электроформования проходил при следующих рабочих параметрах: напряжение на инжекторе – 20.8 kV, напряжение на коллекторе – 0 kV. Расстояние между инжектором и коллектором – 0.2 м, внутренний диаметр иглы – 0.5 мм. Скорость подачи рабочего раствора – 2.8 мл\*ч<sup>-1</sup>. В качестве рабочих растворов использовали 30% раствор пуллулана в деионизированной воде, 20% раствор пуллулана в деионизированной воде, а также 20% раствор пуллулана с добавлением бета-циклодекстрина в соотношении 3:1, 20% раствор пуллулана с добавлением 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина в соотношении 3:1 и 20% растворы пуллулана с добавлением суммарного препарата куркумина и комплексов включения куркумина с бета-циклодекстрином и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрином при соотношении 3:1. Нанесение нановолокон проводилось на алюминиевую фольгу толщиной 9 мкм (ТУ У 74.8-21509860-001-2002), закрепленную на коллекторе.

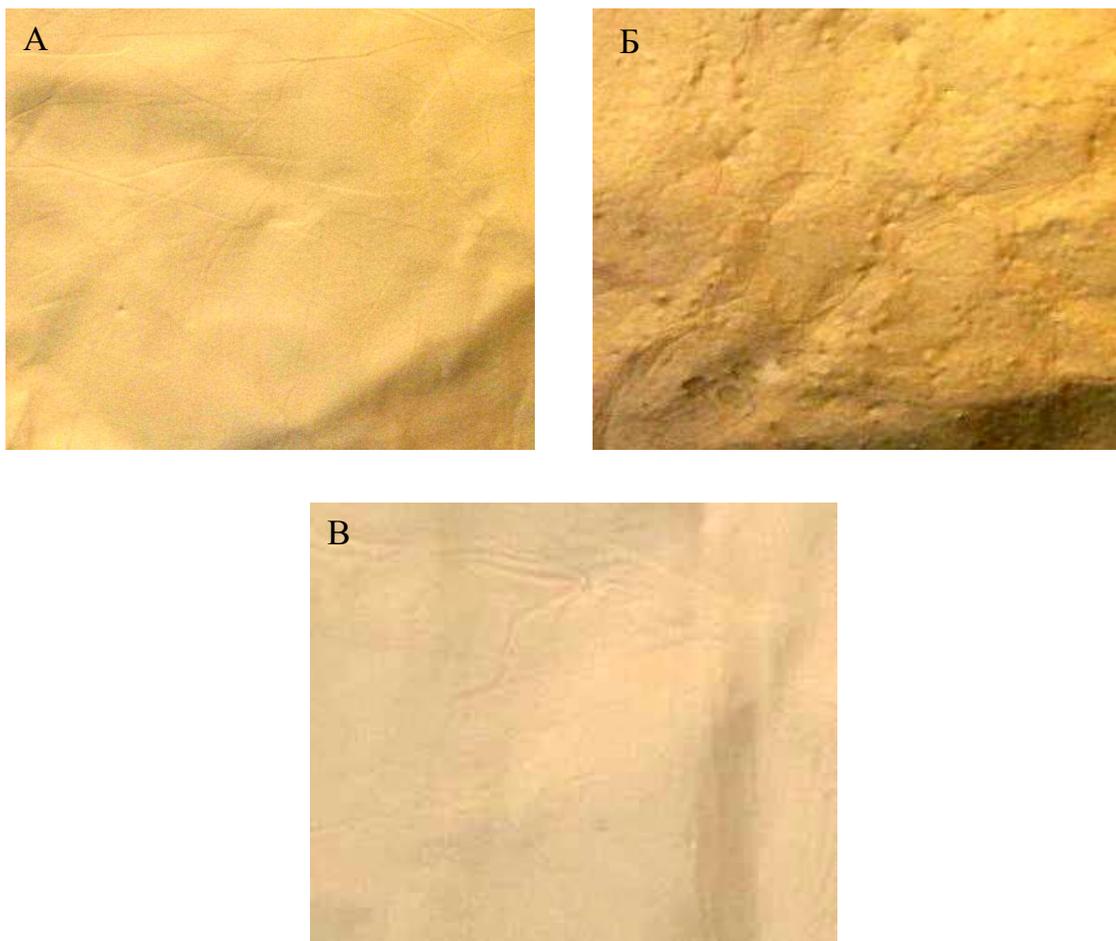
Наноструктурные комплексы были получены с использованием комбинированного метода комплексообразования – сорастворение с последующим замораживанием и лиофилизацией [4, 5].

Комплексы включения препарата куркумина были получены при молярном соотношении бета-циклодекстрин:куркумин и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин:куркумин – 2:1. При такой стехиометрии наблюдается эффективное включения молекул вещества гостя в неполярную полость тора молекул циклодекстрина.

Для получения наноструктур куркумина, нами были взяты навески препарата куркуминоидов и необходимые количества бета-циклодекстрина и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина. Куркумин растворяли в смеси ацетон:96% этиловый спирт в соотношении 20:80 при температуре 20 °С. Бета-циклодекстрин и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин растворяли в деионизированной воде и инкубировали на термостатируемой магнитной мешалке до полного растворения при температуре 85–90 °С. После завершения растворения, растворы фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм. Затем к растворам бета-циклодекстрина и 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина, охлажденным до 50 °С при интенсивном перемешивании по каплям прибавляли раствор куркуминоидов. После интенсивного перемешивания в течении 6 часов и охлаждения до 20 °С, полученные смеси замораживали и лиофилизировали в течение 24 часов. Полученный порошок растирали до мелкодисперсного гомогенного препарата и просеивали через сетчатое сито с размером ячеек 0,02 мм.

## Результаты и обсуждение

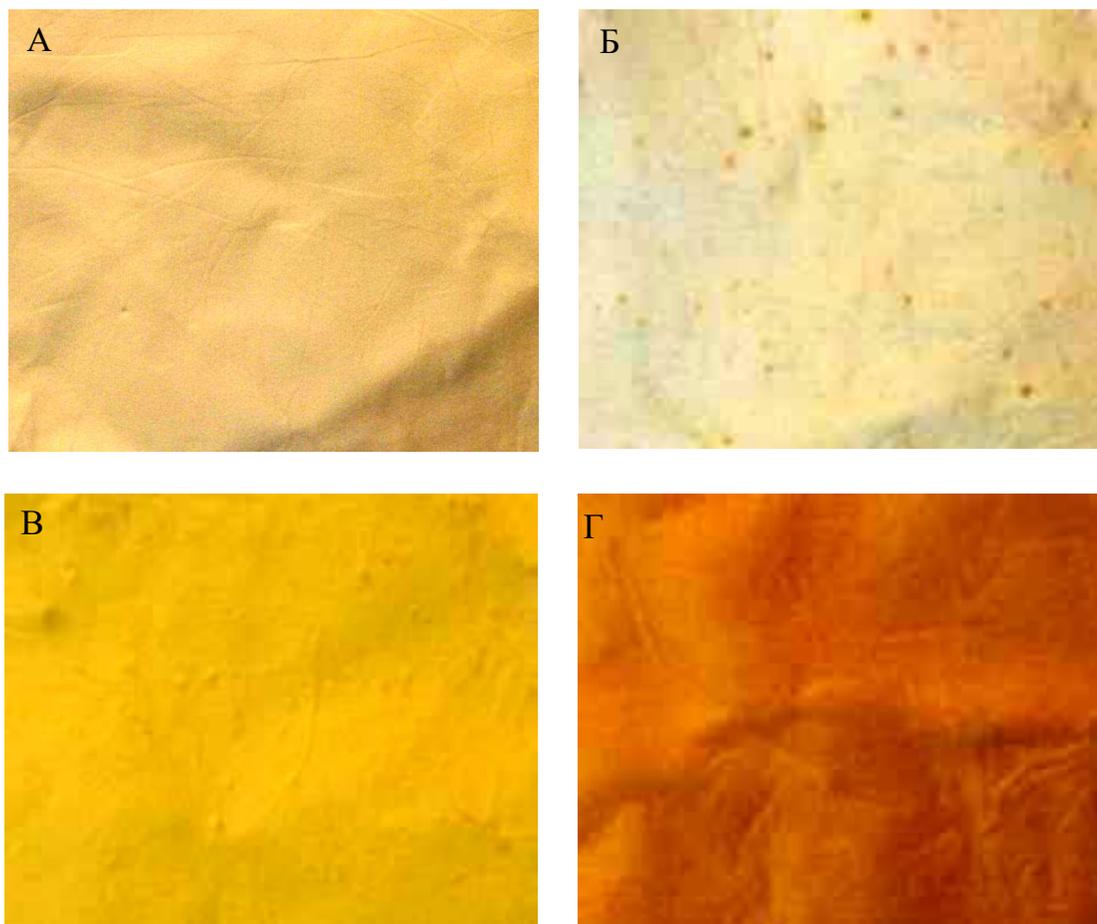
Полученные результаты показали, что наиболее качественные покрытия образуются при указанных условия электроформования с использованием в качестве рабочего раствора 20 % пуллулана, поскольку 30 % раствор этого полимера обладает большим влагоудержанием, что затрудняет формирование нанонитей.



А. 3D-скаффолды из пуллулана; Б. Композитные 3D-скаффолды пуллулан:  
 $\beta$ -циклодекстрин в соотношении 3:1; В. Композитные 3D-скаффолды  
пуллулан:2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин в соотношении 3:1;  
Рисунок 2 – Фотографии 3D-скаффолдов на основе пуллулана, полученных  
методом электроспиннинга

Анализ высококонтрастных фотографий поверхности полученных 3-D скаффолдов (рисунок 2) показал, что добавление к раствору пуллулана бета-циклодекстрина приводит к формированию гетерогенных структур с ярко выраженными включениями крупных кристаллов циклических олигосахаридов (рисунок 2 Б), в то время как при электроформовании нативного раствора пуллулана образуется однородная структура без видимых гетерогенных образований (рисунок 2 А). Добавление к раствору пуллулана

2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина также приводит к формированию однородной структуры композитного скаффолда (рисунок 2 В).



А. 3D-скаффолды из пуллулана; Б. Композитные 3D-скаффолды пуллулан:куркумин 3:1; В. Композитные 3D-скаффолды пуллулан:комплекс  $\beta$ -циклодекстрин/куркумин в соотношении 3:1 ; Г. Композитные 3D-скаффолды пуллулан:комплекс 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин/куркумин в соотношении 3:1;

Рисунок 3 – Фотографии композитных 3D-скаффолдов на основе пуллулана и комплексов куркумина, полученных методом электроспиннинга

При получении нановолокон из смеси 20% пуллулан:препарат куркуминоидов 3:1 происходит образование покрытий с неравномерными вкраплениями крупных частиц куркумина. Такой эффект обусловлен высокой гидрофобностью куркумина и образованием суспензии препарата в растворе пуллулана. При электроформовании такого гетерогенного раствора образуется неоднородная структура скаффолдов (рисунок 3 Б). При электроформовании раствора пуллулана с добавлением комплексов включения бета-циклодекстрин:куркумин, наблюдается более однородная поверхность формирующихся 3-D скаффолдов, что объясняется включением в структуру нановолокон пуллулана кристаллов комплексов включения,

обладающих иной пространственной геометрией и более мелкими размерами, по сравнению с диспергированным куркумином (рисунок 3В).

При электроформовании раствора пуллулана с добавлением комплексов включения 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин:куркумин, наблюдается гомогенное распределение комплекса в растворе пуллулана и формируется однородная поверхность 3-D скаффолдов (рисунок 3Г). При использовании такой формы куркумина образуется упорядоченная структура нанонитей с включениями мелкодисперсных кристаллов комплексов включения.

Таким образом, была разработана технология создания композитных нановолокнистых материалов с включением комплексов гидрофобных органических соединений с циклодекстринами в структуру нановолокон. Присутствие в системе циклодекстринов приводит к образованию гомогенных рабочих растворов и, в процессе электроспиннинга, формируется однородная структура нанонитей. Полученные таким образом скаффолды обладают свойствами равномерного контролируемого высвобождения включенного биологически активного вещества. Основой нановолокна и формирующегося на его основе скаффолда является биodeградируемый материал, обладающий свойствами биосовместимости. Включение в структуру таких композитных нановолокнистых скаффолдов наноструктур куркуминоидов делает возможным их применение в биомедицинских целях в качестве ранозаживляющего покрытия при терапии травматических повреждений, ожогов, обморожений и пр.

### **Список литературы:**

1. Huang, Z.-M. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites /Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M.Kotaki, S. Ramakrishna// Composites Science and Technology. – 2003. –Vol. 63. – P. 2223–2253.
2. Zhang, C.-L. Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects /C.-L. Zhang , S.-H. Yu// The Royal Society of Chemistry. – 2014. – Vol. 43, №13. – P. 4423–4448.
3. Капустин, М.А. Взаимодействие куркуминоидов с нативным и модифицированным бета-циклодекстрином в водном растворе/М.А. Капустин, А.С. Чубарова//Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сб. статей Междунар. науч. конф., г. Минск, 28–30 июня 2016 г. – Минск: Изд. центр БГУ, 2016.– Ч. 1. – С. 95–98.
4. Капустин, М.А. Методы получения нанокомплексов биологически активных веществ с циклическими олигосахаридами, анализ их физико-химических свойств и использование в пищевом производстве/М.А. Капустин, А.С. Чубарова, Т.Н. Головач, В.Г. Цыганков, В.П. Курченко// Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т. 11, ч. 1. – С. 73–100.

5. Капустин, М.А. Получение и свойства наноструктур куркуминоидов с нативными и модифицированными циклическими олигосахаридами/ М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.П. Курченко, В.Г. Цыганков // Инновации в пищевой технологии, биотехнологии, и химии: сб. статей Междунар. науч.практ. конф., г. Саратов, 13–15 июня 2017 г. – Саратов: Изд. Центр «Наука», 2017. – С. 240–246.
6. Капустин, М.А. Выделение куркуминоидов из коневещица *Curcuma longa* L и исследование состава полученного препарата с использованием хроматографических методов анализа / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.Г. Цыганков, В.П. Курченко// Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т. 11, ч. 2. – С. 248–262.
7. Северюхина, А.Н. Композитные нетканые материалы с включением микрочастиц для нужд регенеративной медицины/ А. Н. Северюхина, Ю. И. Свенская, Д. А. Горин // Известия Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. –2013. –Т. 13, № 2. – С. 69–79.

#### СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ

Кравченко Л.М., Кудин К.В., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, г. Минск,

lidia\_kravchenko@tut.by

*Данное исследование посвящено разработке генетических конструкций, которые могут стать основой для создания ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2. В результате проведенной работы на основе коммерческого плазмидного вектора pVAX1 (Invitrogen) получены две генетические конструкции, одна из которых содержит полноразмерную природную открытую рамку трансляции капсидного белка цирковируса свиней типа 2 (ЦВС-2), а вторая – укороченную без 112 первых нуклеотидов.*

Одной из важнейших отраслей животноводства Беларуси является свиноводство. На сегодняшний день наблюдается рост поголовья и количества свиноводческих комплексов. Для максимально эффективного и прибыльного свиноводства необходим строгий контроль состояния здоровья животных. Наиболее распространенным агентом, вызывающим заболевания вирусной этиологии среди свиней, является цирковирус свиней типа 2 (ЦВС-2). Данный патоген – это икосаэдрический безоболочечный вирус диаметром 17-22 нм из семейства *Circoviridae* рода *Circovirus*. Геном ЦВС-2 представлен кольцевой ДНК размером 1800 пар нуклеотидов, что соответствует минимальному размеру полноценного вирусного генома. В нем выявлены три открытые рамки трансляции (ОРТ): ОРТ1, ОРТ2, ОРТ3, которые кодируют белок капсида, Рер-белок и белок, вызывающий апоптоз клеток, соответственно. Белок капсида цирковируса состоит из 233 аминокислот,

первые тридцать аминокислот N-концевого домена содержат сигнал ядерной локализации [3, 4]. Инфицирование животных цирковирусом свиней типа 2 наносит огромный экономический ущерб свиноводческим хозяйствам по всему миру. Размножение цирковируса в организме животного приводит к развитию ряда патологических состояний, которые обобщенно называют цирковирус-ассоциированные заболевания. В вышеуказанную группу болезней свиней входят синдром послеотъемного мультисистемного истощения поросят (СПМИ), дерматит и нефропатия, заболевания пищеварительной, репродуктивной системы, респираторный синдром и некоторые другие [1].

Вакцинация является одной из основных превентивных мер защиты от массового заражения поголовья ЦВС-2. Иммунизация свиней осуществляется инактивированными либо субъединичными вирус-вакцинами, степень эффективности которых сильно варьирует. Даже после введения таких вакцин у животных могут развиваться цирковирус-ассоциированные болезни. В связи с этим большие надежды на увеличение эффективности профилактики таких заболеваний связывают с разработкой новых препаратов, в частности ДНК-вакцин. Такие вакцины содержат плазмидную либо вирусную ДНК со встроенным в нее геном возбудителя инфекционного заболевания, который экспрессируется в эукариотических клетках. При введении ДНК-вакцины в организм, в клетках синтезируется белок патогена, который выступает в качестве антигена, стимулирующего развитие клеточного и гуморального иммунного ответа, активирующего систему интерферонов [2].

Представленная работа посвящена созданию генетических конструкций для ДНК-вакцины против цирковируса свиней типа 2. На основе плазмидного вектора pVAX1(Invitrogen) разработан дизайн двух разных генетических конструкций, содержащих полноразмерную природную ОРТ капсидного белка ЦВС-2 и укороченную ОРТ без нуклеотидов, соответствующих тридцати N-концевым аминокислотам. С целью амплификации вирусных ОРТ и присоединения к ним необходимых регуляторных элементов для экспрессии в эукариотической системе клеток составлены нуклеотидные последовательности прямых праймеров: для полноразмерной ОРТ – PCVF-long, для укороченной – PCVF-trunk и одного обратного – PCVrev. Праймеры синтезированы фирмой «Праймтех» (Беларусь), а их последовательности представлены в таблице.

При помощи ПЦР к 5'-концу целевых ОРТ присоединена последовательность Козак, которая окружает стартовый кодон и необходима для инициации трансляции в клетках эукариот, также установлена область, соответствующая сайту рестрикции NheI, а к 3'-концу добавлен терминирующий кодон и сайт рестрикции для фермента XhoI [5].

Таблица – Характеристика праймеров, использованных в исследовании

| Праймер    | Сиквенс 5'→3'   | Размер, нт | Т плавления, °С | GC, % | Ампликон, п.о. | Сайт рестрикции |
|------------|---|------------|-----------------|-------|----------------|-----------------|
| PCVF-long  | АТТАТ <b>Т</b> Г <b>С</b> ТА <b>Г</b> С <b>А</b> ССАТ <b>Г</b> Г<br>С <b>Г</b> А <b>С</b> ГТАТА <b>С</b> АА <b>Г</b> Г <b>А</b> Г                 | 35         | 39              | 40    | 707            | NheI            |
| PCVF-trunk | АТТАТА <b>Г</b> С <b>Т</b> А <b>Г</b> А <b>А</b> С <b>А</b> Т <b>Г</b> Г <b>Г</b><br>Г <b>А</b> Г <b>А</b> А <b>Г</b> Г <b>А</b> ААААТ <b>Г</b> Г | 35         | 41              | 34    | 597            | NheI            |
| PCVrev     | АТТТ <b>Т</b> Г <b>С</b> Т <b>С</b> Г <b>А</b> Г <b>Т</b> Т <b>А</b> А <b>Г</b> Г <b>Г</b><br>АТ <b>А</b> А <b>Г</b> Т <b>Г</b> Г                 | 27         | 55              | 41    | -              | XhoI            |

Примечание. Жирным шрифтом выделены последовательности сайтов рестрикции; подчеркиванием выделена последовательность Козак.

Полученные после амплификации последовательности и вектор pVAX1 подвергали рестрикции ферментами *NheI* и *XhoI*. Затем в pVAX1 по отдельности клонировали полноразмерную и укороченную ОПТ капсидного белка цирковируса свиней. После чего полученными плазмидами с двумя вариантами вирусной ОПТ трансфецировали клетки *E.coli* XL-1 Blue. С помощью ПЦР-анализа с праймерами PCVF-long, PCVF-trunk PCVrev отбирали положительные клоны трансформантов. На электрофореграмме образцов после ПЦР идентифицированы фрагменты ДНК размером около 700 и 600 пар оснований, что соответствует размерам области генома, кодирующей полноразмерную и укороченную ОПТ капсидного белка ЦВС-2 (рисунок).

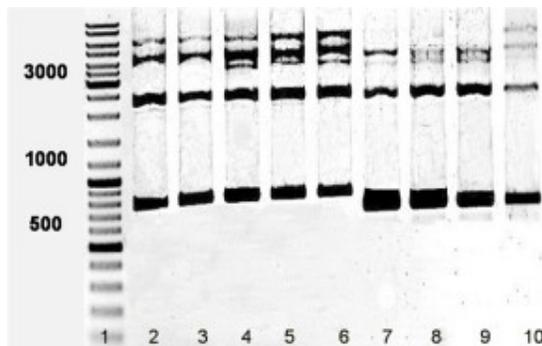


Рисунок – Электрофореграмма ДНК после ПЦР-анализа образцов, трансформированных клеток

1 – маркеры молекулярного веса GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 2-6 – полноразмерные ОПТ капсидного белка ЦВС-2; 7-10 – укороченные ОПТ капсидного белка ЦВС-2.

Дополнительно соответствие вставок ожидаемым последовательностям проверяли методом рестрикционного анализа плазмид, выделенных из положительных клонов трансформантов *E.coli* XL-1 Blue. Данный анализ также подтвердил наличие целевых ОПТ в векторе pVAX1.

Таким образом, итогом проведенной работы является получение следующих генетических конструкций: pVAX1 с ОПТ, соответствующей

природному полноразмерному белку капсида ЦВС-2, и рVAX1 с укороченной ОРТ капсидного белка без первых 112 нуклеотидов.

#### **Список литературы:**

1. Донник, И.М. Клинические признаки заболеваний, ассоциированных с цирковирусной инфекцией свиней и сопутствующие инфекции / И.М. Донник [и др.] // Аграрный вестник Урала. – 2013. – № 3. – С. 20–23.
2. Петров, Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – С. 527–531.
3. Пиневиц, А.В. Вирусология: учебник / А.В. Пиневиц [и др.] – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2012. – С. 335–337
4. Meng, X.-J. Circoviridae / X.-J. Meng // Fields Virology / X.-J. Meng, D.M. Knipe, P.M. Howley. – USA: LWW, 2013. – Chap. 58. – P. 1792–1801.
5. Pereira, V.B. DNA vaccines approach: from concepts to applications / V.B. Pereira [et al.] // World Journal of Vaccines. – 2014. – Vol. 4. – P. 50-71.

#### **СОЗДАНИЕ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО НАПИТКА НА ОСНОВЕ ПЕРМЕАТА ОБЕЗЖИРЕННОГО МОЛОКА**

Крохмаль М.В., Евдокимов И.А.

Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь,  
mvkrohmal@yandex.ru

*В статье представлены результаты исследования изменений углеводного состава ультрафильтрационного (УФ) пермеата обезжиренного молока в ходе технологических этапов производства ферментированного напитка, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.*

УФ пермеат обезжиренного молока относится к новым видам вторичного молочного сырья, получаемого при обработке обезжиренного молока на установке ультрафильтрации. Одновременно пермеат представляет собой серьезный источник загрязнения, если его сбрасывать в окружающую среду, так как его биологическая потребность в кислороде, в зависимости от его состава, колеблется в диапазоне от 30000 - 450000 г/л [6]. По данным зарубежных исследователей УФ пермеат обезжиренного молока является источником таких минеральных веществ, как кальций, калий, натрий, магний и фосфор, поэтому напитки на его основе прекрасно подходят для восстановления солевого баланса организма в процессе и после физических нагрузок различной интенсивности [7]. В тоже время он содержит значительное количество лактозы, поэтому люди с лактазной недостаточностью [5] ограничены в употреблении подобных напитков. Обзор литературы не выявил технологий переработки УФ пермеата с использованием какой-либо заквасочной микрофлоры с целью снижения

уровня лактозы в готовом продукте. В тоже время существует технология напитка «Бриз» на основе молочной сыворотки, сквашиваемой культурой кефирных грибков [3]. В силу схожести компонентного состава УФ пермеата обезжиренного молока и осветленной молочной сыворотки разработка напитка с использованием симбиотической закваски кефирных грибков представляет научный интерес и является актуальной.

Цель работы - разработать технологию ферментированного напитка на основе УФ пермеата и определить влияние закваски на изменение углеводного состава в ходе технологической обработки.

В качестве объекта исследования был взят УФ пермеат, полученный при обработке обезжиренного молока на установке ультраfiltrации.

Исследования по изучению динамики изменения и эффективности снижения количества лактозы в процессе сквашивания и созревания освежающего напитка на основе УФ пермеата проводились методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Во-первых, метод ВЭЖХ подходит для определения углеводного состава [1] вторичного молочного сырья и продуктов на его основе. А во-вторых, в связи с тем, что в молочных продуктах сложный углеводный состав, именно метод ВЭЖХ позволяет идентифицировать не только содержащиеся углеводы, но и продукты их гидролиза [1].

Основными компонентами УФ пермеата обезжиренного молока являются лактоза и минеральные вещества (таблица 1).

Таблица 1 – Состав натурального УФ пермеата обезжиренного молока

| Наименование показателя      | Значение |
|------------------------------|----------|
| Сухие вещества, %            | 5,02±0,8 |
| Жир, %                       | -        |
| Общий белок, %, в т.ч.       | 0,13±0,1 |
| - белок, %                   | -        |
| - небелковый азот, %         | 0,13±0,1 |
| Лактоза, %                   | 4,24±0,7 |
| Минеральные вещества, %      | 0,65±0,1 |
| Плотность, кг/м <sup>3</sup> | 1020±0,5 |
| рН                           | 6,70±0,1 |
| Кислотность, °Т              | 8±1      |

Как видно из таблицы 1, УФ пермеат содержит значительное количество лактозы. По нашему мнению, использование симбиотической культуры кефирных грибков позволит снизить количество лактозы за счет развития заквасочной микрофлоры не только на этапе сквашивания, но и на этапе созревания напитка.

Микрофлора кефирных грибков представлена гомо- и гетероферментативными лактококками, термофильными и мезофильными лактобациллами, дрожжами и уксуснокислыми бактериями. Сбалансированность роста дрожжей, молочнокислых и уксуснокислых бактерий обусловлена симбиотическим характером взаимоотношений этих

групп микроорганизмов. Для развития каждой группы микроорганизмов необходимые определенные условия: температура, кислотность, степень аэрации и т.д. [4].

В ходе исследований были определены оптимальные физико-химические параметры для выработки сквашенного освежающего напитка на основе УФ пермеата обезжиренного молока [2]. Биологическая обработка пастеризованного сырья проводилась закваской кефирных грибов при температуре 26-28°C в течение 6-8 ч до нарастания кислотности 19-21°Т. Созревание осуществлялось в герметичных условиях при температуре 4-6°C в течение 8-10 часов. Полученный напиток обладает приятным кисломолочным вкусом, с характерным острым привкусом, который обусловлен использованием в качестве закваски кефирных грибов. Цвет желтый или зеленовато-желтый, прозрачный. Аромат кисломолочный, с нотами остроты, характерными для кефира. Консистенция жидкая с пузырьками газа [2]. Характеристика углеводного состава исходного УФ пермеата обезжиренного молока, а также после процесса сквашивания и созревания приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Углеводный состав натурального УФ пермеата обезжиренного молока: исходного, после сквашивания и после созревания

| <b>УФ пермеат обезжиренного молока</b> | <b>Количество лактозы, г/л</b> | <b>Лактоза, г/100 г</b> |
|--|--------------------------------|-------------------------|
| Исходный                               | 56,0742                        | 5,6                     |
| Сквашенный                             | 51,0366                        | 5,1                     |
| Созревший                              | 37,1476                        | 3,7                     |

Данные таблицы наглядно свидетельствуют о снижении лактозы в УФ пермеате обезжиренного молока в результате ферментативного гидролиза. Это происходит за счет развития на различных этапах технологической обработки микроорганизмов симбиотической закваски и поглощения ими лактозы в качестве питательного субстрата. В ходе процесса сквашивания количество лактозы снижается на 9%. По окончании этапа созревания содержание лактозы уменьшается еще на 27%. Таким образом, в готовом продукте содержится на 34% меньше лактозы, чем в исходном УФ пермеате.

В результате проведенных исследований было установлено, что в процессе ферментативной обработки УФ пермеата обезжиренного молока симбиотической закваской кефирных грибов происходит снижение количества лактозы на 34% за счет развития микрофлоры. При этом ферментированный напиток на основе УФ пермеата обезжиренного молока может быть включен в рацион при пороговой дозе переносимости лактозы 4 г/100г. Полученный ферментированный напиток можно употреблять как освежающий в жаркое время года, в качестве альтернативы сыворотке окрошечной для приготовления окрошки или других подобных холодных блюд [2].

### Список литературы:

1. Жижин, Н.А. Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖЭХ) для оценки – составных частей молока и молочных продуктов / Н.А.Жижин, Е.А.Юрова // В сборнике: Пища. Экология. Качество Труды XIII международной научно-практической конференции. отв. за вып.: О.К. Мотовилов, Н.И. Пыжикова и др.–2016. – С. 399-404;
2. Крохмаль, М.В. Аспекты переработки молочного УФ пермеата / М.В. Крохмаль, И.А. Евдокимов // Научный вклад молодых ученых в развитие пищевой и перерабатывающей промышленности АПК. Сборник научных трудов VII конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских институтов Отделения хранения и переработки сельскохозяйственной продукции Россельхозакадемии. – М.: ВНИМИ. – 2013. – С. 204-207
3. Патент РФ 2051590. Способ приготовления напитка из творожной сыворотки / А.Г.Храмцов, Г.А.Холодов, А.Н.Пономарев, И.И.Рой, заявл. 22.04.1992, - опубл. 10.01.1996.
4. Шульга, Н. М. Кефир: современный взгляд на микрофлору и технологию / Н. М. Шульга // Продукты и ингредиенты. – 2011. - № 3 (78). - С. 52-54.
5. Электронный ресурс <https://www.sitemedical.ru/content/лактазная-недостаточность>;
6. Dragana, D. Ilić Udovičić Permeate components valorisation for beverage manufacturing [Текст] / Dragana D. Ilić Udovičić<sup>1</sup>, Spasenija D. Milanović, Mirela D. Ilić // Agro FOOD Industry Hi Tech - vol 24(5) - September/October 2013. — С. 24-27. [Электронный ресурс] / Teknosciencze.com – Режим доступа: [http://www.teknosciencze.com/getpdf.php?filename=Contents/Riviste/PDF/AF5\\_RGB\\_2013.pdf&beginpage=26&endpage=29&filetitle=Permeate%20components%20valorisation%20for%20beverage%20manufacturing%20%E2%80%93%20Permeate%20based%20beverage%20production%20with%20or%20without%20lactose%20hydrolysis](http://www.teknosciencze.com/getpdf.php?filename=Contents/Riviste/PDF/AF5_RGB_2013.pdf&beginpage=26&endpage=29&filetitle=Permeate%20components%20valorisation%20for%20beverage%20manufacturing%20%E2%80%93%20Permeate%20based%20beverage%20production%20with%20or%20without%20lactose%20hydrolysis)
7. Hattem, H.E Utilization of milk permeate in the manufacture of sports drinks / Hattem H.E , Elham H. Abouel-Einin<sup>1</sup> and Mehanna N. M. // Journal of Brewing and Distilling Vol. 2(2) pp. 23-27, April 2011 [Электронный ресурс] / [www.academicjournals.org](http://www.academicjournals.org) – Режим доступа: <http://www.academicjournals.org/JBD> ISSN 2141-2197 ©2011 Academic Journals

## ОТДЕЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ВЫБОРУ НУТРИЕНТОВ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ ПРОДУКТОВ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ

Кузнецов В.В.<sup>1</sup>, Димитриева С.Е.<sup>2</sup>, Лукин Д.Е.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт детского питания – филиал  
Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и  
безопасности пищи, г. Истра, niidp@rambler.ru.

<sup>2</sup> Московский государственный университет технологий и управления имени  
К.Г. Разумовского, г. Москва

<sup>3</sup> Компания «Инновационные биохимические технологии», г. Москва

*В статье рассматриваются вопросы причин и последствий недостатка йода для развития организма ребенка, обогащения продуктов детского питания органическими формами йода и сравнительные характеристики различных используемых препаратов йода.*

Традиционно продукты детского питания обогащаются витаминами, минеральными веществами (кальций, фосфор и др.), эссенциальными нутриентами (незаменимые аминокислоты) и др. ингредиентами с учетом потребности детерминированных возрастных групп детей, определяемой, в основном, в соответствии с Нормами физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации (Методические рекомендации МР 2.3.1.2432-08).

Выбор функционального обогатителя должен основываться на региональных негативных факторах окружающей среды, их распространенности и концентрации, а также значимости отрицательного воздействия на организм ребенка [1]. К таким обогатителям относится, в частности, йод. Биологическая роль йода связана с его участием в синтезе гормона щитовидной железы – тироксина.

Дефицит йода в организме приводит к широкому спектру заболеваний, тяжесть которых зависит от степени и продолжительности йодной недостаточности и от возраста, в котором организм недополучает йод. Йододефицитные заболевания (ЙДЗ) – различные патологические процессы, поражающие большие группы населения и возникающие там, где в окружающей среде содержится недостаточное количество йода [2]. Решение проблемы дефицита йода и связанных с ним йододефицитных состояний является актуальной медико-социальной задачей во всем мире [3].

Физиологической считается суточная доза йода до 1000 мкг (1 мг). В большинстве случаев она не вызывает развитие патологии щитовидной железы у здорового человека. Более высокие дозы йода называются фармакологическими. Как правило такое количество йода человек может получить только принимая лекарственные препараты, которые содержат йод в больших дозировках (амиодарон, некоторые отхаркивающие средства, раствор Люголя и т.д.). Следует иметь в виду, что независимо от методов

восполнения йода, он наиболее оптимально усваивается при достаточном содержании в рационе белка, железа, цинка, меди, витаминов А и Е.

Среди разнообразия свойств, проявляемых соединениями йода, важное место занимает его биологическая активность. Кроме того, при использовании йода возникает ряд проблем связанных с алергизирующим действием, токсичностью, плохой всасываемостью и малой растворимостью в воде ряда соединений, особенно неорганического происхождения, например, йодистого калия [4, 5].

Исторически широкое распространение получили йодофоры – препараты, содержащие в качестве носителя высокомолекулярное соединение (ВМС) или поверхностно-активное вещество (ПАВ), а в качестве основного действующего компонента – молекулярный йод. Высокомолекулярный носитель замедляет выделение молекулярного «неорганического» йода и йодида из препарата и увеличивает время его взаимодействия с тканями организма, одновременно уменьшая раздражающее действие. В медицинской практике с успехом используются препараты пролонгированного действия - комплексы молекулярного йода с поливиниловым спиртом («Йодиол»), с поливинилпирролидоном и йодидом калия («Йодопирон»), с неионогенным ПАВ («Йодонат»). Йодофоры, однако, не способны, ввиду своего фармакологического действия, активно участвовать в гормональной регуляции йодного обмена. В настоящее время наибольшее распространение среди йодсодержащих продуктов и добавок получили йодированная соль, ламинария (сух.), йодказеин, йододар и некоторые другие (таблица 1).

«Йодказеин» получают с помощью одного из известных способов химического йодирования белков, а именно при помощи йодистого хлора. «Йодказеин» не может быть очищен от примесей несвязанного йодида, свободного (молекулярного) йода и побочных продуктов свободнорадикальных реакций по причине того, что порошок казеина (сырье для его получения) в воде не растворяется. Раствор казеина является не истинным белковым раствором, а мелкодисперсной взвесью микрочастиц казеиновых мицелл (агрегатов казеиновых белков), которые набухают в жидкостях и равномерно распределяются в объеме без растворения. В процессе набухания химические реагенты, участвующие в реакции йодирования поступают внутрь мицелл, что делает невозможным полную отмычку данного продукта от них с помощью указанных в технологии приемов, а именно: обычного фильтрования с последующим центрифугированием и отмывкой пастообразного осажденного «Йодказеина». Помимо свободного йода внутри мицелл задерживаются и все побочные продукты реакции.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика йодосодержащих компонентов [5]

| Показатели   | Продукты                              |                                       |   |                                     |                      |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------------|----------------------|
|  | Йодированная соль                     | Ламинария (сух.)                      | Йодказеин                                 | Йод - Дар                           | Биойод               |
| Содержание йода в продукте                                   | 15...40 мг/кг                         | 1...3 г/кг                            | 80...100 г/кг                             | 50...70 г/кг                        | 25... 30 г/кг        |
| Изменение содержания йода при хранении                       | снижается на 50 % в течение 6 месяцев | снижается на 10 % в течение 6 месяцев | снижается на 10...15% в течение 6 месяцев | снижается на 5% в течение 6 месяцев | не изменяется        |
| Изменение содержания йода при воздействии высоких температур | снижается на 50...100%                | снижается на 30...50 %                | снижается на 20...30 %                    | снижается на 10...15 %              | снижается на 2...3 % |
| Растворимость в воде   | хорошая                               | плохая                                | плохая                                    | частичная                           | хорошая              |
| Влияние на органолептические свойства пищи                   | появляется запах и вкус йода          | специфический привкус водорослей      | возможен запах и вкус йода                | не имеет                            | не имеет             |
| Наличие несвязанного йода:                                   |                                       |                                       |   |                                     |                      |
| - йодида   | 95...99%                              | 92...97%                              | 35...40%                                  | 15...20%                            | 2...3%               |
| - молекулярного  | 1...5%                                | 2...7%                                | 10...15%                                  | менее 1%                            | нет                  |
| Возможность передозировки                                    | высокая                               | возможна                              | возможна                                  | возможна                            | невозможна           |
| Наличие побочных эффектов                                    | имеются                               | имеются                               | имеются                                   | возможны                            | не имеются           |

В описании изобретения (ООО «НПП «Медбиофарм») указано, что препарат «Йодказеин» полностью растворяется в воде, квасе, пиве, молоке, кефире и т.д. На практике для растворения «Йодказеина» используют 1...2% щелочные растворы с рН выше 9.

В отличие от йодказеина «биойод» – препарат на основе сывороточных белков молока, имеющих более высокую биологическую ценность по сравнению с казеином. Благодаря ковалентной связи йода с белками, «Биойод» обладает высокой стабильностью в тепловых процессах, устойчивостью к свету и нагреванию при длительном хранении, что исключает возможность отрицательного воздействия свободного йода на физико-химические показатели и органолептические характеристики готовой продукции. Свойства «Биойода» позволяют широко применять его для обогащения любых продуктов питания [6].

Технология получения «Биойода» представляет собой биотехнологический процесс йодирования молочных белков с помощью лактатпероксидазы, что обеспечивает:

- сохранение нативных свойств получаемых йодированных белков;

- отсутствие несвязанного неорганического йода, а также потенциально токсичных веществ и реагентов в конечном продукте.

Масштабные клинко-нутрициологические исследования, проведенные в 2009 г. ООО «Иннбиотех» совместно со специалистами ГУ «Научный центр здоровья детей РАМН» и НИИ гигиены и охраны здоровья детей и подростков, показали положительное влияние применения «Биойода» в продуктах питания на физическое и умственное здоровье школьников.

Апробация «Биойода» не выявила побочных эффектов, что позволяет применять его в высоких дозах при тяжелых формах дефицита йода. Выявлена высокая биологическая доступность йода (легко усвояемая биорегулируемая органическая форма I+) и выраженный профилактический эффект. Подтверждена высокая технологичность, обеспечивающая простоту введения йодированных белков в лекарственные средства, БАД к пище и пищевые продукты, на любом этапе технологического цикла их производства с полным сохранением основных физико-химических свойств.

Для определения йода в готовом продукте создана методика определения органического йода, сертифицированная в установленном порядке, что сделало возможным отказаться от контроля его дозирования по закладке.

Указанные преимущества оценили в республике Адыгея, где была принята программа йодирования хлебо-булочных изделий с использованием препарата «Биойод». Исследования, проведенные НИИ детского питания и ВНИИМП им. В.М. Горбатова, совместно с ООО «Иннбиотех», позволили подтвердить высокую эффективность и термостабильность препарата, а также безвредность его применения для профилактики йоддефицита и нормализации обмена йода у детей и взрослых. Была разработана серия продуктов детского питания на молочной и мясной основе. В частности, в НИИДП в разработана гамма кисломолочных продуктов для дошкольного и школьного питания под маркой «Истринские», обогащенные «биойодом»:

1. Продукт кисломолочный «Истринский детский» для дошкольного и школьного питания – ТУ 9222-105-00419006-12;

2. Бифидокефир «Истринский детский» для дошкольного и школьного питания – ТУ 9222-107-00419006-12;

3. Ряженка «Истринская детская» для дошкольного и школьного питания - ТУ 9222-108-00419006-12;

4. Ацидофилин «Истринский детский» для дошкольного и школьного питания – ТУ 9222-109-00419006-12;

5. Простокваша «Истринская детская» для дошкольного и школьного питания – ТУ 9222-110-00419006-12;

6. Варенец «Истринский детский» для дошкольного и школьного питания – ТУ 9222-111-00419006-12.

Разработаны хлебобулочные изделия «детские» [ТУ 9110-115-00419006-13], вырабатываемые из пшеничной и ржаной муки и их смесей,

обогащенные, наряду с другими функциональными компонентами, «биойодом»: хлеб детский «Школьник» белый; хлеб детский «Школьник» черный; хлеб детский «Дошколята» белый; хлеб детский «Дошколята» черный; булочки детские «Школьные»; булочки детские «Школьные» с изюмом.

Таким образом, по мнению авторов, ликвидировать дефицит йода возможно только путем внедрения принципиально новых способов профилактики с использованием органических йодсодержащих соединений и, в частности, йодированных пищевых белков «Биойод», имеющих неоспоримые преимущества.

Включение в рацион обогащенных йодированными белками «Биойод» продуктов питания, позволяет охватить профилактическими мероприятиями большинство регионов России.

### **Список литературы:**

1. Тутельян, В.А. Стратегия разработки, применения и оценки эффективности биологически активных добавок к пище / В.А. Тутельян // Вопросы питания. – 1996 – № 6. – С. 3-11
2. Балаболкин М. И. Эндокринология. / М.И. Балаболкин. – Москва: Универсум паблишинг, 1998. – 416 с.
3. Намазова Л.С. Профилактика йоддефицитных заболеваний [Электронный ресурс]: /Л.С. Намазова, И.В. Широкова – Электронные данные. – 2010 – <https://medi.ru/info/12493>
4. Красильникова, А.А. Исследование гибридного кластерного комплекса рения в качестве агента для рентгеноконтрастного усиления в лучевой диагностике [Электронный ресурс]: / А.А. Красильникова, М.А. Шестопалов, К.А. Брылев, И.А. Кирилова, Л.В. Шестопалова – Электронные данные. – Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia): тезисы докладов. – Москва, 2013 – С. 223. – <http://www.ipac.ac.ru/docs/MedChemRussia2013.pdf>
5. ЗАО «Исследовательский Институт Химического Разнообразия», Негосударственный научный центр ЦВТ «ХимРар». Проведение качественных и количественных анализов образцов йодированных белков «Биойод» производства ООО «Техновита» и «Йодказеин» производства ООО «Медбиофарм»: Отчет о научно-исследовательской работе. – Москва, 2011.
6. ГНУ ВНИИЖ Россельхозакадемии. Провести исследования по определению возможности использования пищевой добавки «Биойод» в производстве растительно-жировых спредов и майонеза : Отчет о выполнении работ по теме. – Москва, 2011.

ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ И НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ  
КОМПЛЕКСНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ПРОЕКТА ПО ПОЛУЧЕНИЮ  
И ПРИМЕНЕНИЮ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННОЙ ЛАКТОЗЫ –  
ПРИРОДНОГО ПРЕБИОТИКА ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Левитская А.А.<sup>1</sup>, Анисимов С.В.<sup>2</sup>, Храмцов А.Г.<sup>1</sup>,  
Евдокимов И.А.<sup>1</sup>, Анисимов Г.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь,  
akhramtcov@ncfu.ru

<sup>2</sup> Молочный комбинат «Ставропольский», г. Ставрополь

*В статье, на уровне межгосударственных чтений, кратко приведена информация о начале реализации в Российской Федерации комплексного проекта по организации отечественного высокотехнологичного производства пищевой и фармакопейной лактозы (молочного сахара). Проект реализуется по инициативе и на базе молочного комбината «Ставропольский» на основе научных разработок ведущей научной школы федерального уровня при Северо-Кавказском федеральном университете в рамках Стратегического Партнерства и Национальной Технологической Инициативы.*

В соответствии с «Доктриной продовольственной безопасности Российской Федерации» (Указ Президента РФ №120 от 30.01.2010 г.) по конкурсному гранту Минобрнауки РФ на Ставрополье начата реализация комплексного федерального проекта «Создание высокотехнологичного производства лактозы для фармацевтической и пищевой отраслей промышленности» (далее проект).

Инициатор проекта, софинансирование (50%) и практическая реализация (внедрение) – Акционерное Общество «Молочный комбинат «Ставропольский» (МКС) – крупнейшее предприятие молочной отрасли на юге России с 90-летней историей и численностью работающих более 1000 человек. Комбинат имеет возможность перерабатывать до 500 тонн молока-сырья в сутки, которое поставляется транспортом предприятия от лучших хозяйств Ставропольского края и частного сектора. Предприятие производит более 500 наименований молочной (более 300), хлебобулочной и кондитерской продукции. Она вырабатывается как в соответствии с государственными стандартами (по ГОСТ), так и по собственным технологиям, разработанным высококвалифицированными специалистами (на комбинате работает 22 кандидата наук). Совокупная выручка от продаж в 2016 г. составила более 3,0 млрд. руб. Подробности – на сайте предприятия «[www.mokostav.ru](http://www.mokostav.ru)», где представлены также полезные свойства молочных продуктов с инновационной направленностью функционального назначения. А самое главное – эта продукция на полках 60 фирменных магазинов и других формах торговли для ставропольцев и за пределами края. Она

востребована в условиях реально существующей внутри- и межгосударственной конкуренции. Коллектив в постоянном поиске инноваций и возможностей их успешной реализации [1].

В настоящее время на базе МКС созданы предпосылки для организации централизованного производства лактозы: подготовлена площадка для строительства отдельного легко возводимого здания; выделено помещение для конечных стадий получения лактозы (фармакопея); проанализированы перспективы использования собственной молочной сыворотки; потенциальных поставщиков сухой и концентрированной сыворотки и пермеата на территории Ставропольского края: на сырзаводе в г. Ипатово смонтирована нанофильтрационная установка для сыворотки; в г. Пятигорске намечен сбор сыворотки («Пятигорский молкомбинат» и ООО «Провинция»); в г. Черкесске будет сбор и концентрирование сыворотки («Хладокомбинат»); на молкомбинатах в г. Новоалександровске и г. Буденновске (Ставропольский край) уже смонтированы электродиализные установки. Результат – право от Государства (софинансирование) реализовать комплексный федеральный проект «Лактоза+».

Основной исполнитель научной части проекта – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет» (СКФУ), история которого вбирает в себя 50 лет деятельности Северо-Кавказского государственного технического университета и Пятигорского государственного технологического университета, 85 лет Ставропольского государственного университета и пяти лет жизнеутверждения [2] одного из 10 федеральных университетов, который является в настоящее время фактически лидером научно-образовательного развития Северо-Кавказского федерального округа и локомотивом инновационного обновления экономики. Целенаправленная системная работа по формированию научно-инновационной инфраструктуры СКФУ позволила в течение 2012-2016 гг. создать крупные научные центры и сильные научные коллективы (институты), работающие по ключевым направлениям научно-технического развития региона. В центре исследований по проекту сформированная за 37 лет и формализованная официально ведущая научная школа федерального уровня 7510.2010.4 «Живые Системы» с возможным (и непременно) участием практически востребованных профессионалов и желательно обучающихся (считать официальным приглашением) всех членов коллектива СКФУ и МКС от лингвистов до таможенников (в молочном деле востребованы профессионалы более 50 специальностей). Подробности о научной школе в учебном пособии [3] для новой генерации профессионалов – практически всех специальностей и Программ обучающихся в СКФУ.

Такова научно-техническая предпосылка реализации проекта. Ниже, в кратком виде, приведена технико-экономическая суть проекта. В результате распада Советского Союза производство молочного сахара (лактозы) как

самостоятельного отраслевого продукта на Государственном уровне осталось за пределами России – Беларусь, Украина, Прибалтика. В настоящее время в РФ импортируется около 17,5 тыс. т/год лактозы разной степени чистоты, в основном пищевой и фармакопейной категорий качества. Основными экспортерами лактозы являются страны ЕС и США.

Фармакопейная лактоза высокой степени очистки (более 99,8 % основного вещества) имеет важное значение в фармацевтической промышленности, она является универсальным инертным материалом и включается в состав большинства лекарственных препаратов. Лактозу используют в качестве связующего вещества при таблетировании, капсулировании, производстве сиропобразных и жевательных лекарств. Кристаллическая лактоза обладает хорошей сыпучестью, объемной плотностью и предотвращает сегрегацию смесей. Благодаря своим свойствам лактоза позволяет равномерно распределять активное вещество в порошках и сохранять это распределение в таблетках.

Пищевая лактоза (более 95,7 % основного вещества) также полностью импортируется из-за рубежа и является важным компонентом при создании безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания, в первую очередь, при производстве детского питания и широкой гаммы специализированных пищевых продуктов. Основной целью при использовании лактозы в детских молочных смесях является корректировка баланса между углеводной и белковой составляющими в заменителях грудного молока при создании продуктов на основе коровьего молока.

В связи с полной импортозависимостью отечественные предприятия, использующие лактозу в качестве одного из компонентов в своих продуктах, вынуждены подстраиваться под изменчивые экономические и внешнеполитические факторы: колебание курсов валют, санкции, закупка лактозы через торговых посредников. Это приводит к росту стоимости и снижению конкурентоспособности конечной продукции. Создание собственного высокотехнологичного производства лактозы с применением инновационных разработок позволит:

- укрепить независимость страны в фармацевтической и пищевой отраслях;

- повысить конкурентоспособность предприятий РФ, использующих лактозу в качестве компонента своих продуктов за счет снижения издержек.

В рамках проекта планируется (на первом этапе) создание производства мощностью до 5 т/сут лактозы, что позволит заместить импорт на 10 %. Одна из целей проекта – создание безотходного производства. Основным сырьем для производства лактозы является вторичное молочное сырье (ВМС) или лактозосодержащее сырье – сыворотка и пермеат. Его объемы, получаемые на молочных предприятиях РФ, составляют около 5 млн. тонн в год. При этом перерабатывается только 35-36 % объемов молочной сыворотки. Остальная её часть (около 3 млн. тонн) сливается в канализацию,

что наносит значительный урон окружающей среде и приводит к перегрузкам на водоочистных сооружениях ряда населенных пунктов. По расчетам, на окисление органических соединений, содержащихся в одном литре молочной сыворотки, попавшей в сточные воды, потребляется от 34 до 39,2 кг кислорода. Тем самым, каждая тонна сыворотки, попавшая в сточные воды, загрязняет водоем так же, как 100 м<sup>3</sup> хозяйственно-бытовых стоков. Экологизация молочного производства является составной частью концепции устойчивого развития предприятий, разрабатываемой в последние годы, что соответствует задачам продовольственной программы и целям объявленного в 2017 г. Президентом РФ В.В. Путиным Годом экологии.

В проекте планируется создание максимально гибкого безотходного производства на принципах наилучших доступных технологий – предвестников нового шестого Технологического Уклада, способного переработать все виды лактозосодержащего сырья. Такое производство будет соответствовать одному из приоритетных направлений Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации: Способы хранения и эффективной переработки сельскохозяйственной продукции.

В рамках проекта планируется:

- совершенствование технологии переработки лактозосодержащего сырья, что позволит добиться более высоких показателей эффективности производства лактозы по сравнению с импортными аналогами;
- создание инновационной технологии переработки специфических для РФ видов лактозосодержащего сырья;
- разработать уникальные опытно-конструкторские установки для электро- и баромембранной обработки лактозосодержащего сырья.

В рамках данного проекта рассматривается возможность полного удовлетворения спроса на фармакопейную лактозу регионального рынка и частичного удовлетворения спроса всероссийского рынка. Также рассматривается возможность работы с зарубежными партнерами, нуждающимися в фармакопейной лактозе высокого качества.

При анализе ценовых предложений на продукцию зарубежных производителей эксперты Tebiz Group отмечают, что российские потребители оказались не в лучшем положении, так как средняя цена на зарубежную продукцию в 2011 году увеличилась на 33,7 %. В среднем пищевая лактоза зарубежного производства предлагалась российским компаниям по 2,96 тыс. долл. за тонну. Максимальная стоимость на лактозу зафиксирована при контрактах со Словенией – 6,394 тыс. долл. за тонну продукции. Среди других стран, которые демонстрируют уровень цен, существенно превышающий среднее значение, следует отметить Словакию. Компании этой страны предлагали лактозу по цене 6,74 тыс. долл. за тонну.

Рассматривая текущую ситуацию в сфере производства лактозы на территории Российской Федерации, необходимо отметить, что данная отрасль находится на пути развития. В связи с этим, особое значение должно

отводиться формированию государственной поддержки данного направления, так как лактоза может использоваться как в фармацевтической, так и в пищевой промышленности. Развитие фармацевтической отрасли имеет важное значение для развития социальной сферы.

На территории Ставропольского края лактоза как продукт переработки сухой сыворотки не производится. В свою очередь, МКС уже несколько лет занимается производством молока с лактулозой – изомером лактозы. С момента начала производства данного продукта и по настоящее время конкурентов у АО «МКС» на территории Ставропольского края и Северного Кавказа не имеется. Данный рынок является практически свободным. Функционируют лишь несколько компаний, занимающихся продажей лактозы, приобретаемой в Центральной части России, либо за рубежом.

В проекте планируется производительность цеха фармакопейной и пищевой лактозы около 5 т/сут в восьмичасовую смену. В случае расширения рынка сбыта, а также возможности увеличения объемов переработки лактозосодержащего сырья (за счет приобретения сырья от других предприятий отрасли), в проекте планируется заложить перспективу увеличения объемов выпуска готовой продукции в 2-2,5 раза. Планируется рассмотреть перспективу эффективной переработки побочных продуктов производства лактозы, часть из которых может иметь самостоятельную коммерческую значимость. Одной из перспектив будущего производства может являться создание линейки продуктов на основе производных лактозы, таких как сиропы лактулозы, лактозаты, галактоолигосахариды и др. Однако технология этих продуктов требует отдельной глубокой (самостоятельной) проработки. Определены перспективы сотрудничества МКС и СКФУ после завершения проекта.

Таким образом, с реализацией проекта открываются широкие возможности для проведения дальнейших научных исследований в области переработки молока, организации производства инновационных продуктов и подготовки профессиональных кадров для пищевой отрасли России.

### **Список литературы:**

1. Храмцов, А.Г. Инновационные приоритеты и практика технологической платформы модернизации молочной отрасли АПК России / А. Г. Храмцов. – Воронеж: Изд-во ВГУИТ, 2015. – 262 с.
2. Летопись Северо-Кавказского федерального университета. 2012-2017 гг. / Под общей редакцией А.А. Левитской. – Ставрополь: Изд-во СКФУ. – 2017. – 463с.
3. Храмцов, А.Г. Биомембранные технологии научной школы «Живые системы» СКФУ. Учебное пособие / А. Г. Храмцов, И.А. Евдокимов, С. А. Емельянов [и др.] – Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2014. – 126 с.

\*Работа выполняется при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, договор МОН 03.G25.31.0241

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАПИТКОВ И ДЕСЕРТОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ

Лодыгин А.Д.<sup>1</sup>, Поротова Е.Ю.<sup>2</sup>, Парамонова А.А.<sup>1</sup>, Капуста А.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Северо-Кавказский федеральный университет г. Ставрополь,

<sup>2</sup> Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, г. Симферополь

<sup>3</sup> Кубанский государственный аграрный университет, г. Краснодар  
allodygin@yandex.ru

*Рассмотрены теоретические и практические аспекты использования вторичного молочного сырья в функциональном питании. Представлены результаты исследований ферментативного гидролиза лактозы в творожной сыворотке и обезжиренном молоке. Проанализированы направления совершенствования технологии и расширения ассортимента напитков и десертов функционального назначения на основе вторичного молочного сырья.*

Молочная сыворотка, являясь побочным продуктом при производстве белково-жировых и белковых концентратов, относится к ценному пищевому сырью, из которого возможно получение целой гаммы диетически полноценных молочных продуктов [4, 6]. Пищевая ценность и диетические свойства молочной сыворотки позволяют применять ее непосредственно или после предварительной обработки для приготовления разнообразных ферментированных функциональных молочных напитков и десертов. При этом могут быть использованы все составные части сыворотки, а также представляет интерес повышение пищевой и биологической ценности за счет предварительной биотехнологической обработки и введения фруктово-овощных наполнителей [6, 7].

Одной из наиболее динамично развивающихся ассортиментных групп продуктов из вторичного молочного сырья являются напитки и десерты функционального назначения. К данной группе относятся низколактозные молочные продукты, которые могут обеспечить полноценное питание людям с лактазной недостаточностью [1]. Гидролиз лактозы позволяет придать новые свойства молочному сырью и расширяет возможности для его переработки на продукты питания. Предварительная ферментация лактозы специально подобранными и адаптированными по технологическим параметрам (температура, рН) препаратами β-галактозидазы (лактазы) позволяет обеспечить повышение степени сладости готового продукта примерно в 3 раза, улучшает сбраживаемость лактозы в ЖКТ, дает возможность употреблять продукты людям, страдающим от intolerance к лактозе [1, 2].

В рамках решения задач по разработке технологии линейки ферментированных низколактозных напитков на основе творожной

сыворотки и обезжиренного молока были изучены закономерности гидролиза лактозы. По результатам предварительных исследований для проведения эффективной ферментации лактозы (степень гидролиза не ниже 50 %) были рекомендованы препараты лактазы «Лактоканесцин Г20х» (для творожной сыворотки) и «Na-Lactase» (для обезжиренного молока) [2, 3].

Результаты исследований (рисунки 1, 2) позволили установить параметры технологического процесса, обеспечивающие степень гидролиза лактозы во вторичном молочном сырье не ниже 70 % от исходной концентрации субстрата.

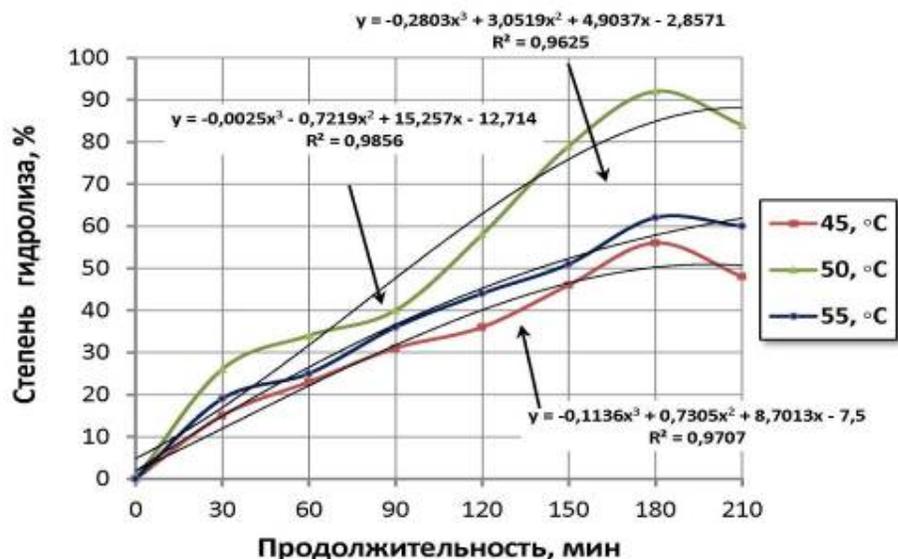


Рисунок 1 – Динамика изменения степени гидролиза лактозы в творожной сыворотке

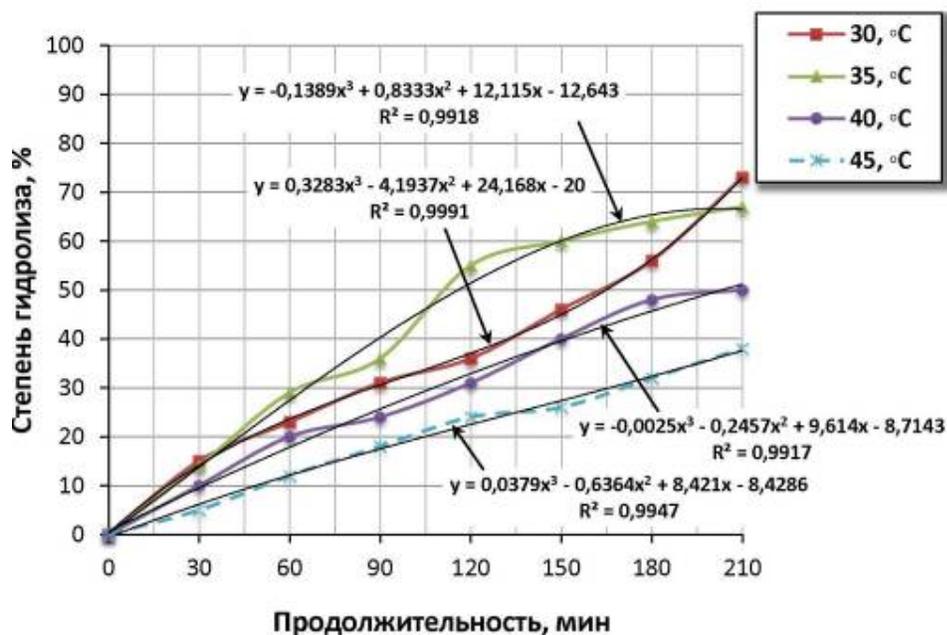


Рисунок 2 – Динамика изменения степени гидролиза лактозы в обезжиренном молоке

Результаты исследований использованы при разработке технологии трех видов низколактозных ферментированных напитков из вторичного молочного сырья с регулируемым содержанием лактозы: из творожной сыворотки – «МиЛа-С», из обезжиренного молока – «МиЛа-О», из творожной сыворотки и обезжиренного молока – «МиЛа-ОС» [3].

Развитие данной технологии представляется перспективным по двум направлениям:

- получение напитков и десертов на основе вторичного молочного сырья с частично гидролизованной лактозой с добавлением полисахаридов растительного происхождения, придающих готовым продуктам дополнительные функциональные, в том числе пребиотические свойства;

- расширение ассортимента разнообразия за счет обогащения низколактозных продуктов на молочной основе биологически активными веществами растительного сырья (введение в рецептуры напитков и десертов фруктовых и овощных соков, сиропов, пюре).

Аналогом молочной сыворотки является сывороточно-полисахаридная фракция (СПФ), получаемая при фракционировании молочного сырья полисахаридами [6]. Сывороточно-полисахаридная фракция, представляет собой однородную жидкость и имеет чистый молочный вкус с лёгким привкусом используемого полисахарида. Во фракцию практически полностью переходит используемый для разделения полисахарид, что обуславливает её потенциально высокие функциональные свойства [6, 7].

Молочная сыворотка, СПФ и продукты с их использованием предполагают их биологическую активность не только обусловленную повышенным содержанием питательных веществ, но и их качественными особенностями, связанными с сохранностью нативной структуры компонентов сывороточной фазы молока.

Растущий рынок функциональных продуктов питания является инновационным по своему характеру, поэтому на этом рынке наблюдается постоянный рост интереса к новым ингредиентам. Белковые компоненты молочной сыворотки и полисахариды представляют собой природные биополимеры. В большинстве функциональных пищевых продуктов белки и полисахариды определяют их пищевую ценность, а также являются основным структурообразующим звеном. Поэтому на их основе можно создать разнообразные формы пищи с заданной структурой, необходимыми органолептическими показателями.

#### **Список литературы:**

1. Валенкевич, Л. Н. Молоко и молочные продукты в практике врача / Л.Н. Валенкевич, О.И. Яхонтова. – СПб. : Политехника, 2005. – 158 с.
2. Пашина, Е. Ю. Разработка технологии напитков из вторичного молочного сырья с регулируемым содержанием лактозы / Е.Ю. Пашина : Автореферат

дисс. ... канд. техн. наук. – Ставрополь : Северо-Кавказский государственный технический университет, 2012. – 24 с.

3. Пашина, Е. Ю. Напитки из белково-углеводного сырья [Текст] / Е.Ю. Пашина, А.Г. Храмцов, А.Д. Лодыгин // Молочная промышленность. – 2011. № 12. – С. 73-74.

4. Технология продуктов из вторичного молочного сырья / А.Г. Храмцов, С.В. Василисин, С.А. Рябцева, Т.С. Воротникова. – СПб. : ГИОРД, 2009. – 424 с.

5. Трухачёв, В.И. Реализация жизненного цикла биомембранной технологии молочных продуктов нового поколения / В.И. Трухачёв, В.В. Молочников, Т.А. Орлова, А.Г. Храмцов // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2017. – № 3. – С. 9-13.

6. Храмцов, А. Г. Феномен молочной сыворотки / А. Г. Храмцов. – СПб. : Профессия, 2011. – 804 с.

7. Храмцов, А.Г. Основопологающие принципы высокоэффективного производства функциональных молочных продуктов / А.Г. Храмцов, В.И. Трухачёв, В.В. Молочников, Т.А. Орлова // Вестник АПК Ставрополя. – 2016. – № 3. – С. 52-56.

## ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СУШКИ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ВЕШЕНКИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*, ИМИТИРУЮЩИХ ПРОЦЕСС ПИЩЕВАРЕНИЯ

Писков С.И., Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В., Аванесян С.С.,  
Лионова С.С.

Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь,  
piskovsi77@mail.ru

*Основная цель проведенного исследования состояла в том, чтобы определить антиоксидантный потенциал в условиях *in vitro*, имитирующих процесс желудочно-кишечного пищеварения плодовых тел вешенки, высушенных различными способами, а именно лиофильной сушкой, горячим воздухом, в микроволновой печи и сушкой на солнце. Ключевым вопросом исследования являлся, насколько значительна разница между антиоксидантными эффектами вешенки, высушенной различными способами с учетом активности радикальной абсорбции, способности к восстановлению железа и активности ингибирования перекисного окисления липидов.*

**Введение.** В последнее время неуклонно растет интерес к природным антиоксидантам и их использованию для создания продуктов питания нового поколения. Особое внимание в этом плане отводится грибам. Благодаря многообразию содержащихся в них биологически активных веществ они представляют исключительный интерес как ценная сырьевая база для получения продуктов функционального назначения, в частности с антиоксидантным эффектом. Перспективной в этом плане выделяется вешенка, плодовые тела которой содержат целый ряд биоактивных веществ, обеспечивающих ее высокую антиоксидантную активность [6, 16]. Однако различные технологии переработки природного сырья не всегда позволяют максимально сохранить весь комплекс биологически активных веществ и набор интересующих свойств. Большинство технологических процессов, в том числе и сушка, могут влиять как на начальные свойства и состав, так и на клеточную структуру сырья и, следовательно, на высвобождение и биодоступность веществ из пищевой матрицы [3, 12].

Проводимые в этой области исследования нельзя назвать полными, поскольку ряд вопросов по-прежнему остаются невыясненными. В частности, нет достаточных сведений о том, какое влияние на антиоксидантный потенциал вешенки могут оказывать различные способы сушки. Кроме того чистая эффективность антиоксидантов, связанных с пищевыми продуктами, зависит от их фактического уровня и активности в пищеварительном тракте [9]. Поэтому полноценную оценку антиоксидантных свойств пищевых продуктов или их ингредиентов целесообразно проводить в условиях процесса пищеварения. При этом

научных сведений об антиоксидантной активности высушенных плодовых тел вешенки подвергнутых процессу пищеварения практически нет. Целенаправленных исследований влияния способов сушки на антиоксидантную активность вешенки в условиях желудочно-кишечного тракта, не проводилось, что делает вопрос его изучения весьма актуальным.

### **Материалы и методы**

Для исследования использовались свежие плодовые тела вешенки (*Pleurotus ostreatus*). Для эксперимента отбирались грибы с одинаковыми характеристиками зрелости. Перед высушиванием вешенку промывали проточной водой и разрезали на кусочки длиной сторон около 15 мм. Сушку вешенки осуществляли 4-мя различными способами.

При осуществлении *лиофильной сушки (ЛС)* кусочки свежих грибов предварительно замораживали при температуре  $-40^{\circ}\text{C}$  в течение 72 часов в морозильной камере (TEFCOLD SE-45, Дания). Последующее высушивание под вакуумом осуществляли в лиофильной сушилке ЛС-500 (Проинтех, Россия). Среднее рабочее давление в сушильной камере достигало 80,5 Па, температура конденсатора составляла  $-49,0^{\circ}\text{C}$ , нагрев образцов грибов на протяжении всего процесса сушки не превышал  $30^{\circ}\text{C}$ . Общая длительность цикла лиофилизации составляла 26 часов.

*Сушка горячим воздухом (ГВ)* проводилась при атмосферном давлении и температуре  $55^{\circ}\text{C}$  в суховоздушном термостате с принудительной циркуляцией воздуха (ТС-1/80 СПУ, ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия). Длительность сушки составляла 16 часов.

*Микроволновую сушку (МС)* вешенки осуществляли с помощью бытовой микроволновой печи (модель WD 900 EL 23-2III, Erisson, Россия) при уровне мощности микроволн 200 Вт трехкратно по 20 минут с интервалом 5 минут.

*Сушка на солнце (СС)* проводилась под воздействием прямых солнечных лучей при температуре окружающей среды  $25\pm 5^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности  $40\pm 5\%$  в течение 3 дней по 9 часов в день.

Оценку антиоксидантной активности проводили в экстрактах вешенки, полученных путем реакций *in vitro*, имитирующих процесс *желудочно-кишечного пищеварения*, который воспроизводили по методике McDougall с соавт. [11] с некоторыми модификациями.

*Активность радикальной абсорбции* определяли с использованием набора реагентов (ФИТХЕМ, Беларусь) по принципу, заключающемуся в одноэтапной оценке степени восстановления антиоксидантами предварительно сформированного радикала АБТС [1]. В качестве стандарта использовался раствор тролокса.

Оценку *способности к восстановлению железа* проводили методом FRAP [13]. В качестве контроля выступал раствор аскорбиновой кислоты (1 мг/мл).

*Активность ингибирования перекисного окисления липидов* экстрактов измеряли в эмульсионной системе в соответствии со способом, описанным

Qian Z.J. [15] с некоторыми модификациями. Тролокс и аскорбиновая кислота использовались в качестве антиоксидантного стандарта.

*Общее содержание фенолов* в экстрактах измеряли в соответствии с методом Svain T. и Hillis W.E. [17]. Результаты выражались в виде мкг эквивалентов галловой кислоты на мл.

Полученные результаты фиксировали в виде среднего значения и подвергали статистической обработке с использованием метода однофакторного дисперсионного анализа. О достоверности различий величин исследуемых показателей судили при  $P < 0,05$ .

### Результаты

Результаты антиоксидантной активности вешенки, высушенной различными способами показаны в таблице.

Таблица – Показатели антиоксидантной активности вешенки, в условиях пищеварительного тракта *in vitro*

| Способы сушки вешенки    | Антиоксидантные свойства                            |   |  |
|--------------------------|---|---|--|
|                          | Активность радикальной абсорбции АБТС, мМТролокс/мл | Способность к восстановлению железа, мкг/мл | Активность ингибирования липидной окисляемости, мкг/мл |
| Лиофильная сушка (ЛС)    | 1,20±0,03   | 163,6±4,1                                   | 0,67±0,02  |
| Горячий воздух (ГВ)      | 1,24±0,03   | 207,6±5,2                                   | 0,74±0,03  |
| Микроволновая сушка (МС) | 1,43±0,04   | 251,5±6,4                                   | 0,72±0,02  |
| Сушка на солнце (СС)     | 1,27±0,02   | 169,1±4,3                                   | 0,81±0,03  |

Согласно представленным данным средние значения активности радикальной абсорбции, полученные методом АБТС для экстрактов вешенки, высушенной ЛС, ГВ и СС статистически не отличались. Максимальным радикал-связывающим эффектом проявился экстракт вешенки, высушенной МС, и превысил по данному показателю остальные образцы почти на 14% ( $P < 0,05$ ). Выявленные отличия вопреки данным Duan J.L. и Xu J.G [4], свидетельствующим о меньшей сохранности антиоксидантных свойств грибов, высушенных МС, могут быть объяснены разрушением микроволнами клеточных стенок обеспечивающим доступность веществ для гидролиза соляной кислотой и ферментами во время пищеварения.

Сравнивая значения активности радикальной абсорбции можно отметить, что названное свойство экстрактов сухих образцов вешенки коррелирует с содержанием в них фенольных соединений, которые считаются основным компонентом антиоксидантного комплекса грибов.

Наибольшая концентрация фенолов отмечалась в экстрактах вешенки высушенной МС (288,4±7,43 мкг/мл) и достоверно ( $P < 0,05$ ) превышала такую в экстрактах вешенки, обезвоженной ЛС (250,3±6,30 мкг/мл), ГВ (252,8±6,43 мкг/мл) и СС (260,7±6,51 мкг/мл) (рисунок).

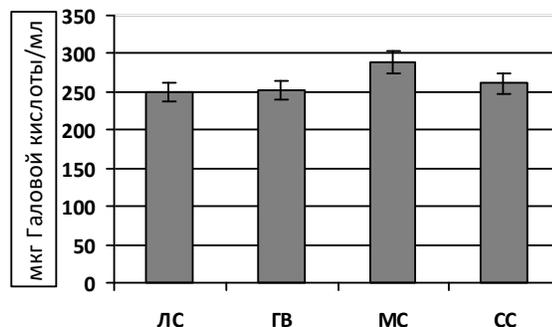


Рисунок – Общее количество фенолов в экстрактах вешенки.

Сопоставление уровня железо-восстанавливающей способности, свидетельствует о том, что ЛС и СС обеспечивают применительно к исследуемому объекту получение близких результатов ( $163,6 \pm 4,1$  мкг/мл;  $169,1 \pm 4,3$  мкг/мл, соответственно). Из четырех образцов наиболее эффективным в отношении способности к восстановлению железа оказались экстракты вешенки, высушенной МС и ГВ. Значения активности всех экстрактов по данному виду антиоксидантного действия в порядке убывания распределились следующим образом: МС→ГВ→СС→ЛС. Полученные результаты подтверждают данные Ji H. с соавт. [8] и могут быть обусловлены ферментативной деградацией антиоксидантных соединений при использовании длительных, низкотемпературных способов высушивания [3, 5]. Кроме того, более высокие показатели железо-восстанавливающей способности экстрактов вешенки, высушенной способами МС и ГВ, для которых характерно нагревание, могут быть связаны с образованием в процессе сушки новых соединений, например, продуктов реакции Майяра, обладающих высокой антиоксидантной активностью [2].

Несколько иные результаты были получены при оценке торможения реакций окисления липидов. Лидером по степени ингибирования липидной окисляемости в условиях желудочно-кишечного пищеварения *in vitro* оказались образцы экстрактов вешенки, высушенной СС. Важную роль в ингибировании окисляемости липидов играет общее количество фенольных веществ, однако в этом исследовании не было корреляции между содержанием фенолов в экстрактах и активностью торможения окисления липидов. Это может говорить о возможной роли вторичных метаболитов, обеспечивающих этот процесс, например флавоноидов, количество которых по данным Min-Jung Kim [10] возрастает в процессе сушки грибов на солнце за счет активации УФО специфического фермента катализирующего первую стадию биосинтеза флавоноидов.

Таким образом, использование различных методов оценки антиоксидантной активности, основанных на разных химических реакциях, позволило получить представление об особенностях антиоксидантной активности вешенки, высушенной различными способами и определить

наиболее эффективные способы сушки для получения сухой вешенки с наибольшим антиоксидантным потенциалом в условиях желудочно-кишечного тракта. Выявлено, что наибольшей активностью радикальной абсорбции сухая вешенка как пищевой продукт или ингредиент обладает после применения микроволновой сушки. Железо-восстанавливающую способность вешенка максимально сохраняет при использовании микроволновой сушки и сушки горячим воздухом. Свойства антиоксидантного продукта с акцентом на высокую активность ингибирования липидной окисляемости вешенка максимально проявляет после применения сушки на солнце.

### Список литературы:

1. Орешко, Н.А. Разработка тест-систем и определение антирадикальной активности биологических жидкостей и фармацевтических субстанций природного и синтетического происхождения / Н.А. Орешко, П.А. Киселев, Т.М. Юрага, Н.Н. Кохнович, В.С. Камышников // Свободные радикалы в химии и жизни: сб. тез. докл. междунар. конф. – Минск, 2015. – С.122-124.
2. Amarowicz, R. Antioxidant activity of Maillard reaction products / R. Amarowicz // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2009. – 111(2). – С. 109-111.
3. Dalmau, E.M. Effects of Freezing, Freeze Drying and Convective Drying on *In Vitro* Gastric Digestion of Apples / E.M. Dalmau, G.M. Bornhorst, V. Eim, C. Rossello, S. Simal // Food Chemistry. – 2016. Duan, J.-L. Effects of Drying Methods on Physico-Chemical Properties and Antioxidant Activity of Shiitake Mushrooms (*Lentinus edodes*) / J.-L. Duan, J.-G. Xu // Agriculture and Food Sciences Research. – 2015. – Vol. 2, №. 2. – P. 51-55.
4. Garau, M.C. Effect of air-drying temperature on physicochemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products / M.C. Garau, S. Simal, C. Rossello, A. Femenia // Food Chemistry. – 2007. – 104(3). – P. 1014-1024.
5. Heleno, S.A. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland / S.A. Heleno, R.C. Ferreira, A.L. Antonio et.al. // Food Bioscience. – 2015. – Vol. 11. – P. 48-55.
6. Hoyos-Arbelaez, J. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages. A review / J. Hoyos-Arbelaez, M. Vazquez, J. Contreras-Calderon // Food Chem. – 2017. – 221. – P. 1371-1381.
7. Ji, H. Effects of drying methods on antioxidant properties and phenolic content in white button mushroom / H. Ji, A. Du, L. Zhang, S. Li, M. Yang, B. Li // International Journal of Food Engineering. – 2012. – Vol. 8, Is. 3. doi: 10.1515/1556-3758.2491.
8. Jin, B. Influence of *in vitro* digestion on antioxidative activity of coconut meat protein hydrolysates / B. Jin, X. Zhou, B. Li, W. Lai, X. Li. // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. – 2015. – 14 (3). – P. 441-447.

9. Kim, Min-Jung Antioxidant and antigenotoxic effects of shiitake mushrooms affected by different drying method / Min-Jung Kim, Won-Mi Chu, EunJu Par // J Korean Soc Food Sci Nutr. – 2012. – 41(8). – P. 1041-1048. doi: 10.3746/jkfn.2012.41.8.1041.
10. McDougall, G.J. Anthocyanins from red wine-their stability under simulated gastrointestinal digestion / G.J. McDougall, S. Fyffe, P. Dobson, D. Stewart // Phytochemistry. – 2005. – Vol. 66, Is. 21. – P. 2540-2548. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.09.003.
11. Parada, J. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients / J. Parada, J. M. Aguilera // Journal of Food Science. – 2007. – 72(2). – P. 21-32.
12. Perez-Burillo, S. Towards an improved Global Antioxidant Response method (GAR+): physiological-resembling in vitro antioxidant capacity methods / S. Perez-Burillo, S. Pastoriza, J.A. Rufian-Henares // Food Chemistry. – 2017.
13. Piljac-Žegarac, J. Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions / J. Piljac-Žegarac, L. Valek, T. Stipcevic, S. Martinez // Food Chem. – 2010. – 121(3). – P. 820-825. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.090.
14. Qian, Z.J. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin / Z.J. Qian, W.K. Jung, S.K. Kim // Rana catesbeiana Shaw. Bioresourc Technol. – 2008. – 99(6). – P. 1690-1698.
15. Radzki, W. Effect of processing on the content and biological activity of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* mushroom / W. Radzki, M. Ziaja-Sołtys, J. Nowak et.al. // LWT - Food Science and Technology. – 2016. – Vol. 66. – P. 27-33.
16. Rigidhar, K. Oral repletion of iron induces free radical mediated alterations in the gastrointestinal tract of rat / K. Rigidhar, K.M. Nair, R. Subramanian, L. Singotamu // Mol Cell Biochem. – 2001. – 219. – P. 91-98.
17. Vieira, P.A.F. Antioxidant activities, total phenolics and metal contents in *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with iron, zinc or lithium / P.A.F. Vieira, D.C. Gontijo, B.C. Vieira et.al. // LWT - Food Science and Technology. – 2013. – Vol. 54, Is. 2. – P. 421-425.

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПРЕБИОТИКОВ – ГАЛАКТООЛИГОСАХАРИДЫ

Родная А.Б., Лодыгин А.Д., Храмцов А.Г.

Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь  
akhramtcov@ncfu.ru

*На основе информационного файла показана возможность получения и применения нового класса пребиотиков - нанокластеров галактоолигосахаридов (ГОС).*

По существующей в настоящее время феноменологической терминологии галактоолигосахариды (ГОС) – некариогенные низкокалорийные вещества, отнесенные по классификации пищевых БАД к классу непереваримых олигосахаридов-пребиотиков [3]. В логистике системного анализа патентной информации по способам синтеза галактоолигосахаридов определены тенденции развития технологии галактоолигосахаридов, а также уровень творческой активности различных стран. Заметный всплеск активности патентования был отмечен в 90-е гг. XX века. Что касается фирм-заявителей, то подавляющее большинство из них – японские, причем около половины этих патентов принадлежит фирме Yakult Honsha.

В зависимости от фракционного состава коммерческие концентраты олигосахаридов можно разделить на три типа. Первый – трансгалактозилированные олигосахариды (ТОС), получаемые с использованием  $\beta$ -галактозидазы из *Aspergillus oryzae* и состоящие из три-, тетра-, пента- и гексагалактоолигосахаридов. Второй – Oligomate 55, получаемый с использованием  $\beta$ -галактозидазы из *Asp. oryzae* и *Streptococcus thermophilus* и содержащий 36 % три-, тетра-, пента- и гексагалактоолигосахаридов, 16 % дисахаридов (галактозилглюкозы и галактозилгалактозы), 38 % моносахаридов и 10 % лактозы. Третий – трансгалактозилированные дисахариды (ТД), получаемые с использованием препарата  $\beta$ -галактозидазы из *Str. thermophilus*.

Основными производителями концентратов галактоолигосахаридов являются Япония и Нидерланды. Галактоолигосахариды выпускаются либо в форме сиропов, либо в форме порошков. В основном ГОС получают путем ферментативного синтеза, при этом реакционный раствор представляет собой водную систему с относительно низкой концентрацией сахаров. Такой раствор подвержен бактериальному загрязнению и не может долго храниться. Кроме того, доля высокомолекулярных углеводов относительно мала, и их кристаллизация затруднена. По этой причине галактоолигосахариды чаще выпускают в виде сиропов. Производство порошкового продукта требует применения ряда добавок, кроме того, порошки ГОС гигроскопичны.

Прямая связь с комплексной олигосахаридной фракцией женского молока, которое также содержит галактозиллактозу, обусловила коммерческое использование ГОС, полученных из лактозы. Оно основано на их использовании в качестве натуральных альтернативных бифидус-факторов для стимуляции роста бифидобактерий в толстом кишечнике человека, что аналогично значению олигосахаридов женского молока для детей с естественным вскармливанием. ГОС применяются в молочной промышленности, хлебопечении, в производстве детского питания, напитков, нутрицевтиков и кормов для животных. Они могут использоваться в безалкогольных напитках в качестве легкого слабительного. Японские

компании добавляют ГОС в кисломолочные напитки (Yakult Honsha) и в детское питание (Snow Brand Milk Products).

В Японии ГОС получили применение в широком ряде пищевых продуктов в качестве подсластителей, наполнителей и заменителей сахара. Они используются в ряде продуктов, включая хлеб, напитки для спортсменов, джемы и мармелад, кисломолочные продукты, кондитерские изделия и десерты. В Европе ГОС добавляются в смеси для детского питания. Компания Nutricia (Нидерланды) производит детское питание «Нутрилон Омнео», «Нутрилон 1» и «Нутрилон 2». Смеси содержат 90 % галактоолигосахаридов и 10 % высокомолекулярных фруктоолигосахаридов. Фирма Humana выпускает гипоаллергенное питание с 4 месяцев и старше Хумана ГА 2 на основе частично гидролизованного сывороточного белка, которое содержит ГОС в оптимальном количестве.

Компания Friesland Foods Domo (Нидерланды), выпускающая пребиотический ингредиент Vivinal GOS, предлагает следующие направления его использования: получение освежающей пребиотической воды, пребиотического молока для подростков, обогащенного волокнами фруктового наполнителя, пребиотического сливочного йогурта. При этом подчеркиваются преимущества использования Vivinal GOS в производстве данных продуктов: пребиотическая активность при низких дозировках, устойчивость к кислой среде и высоким температурам, образование прозрачного раствора, нейтральный, сладковатый вкус.

В патентах по применению ГОС предложены следующие направления использования: в спредах, сырах, мясных продуктах, кондитерских начинках, шоколаде, карамели, кисломолочных напитках, кексах, соусах, супах, сливках для кофе, мороженом, а также кормах для животных. Кроме того, ГОС рассматриваются как возможный компонент функциональных пищевых добавок и детского питания. Предложено использовать ГОС также в кормопроизводстве, в частности, такой корм увеличивает прирост веса у телят.

Анализируя вышеприведенную информацию, можно сделать вывод, что ГОС являются перспективными олигосахаридами-пребиотиками и могут использоваться в широком ряде пищевых, кормовых продуктов, а также продуктов функционального питания [1, 4, 5].

На процесс синтеза галактоолигосахаридов оказывает влияние множество факторов. С целью определения оптимальных параметров процесса трансгалактозилирования в растворах лактозы и пермеате молочной сыворотки изучено влияние температуры, активной кислотности, массовой доли сухих веществ (входные параметры) на эффективность процесса и выход ГОС (выходной параметр).

Полученные результаты послужили основой для целенаправленного изучения совместного влияния технологических факторов на выход продуктов реакции трансгалактозилирования лактозы и разработка

закономерностей математической модели ферментативного синтеза ГОС в пермеате молочной сыворотки.

Проведенные исследования позволили сформировать Технологическую Платформу инновационной биотехнологии (подтверждено патентом) [2] с использованием принципа «вход-выход» в виде операторной модели. При этом превращение сырья – молочной сыворотки в промежуточный продукт – пермеат, а из промежуточного продукта в изделие – концентрат ГОС, достигается в результате нескольких операций, совокупность которых можно рассматривать как подсистему.

При производстве концентрата галактоолигосахаридов из молочной сыворотки на первом этапе проводится очистка от казеиновой пыли и молочного жира. Азотсодержащие соединения сыворотки, являясь несахарами, отрицательно сказываются на выходе целевых продуктов при получении производных лактозы. Вступая в реакцию с лактозой, они образуют устойчивые комплексы, которые трудно гидролизуются  $\beta$ -галактозидазой и, как следствие, замедляются реакции гидролиза и трансгликозилирования. Кроме того, эти вещества затрудняют ведение технологического процесса, так как влияют на интенсивность сгущения сыворотки, способствуя образованию пены.

Наиболее полно выделить белки из молочной сыворотки позволяет метод ультрафильтрации. Полученный при ультрафильтрации пермеат далее направляют на производство концентрата ГОС, а белковый ультраконцентрат (ретентат) после соответствующей обработки можно использовать в производстве продуктов питания в пастообразном или сухом виде.

В производстве концентрата ГОС деминерализация сыворотки не предусмотрена, т. к. минеральные вещества, способствуя увеличению растворимости лактозы, снижают степень ее выкристаллизации. В противном случае образовавшиеся кристаллы лактозы не будут подвергаться реакциям гидролиза и трансгликозилирования  $\beta$ -галактозидазой. Это заметно упрощает и значительно удешевляет производство.

Пермеат сгущают при температуре 55 – 60 °С до массовой доли сухих веществ 20 % (так как 4-кратное сгущение пермеата обеспечивает наибольшее содержание олигосахаридов в продукте). Возможно концентрирование обратным осмосом. Далее пермеат направляют на электроактиватор, где его рН регулируют до значения 6,0.

Затем проводят ферментацию сыворотки  $\beta$ -галактозидазой *Penicillium canescens* (препарат Лактоканесцин Г20х) при следующих условиях: рН 6,0; температура 55 °С; продолжительность – 3±1 час; доза фермента – 0,8 % от массы пермеата (процесс «ноу-хау»). После ферментации раствор, содержащий ГОС, досгущают на вакуум-выпарной установке (ВВУ) до массовой доли сухих веществ 60 %. Для инактивации фермента в конце сгущения температуру в ВВУ (процесс «ноу-хау») поднимают до 70 °С. Далее концентрат необходимо охладить до 6 – 8 °С, что проводится в

кристаллизаторе-охладителе. Продукт расфасовывают в пищевую тару. Готовый продукт – концентрат ГОС отвечает всем требованиям разработанной нормативно-технической документации. ВЭЖХ опытно-промышленных образцов идентичен препарату Vivinal GOS®.

Результаты экспериментальных исследований и технико-экономических расчетов подтверждают высокий инновационный потенциал технологии концентратов галактоолигосахаридов. Теперь дело за инвестором и организацией промышленного производства. Альтернатива – полная импортозависимость!

### **Список литературы**

1. Гаврилов, Г.Б. Справочник по переработке молочной сыворотки. Технологии, процессы и аппараты, мембранное оборудование/ Г.Б. Гаврилов, А.Ю. Просеков, Э.Ф. Кравченко, Б.Г. Гаврилов. – СПб: ИД Профессия, 2015. – 176 с.
2. Пат. 2379903 Российская Федерация, МПК А 23 С 21/00, А 23 L 1/30. Способ получения концентрата галактоолигосахаридов (варианты) / А.Г. Храмцов, А.Б. Родная, И.А. Евдокимов, С.А. Рябцева, А.Д. Лодыгин, Ю.В. Дикунова. – Опубл. 27.01.2010, Бюл. № 3. – 4 с.
3. Родная, А.Б. Разработка биотехнологии концентратов галактоолигосахаридов из лактосодержащего сырья / Дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04 – Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ // А.Б. Родная. – Ставрополь: СевКавГТУ, 2011. – 145 с.
4. Храмцов, А.Г. Тенденции развития способов получения галактоолигосахаридов / А. Г. Храмцов, А. Б. Родная, А. Д. Лодыгин, С. А. Рябцева // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 2011. – № 2 – 3. – С. 5 – 8.
5. Храмцов, А. Г. Феномен молочной сыворотки / А.Г. Храмцов. – СПб. : Профессия, 2011. – 804 с.

### **НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗ ДРОЖЖЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

Рябцева С. А., Скрипнюк А. А., Котова А. А., Храмцов А. Г.,  
Родная А. Б., Лодыгин А. Д., Мартак А. А.

Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь,  
ryabtseva07@mail.ru

*Описаны процессы получения комбинированного ферментного препарата β-галактозидаз дрожжевого и бактериального происхождения, имеющего расширенный pH и температурный диапазон действия. Полученный по предлагаемой технологии фермент имеет низкую стоимость за счет применения для культивирования микроорганизмов вторичного*

молочного лактозосодержащего сырья и интенсификации процессов культивирования. Предусмотрено использование лактозосбраживающих дрожжей и термофильных молочнокислых бактерий, применяющихся в производстве пищевых продуктов.

Фермент  $\beta$ -галактозидаза способен отщеплять концевой нередуцированный остаток  $\beta$ -D-галактозы в  $\beta$ -галактозидах с образованием свободных моносахаридов. Благодаря этому свойству фермент применяется для производства молочных продуктов с пониженным содержанием лактозы, глюкозо-галактозных сиропов и фармпрепаратов для лечения лактазной недостаточности. Кроме того,  $\beta$ -галактозидаза может переносить остаток  $\beta$ -D-галактозы на молекулы  $\beta$ -D-галактозидов с образованием олигосахаридов, которые являются пребиотиками [1]. Доказано, что галактоолигосахариды способствуют развитию полезной микрофлоры, подавлению роста патогенных микроорганизмов, способствуют усвоению кальция и магния, проявляют иммуномодулирующее и гипохолестеринемическое действие, снижают риск развития опухолей [2].

К основным направлениям совершенствования технологии  $\beta$ -галактозидаз относятся проведение генно-инженерных работ с целью повышения активности продуцентов; поиск продуцентов ферментов с расширенным диапазоном действия; разработка новых методов иммобилизации клеток и ферментов [1, 3].

На кафедре прикладной биотехнологии СКФУ проводятся исследования морфологических, культуральных и биохимических свойств лактозосбраживающих дрожжей, направленные на упрощение и интенсификацию способов получения и применения  $\beta$ -галактозидаз. В частности, проведен анализ способов получения галактоолигосахаридов с использованием дрожжей-продуцентов  $\beta$ -галактозидаз, выявлены их достоинства и недостатки [4]. Изучено влияние массовой доли сухих веществ в сыворотке и ее кислотности на культивирование дрожжей *K.marxianus* и *S.kefyr* в чистых и смешанных с молочнокислыми микроорганизмами культурах, описаны закономерности, установлены оптимальные параметры процессов. Исследованы процессы гидролиза и трансгликозилирования лактозы с использованием автолизатов дрожжей *K. marxianus* и *S.kefyr*. Установлено, что внесение *Str. thermophilus* после культивирования дрожжей *Kl. marxianus* перед началом процесса автолиза позволяет сократить как время автолиза, так и время синтеза галактоолигосахаридов [5].

Результаты исследований стали основой разработки способа получения комбинированного ферментного препарата бета-галактозидаз, который в настоящее время запатентован [6].

Технический результат предлагаемого способа заключается в получении комбинированного ферментного препарата  $\beta$ -галактозидаз разного происхождения (дрожжевого и бактериального), имеющего расширенный рН

и температурный диапазон действия. Полученный по предлагаемой технологии фермент имеет низкую стоимость за счет применения дешевого вторичного молочного лактозосодержащего сырья, интенсификации процессов культивирования и исключения энергоемкого процесса гомогенизации. Для достижения этого результата предложено в качестве продуцентов ферментов использовать лактозосбраживающие дрожжи и термофильные молочнокислые бактерии, применяющиеся в производстве пищевых продуктов и способные синтезировать  $\beta$ -галактозидазы с разными температурными и рН диапазонами действия. Кроме того, эти микроорганизмы на первом этапе культивирования в лактозосодержащих средах стимулируют развитие друг друга, за счет чего достигается интенсификация процесса культивирования, а на втором – создают условия для лизиса клеток и извлечения ферментов, что позволяет исключить гомогенизацию. Благодаря тому, что в технологии используются заквасочные микроорганизмы с доказанной безопасностью, не требуется сложной очистки продукта от токсичных продуктов их метаболизма.

В качестве сырья и питательной среды для культивирования микроорганизмов используется вторичное молочное сырье (например, молочная сыворотка), содержащее лактозу, азотистые и минеральные вещества, необходимые для развития лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых микроорганизмов. При использовании молочной сыворотки, как правило, ее очищают от остатков молочного жира и казеиновой пыли на специальных сепараторах. Температурная обработка сырья проводится при 72 – 76 °С, продолжительностью 15 – 20 секунд, для уничтожения микроорганизмов, которые могут влиять на качество готового продукта.

Важным для данного способа является то, что массовая доля лактозы в исходном растворе должна составлять от 3 до 15 %. 3% - это минимальное содержание лактозы в натуральной творожной сыворотке, кроме того, если в среде будет меньше 3 % лактозы, то микроорганизмы-продуценты бета-галактозидазы будут плохо развиваться из-за недостатка углеводов. Повышение массовой доли лактозы может достигаться путем подсушивания или растворения сухого сырья, причем концентрация лактозы свыше 15 % будет способствовать подавлению развития дрожжей и молочнокислых микроорганизмов.

В подготовленную лактозосодержащую среду вносятся закваски заранее активированных микроорганизмов лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых бактерий. Культивирование проходит при  $(30\pm 2)^\circ\text{C}$ , это оптимальная температура развития дрожжей, при более низкой или высокой они развиваются медленнее. При этой температуре термофильные молочнокислые бактерии сначала развиваются медленно, подкисляя среду, что стимулирует рост дрожжей. Повышение температуры культивирования приведет к ускоренному росту термофильных молочнокислых бактерий, кислотность быстро нарастет, что может подавлять развитие дрожжей. На

втором этапе культивирования продукты жизнедеятельности дрожжей, такие как витамины и аминокислоты, будут стимулировать рост молочнокислых микроорганизмов, что позволит достичь достаточно высокой концентрации клеток и кислотности среды. Культивирование проводят в течение 7-16 ч, время зависит от аэрации среды.

Для получения ферментного препарата могут использоваться любые лактозосбраживающие дрожжи и термофильные молочнокислые бактерии, применяющиеся в пищевой промышленности и способные продуцировать фермент бета-галактозидазу. Целесообразно использовать применяющиеся в молочной промышленности для производства кисломолочных продуктов смешанного брожения (кефир, айран, кумыс и др.) дрожжи *Kluuveromyces marxianus*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces kefyri*, *Candida kefyri*, *Kluuveromyces lactis*, и молочнокислые термофильные микроорганизмы *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* и другие.

После культивирования проводится извлечение ферментов из клеток дрожжей и молочнокислых микроорганизмов. Процесс извлечения ферментов из биомассы проводится путем автолиза клеток при температуре  $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$  в течение 6-12 часов. Процесс автолиза клеток микроорганизмов при указанных температурах протекает эффективно благодаря кислой среде, которая образовалась в результате молочнокислого брожения. При температуре ниже  $45^\circ\text{C}$  скорость автолиза уменьшается, при температурах выше  $55^\circ\text{C}$  может происходить снижение активности ферментов.

Очистка суспензии от остатков клеток микроорганизмов и белков лактозосодержащего сырья осуществляется при помощи ультрафильтрации. Концентрирование очищенного раствора ферментов может быть осуществлено методами низкотемпературного сгущения или сушки, позволяющими сохранить свойства ферментов. Процессы ультрафильтрации и концентрирования используются в известных способах получения ферментов и не являются отличительным признаком изобретения.

Процесс может быть проведен на существующем и широко используемом в молочной промышленности и биотехнологии оборудовании, при этом используются заквасочные микроорганизмы, что уменьшает затраты на очистку продукта от токсичных продуктов метаболизма, а следовательно и себестоимость продукта.

В результате вышеописанных операций получается недорогой комбинированный ферментный препарат бета-галактозидаз, имеющий расширенный диапазон действия (рН от 5 до 7,5 и температура от  $30$  до  $55^\circ\text{C}$ ) за счет наличия бета-галактозидаз двух типов – дрожжей и молочнокислых микроорганизмов.

Полученный препарат может быть использован для гидролиза лактозы в молочном сырье, в частности, для получения низколактозных молочных

продуктов и глюкозо-галактозных сиропов пищевого назначения из вторичного молочного сырья.

### Список литературы:

1. Panesar P.S. Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase / Panesar P.S. et al. // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 81, № 4. – P. 530–543.
2. Torres D. P. Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics / D. P. Torres, M. Gonçalves, J. A. Teixeira, L. R. Rodrigues // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2010. – V. 9, № 5. – P. 438 – 454.
3. Скрипнюк А.А. Рябцева С. А. Современные методы получения  $\beta$ -галактозидаз // Наука. Инновации. Технологии – Ставрополь.: Издательство СКФУ, 2014 – С. 208 – 214.
4. Храмцов А.Г. Применение дрожжей – продуцентов бета-галактозидаз для получения галактоолигосахаридов из лактозосодержащего сырья / Храмцов А.Г., Рябцева С.А., Панфилова А.А., Родная А.Б., Лодыгин А.Д. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2012. – №8. – С. 36 – 39.
5. Котова А.А. Исследование процесса синтеза галактоолигосахаридов с использованием лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых микроорганизмов / А.А. Котова, С.А. Рябцева, А.Д. Лодыгин, А.А. Скрипнюк, А.Б. Родная // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2015. – № 5-6. – С. 14-18.
6. Патент RU 2622078, С1, МПК С12N 9/14. Способ получения комбинированного ферментного препарата бета-галактозидаз // С.А. Рябцева, А.А. Скрипнюк, А.А. Котова, А.Г. Храмцов, А.Б. Родная, А.Д. Лодыгин, А.А. Мартак. – Оpubл. 9.06.2017, бюл.№ 316.

## РЕОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВАРЕННЫХ СГУЩЕННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗОВАННОЙ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Соколовская Л.Н.<sup>1</sup>, Сороко О.Л.<sup>1</sup>, Дымар О.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> РУП «Институт мясо-молочной промышленности», г Минск

<sup>2</sup> АО «МЕГА» (Чешская республика) в Республике Беларусь, г. Минск,

*В работе приведены анализ физико-химических характеристик сладких вареных сгущенных молочных продуктов изготовленных на основе гидролизованной ферментом  $\beta$ -галактозидаза молочной сыворотки. Проведено аналитическое сравнение качественных показателей новых сладких вареных сгущенных молочных консервов с пониженным содержанием дисахаридов «Варюша» с классическим молоком сгущенным с сахаром вареным «Лакомка». Описаны особенности и преимущества*

*производства сладких вареных сгущенных молочных продуктов с применением селективных методов обработки молочного сырья.*

**Введение.** Ферментативный гидролиз лактозы в молочной промышленности получил широкое распространение в производстве различных групп пищевой продукции. Уже освоено производство без- и низколактозных цельномолочных продуктов, мороженого и йогурта, также изучено направление использования направленного расщепления молочного сахара для получения глюкозо-галактозных сиропов из производных молока [1, 2]. Менее изучено применение ферментативных препаратов лактазы ( $\beta$ -галактозидазы), посредством которых и происходит гидролиз лактозы в молочном сырье, в молочноконсервном производстве, чаще всего  $\beta$ -галактозидазу используют в производстве вареных сгущенных молочных продуктов с сахаром, в качестве антикристаллизатора лактозы, с целью предотвращения пороков связанных с ее спонтанной кристаллизацией при хранении. В связи с тем, что все чаще в производстве молочных продуктов используется сыворотка, в том числе и в производстве сладких сгущенных молочных консервов, особое значение приобретает вопрос использования ферментативного гидролиза лактозы при переработке этого вида молочного сырья.

**Результаты.** В ходе научно исследовательской работы проводимой в РУП «Институт мясо-молочной промышленности» было установлено, что для эффективного протекания процесса ферментативного гидролиза лактозы в молочной сыворотке, необходимо проведение ее предварительной селективной подготовки: баромембранного концентрирования до содержания сухих веществ 16 – 22 % и деминерализации до уровня обессоливания не менее 50 %. [5]. Кроме того, важным производственным фактором является соблюдение рекомендуемых оптимальных параметров ферментации молочной сыворотки препаратом  $\beta$ -галактозидаза [6]. Также ранее было установлено, что использование гидролизованной молочной сыворотки в качестве основы вареного сгущенного молочного продукта в два-три раза сокращает время процесса карамелизации, так оптимальный режим автоклавирования сладких сгущенных продуктов на основе сыворотки составляет (20 – 30) мин при температуре (115–121) °С, в то время как для классического молока варенного продолжительность термизации при той же температуре составляет не менее 60 минут [3]. Все, полученные в предыдущих исследованиях, данные были объединены с **целью** отработки процесса производства вареных молочных консервов на основе молочной сыворотки и анализа качественных характеристик, полученных образцов.

Для отработки процесса производства вареных молочных консервов на основе молочной сыворотки проведена серия экспериментальных и опытно-промышленных выработок, в результате которых получено несколько партий продуктов сгущенных молочных с сахаром вареных, из которых были отобраны для анализа следующие образцы: продукт молочный сгущенный обезжиренный

с сахаром вареный «Варюша» (Образец №1), продукт молочный сгущенный частично обезжиренный с сахаром вареный «Варюша» (Образец №2). Для анализа в качестве контрольного образца взято молоко сгущенное цельное с сахаром вареное «Лакомка», производимый на том же предприятии, что и опытно-промышленные образцы вареных сгущенных молочных продуктов «Варюша» ОАО «Глубокский МКК». Физико-химические показатели образцов приведены в таблице 1

Таблица 1 – Физико-химические характеристики продуктов сладких вареных молочных сгущенных и молока сгущенного цельного с сахаром вареного

| Наименование показателя, единицы измерения                                     | Образец №1 | Образец №2 | Контроль «Лакомка» |
|--|------------|------------|--------------------|
| Массовая доля сухих в-в, %   | 73,6       | 71,6       | 72,0               |
| Массовая доля жира, %  | 1,0        | 2,5        | 8,5                |
| Массовая доля белка, % в том числе:<br>-казеина, %<br>- сывороточных белков, % | 5,3        | 4,8        | 6,4                |
| Массовая доля сахарозы, %  | 21,7       | 25,0       | 43,5               |
| Массовая доля лактозы, %   | 5,0        | 4,8        | 13,0               |

По представленным данным видно, что в опытных образцах, в сравнении с контрольным, значительно снижены массовые доли сахарозы и лактозы. Массовая доля лактозы снижена за счет осуществления ферментативного гидролиза молочного сахара в молочной сыворотке, который распался на составляющие более сладкие, чем сама лактоза, моносахара глюкозу и галактозу, что позволило в свою очередь снизить добавление сахарозы, без потери по вкусовым характеристикам конечного продукта. Содержание сухих веществ и общего белка в образцах вареных сгущенных продуктов и контрольном образце близки и находятся в рамках аналогичных показателей данной группы продуктов. Проведен анализ показателей динамической вязкости исследуемых образцов вареных сгущенных молочных продуктов на основе гидролизованной молочной сыворотки «Варюша» и молока сгущенного цельного с сахаром вареного «Лакомка». Реограммы образцов представлены на рисунке 1.

Эффективная вязкость вареного молочного сгущенного продукта с сахаром на основе гидролизованной сыворотки с массовой долей жира 2,5 % при градиенте скорости  $1 \text{ с}^{-1}$  и температуре  $20,0^\circ\text{C}$ , составила  $460,9 \text{ Па}\cdot\text{с}$ , продукта сгущенного обезжиренного с сахаром вареного –  $1287,4 \text{ Па}\cdot\text{с}$ , а контрольного образца молока сгущенного цельного с сахаром вареного «Лакомка» –  $1193,1 \text{ Па}\cdot\text{с}$ . По представленным данным можно сделать вывод, что наибольшей вязкостью обладал обезжиренный сгущенный вареный продукт, а наличие жировой составляющей закономерно снижает эффективную вязкость продуктов. Высокую вязкость контрольного образца, не смотря на 8,5 % содержания жира и большее содержание сахарозы можно объяснить большей массовой долей казеина, который в составе

казеинаткальцийфосфатного комплекса обеспечивает повышенную вязкость молочных консервов изготавливаемых из молока [4].

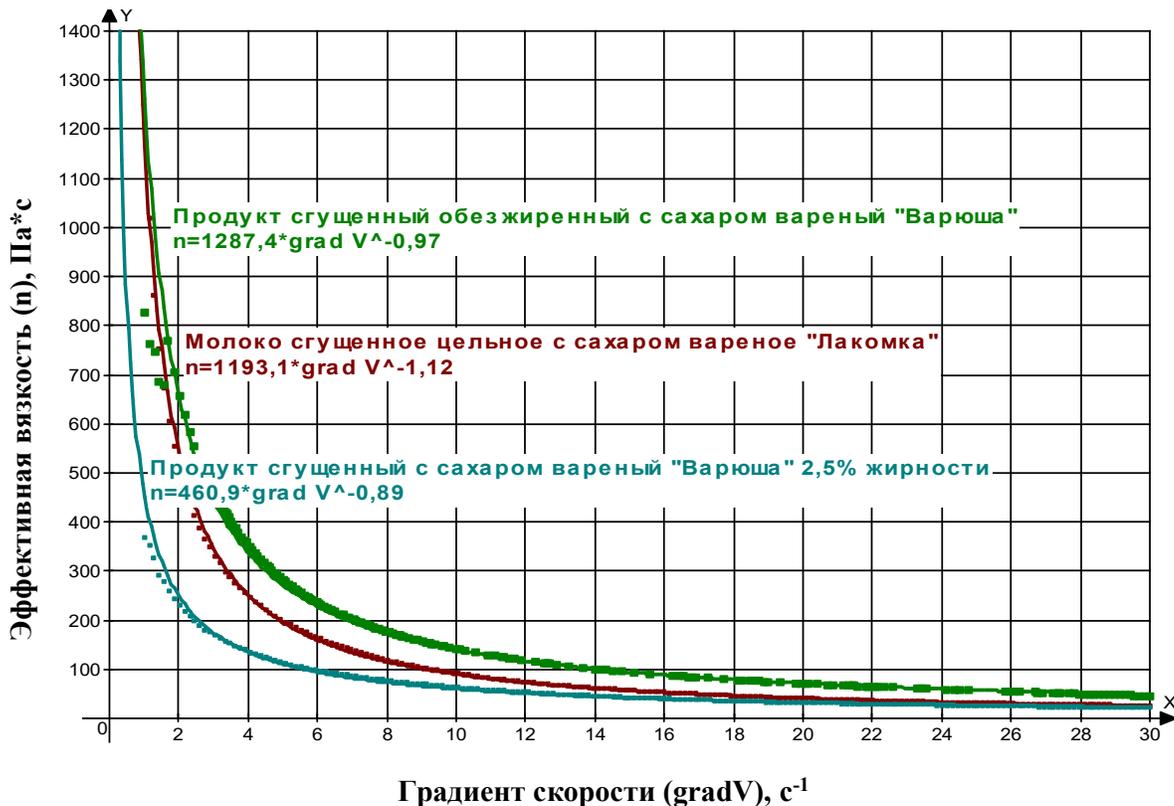


Рисунок 1 –Реограммыопытных и контрольного образцов вареных сгущенного молочных продуктов с сахаром (при температуре 20,0 °С)

Для вареных сгущенных молочных консервов важным является сохранение вязкостных характеристик при хранении и употреблении. Так как данную группу продуктов часто используют в кондитерском производстве, проведено реологическое исследование вязкостных характеристик вареных продуктов при их нагревании. В этой связи проведены исследования изменения вязкости исследуемых образцов при их нагревании (рисунок 2). Оценка этого показателя проводилась при градиенте скорости  $30 \text{ с}^{-1}$ , когда динамическая вязкость образцов при постоянной температуре оставалась неизменной.

Характер изменения эффективной вязкости при нагревании вареных сгущенных молочных продуктов с сахаром схожий для всех образцов. Причем вязкость вареного продукта молочного сгущенного с сахаром с массовой долей жира 2,5 % изменялась в процессе нагревания в меньшей степени и при максимальном нагреве сравнивалась с вязкостью молока сгущенного цельного с сахаром вареного «Лакомка», а эффективная вязкость обезжиренного продукта снижалась более интенсивно, это явление можно объяснить термопластичностью молочного жира в составе продуктов,

который при комнатной температуре снижает вязкость молочной консервы, но при нагревании позволяет ее сохранять на более высоком уровне, чем у обезжиренного образца.

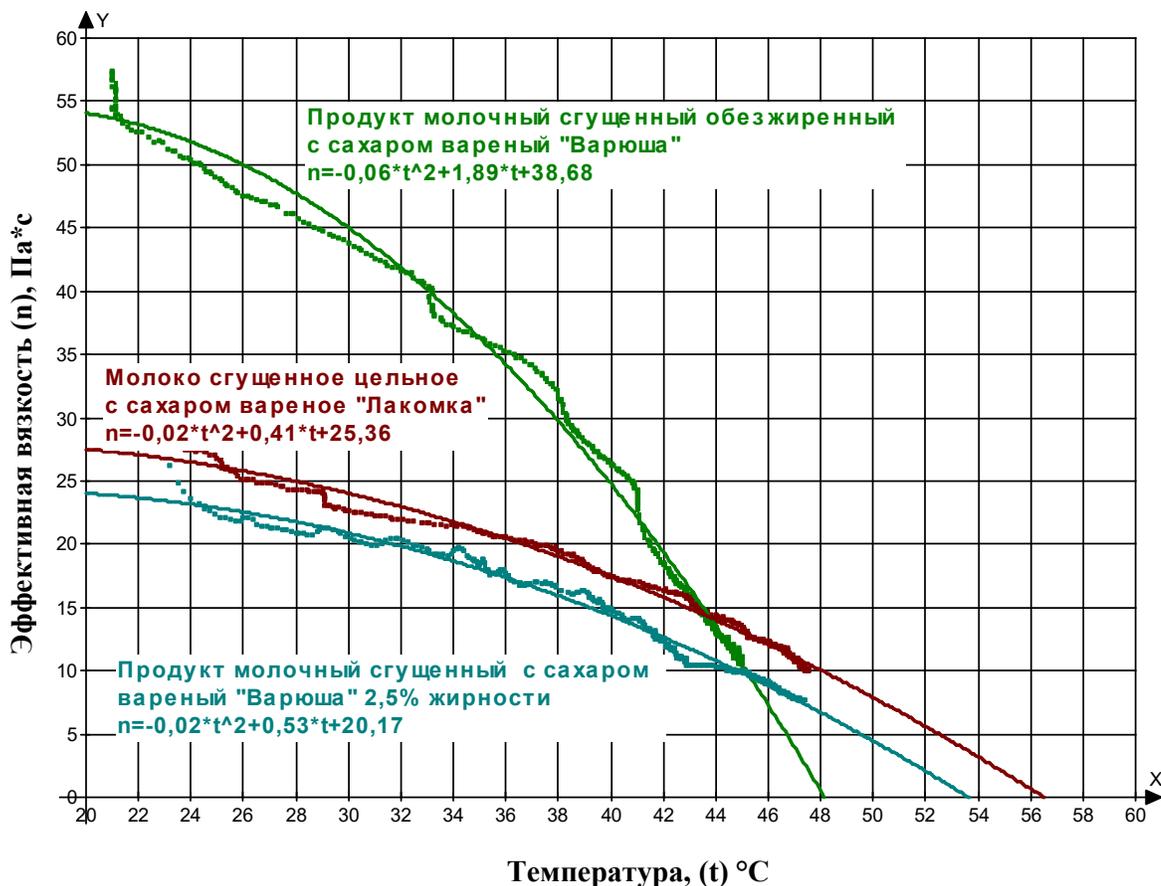


Рисунок 2– Зависимость эффективной вязкости вареных сгущенных молочных продуктов с сахаром от температуры нагревания

В результате исследований установлено, что продукты вареные сгущенные с сахаром изготовленные на основе гидролизованной молочной сыворотки обладают характерными традиционному сгущенному молоку с сахаром вареному качественными показателями. Новые сгущенные продукты характерными для группы сладких вареных продуктов реологическими показателями, как при комнатной температуре, так и при нагревании. Следовательно, они могут быть применены в различных отраслях пищевой промышленности аналогично традиционному вареному сгущенному молоку с сахаром, без перенастройки режимов работы оборудования. Освоение описанной инновационной технологии на молочноконсервном производстве позволит полноценно использовать молочную сыворотку, в качестве основы сладкого сгущенного молочного продукта, без потери в его качестве, а также снизить расходы на сахар и энергоресурсы, затрачиваемые на процесс карамелизации сладкого сгущенного продукта.

**Список литературы:**

1. Арсеньева, Т.П. Развитие теоретических основ и разработка технологий низколактозных молочных продуктов с регулируемым жирнокислотным составом: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора технических наук – Санкт-Петербург – 2008г.
2. Варданян, А.Г. Разработка технологии концентратов гидролизованной лактозы на основе пермеата молочной сыворотки: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук:05.18.04 / А. Г. Варданян; СевКавГГУ – Ставрополь, 2009. – 133с.
3. Галстян, А. Г. Краткий справочник специалиста молочно-консервного производства / А. Г. Галстян, И. А. Радаева, С.Н. Турановская, С. А. Корчагина, В.В. Червецов, Е. Е. Иларионова, Н. Н. Свистун, М.Н. Гоцанская – М.: Издательство ООО «Ритм», 2011. - 152 с.
4. Голубева, Л. В. Хранимоспособность молочных консервов/ Л. В. Голубева, Л. В. Чекулаева, К. К. Полянский. – М: ДеЛипринт, 2001. – 115с.
5. Дымар, О.В. Определение оптимальных параметров процесса ферментативного гидролиза лактозы в молочной сыворотке О.В. Дымар, Л.Н. Емельянова, Г.С. Джумок / Пищевая промышленность: наука и технологии, РУП «Научно практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» // Минск, 2012 – №1(15) – С. 24-30.
6. [http://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/ru\\_RU/products/enzymes/dairy/maxilact.html](http://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/ru_RU/products/enzymes/dairy/maxilact.html)

#### РАНЕВЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ 3-D СКАФОЛДОВ ИЗ НАНОВОЛОКОН БИОПОЛИМЕРОВ С ВКЛЮЧЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Тимченко Л.Д. <sup>1</sup>, Ржепаковский И.В. <sup>1</sup>, Писков С.И. <sup>1</sup>, Арешидзе Д.А. <sup>2</sup>,  
Капустин М.А. <sup>3</sup>, Курченко В.П. <sup>3</sup>, Ульшина Д.В. <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

<sup>2</sup>Московский государственный областной университет, г. Москва

<sup>3</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, kurchenko@tut.by

<sup>4</sup>Ставропольский противочумный институт, г. Ставрополь

*Исследован состав и физико-химические свойства гидролизата эмбрионов кур. Показана его высокая эффективность в заживлении ран. Для практического использования полученного гидролизата разработана оригинальная лекарственная форма в виде порошка клатрата циклодекстрина с включенными в него продуктами гидролизата эмбрионов. Этот клатрат использован при создании композиционного раневого покрытия на основе 3D-скафолдов из пуллулана.*

**Введение.** В настоящее время ведутся интенсивные исследования в области создания перевязочных средств с биологически активными свойствами и направленным воздействием на течение раневого процесса.

Раневое покрытие - средство длительного лечебного воздействия на рану с использованием различных материалов и веществ путем их удержания на необходимом участке тела больного. Раневым покрытиям из композитных материалов присущ ряд важных свойств: защитные - предотвращение проникновения инфекции извне в рану; сорбционные - способность поглощать выделяющийся из раны экссудат; лечебные - наличие гемостатического действия, способности стимулировать заживление раны, совместимость с лекарственными веществами; транспортные - воздухопроницаемость, способность препятствовать испарению экссудата через покрытие [7].

В полной мере таким требованиям соответствуют раневые покрытия на основе 3D-скафолдов. Под скафолдами понимают пористые синтетические конструкции на основе биосовместимых и биodeградируемых природных и синтетических полимеров, с включением дополнительных биологически активных компонентов. Они создают идеальные условия для обеспечения клеточной адгезии, пролиферации, дифференцировки и созревания клеток тканей организма и выполняющих функции экстрацеллюлярного матрикса. Скафолды широко применяют при лечении обширных ожогов, хронических ран, поэтому их также рассматривают как биотехнологические раневые покрытия [4].

Для получения 3D скафолдов раневых покрытий используются биodeградируемые полимеры: пуллулан, хитозан, коллаген и др. На их основе получают нановолокна обладающие суперразвитой удельной поверхностью. В результате электроформования наноструктур биполимеров их нанопибриллы диаметром 100-300 нм формируют 3D скафолд. Для формирования скафолдов могут быть использованы композиционные смеси хитозана, пуллулана, коллагена с включением биологически активных веществ способствующие ранозаживлению. Важной особенностью этих материалов является их высокая гидрофильность, позволяющая сорбировать до 4000% влаги, хорошая адгезия к ране, а также гемостатические свойства [3].

В качестве биологически активных веществ вносимых в такие губчатые структуры могут быть использованы антибиотики, различные факторы роста, а также пептиды полученные гидролизом эмбрионов птиц [7, 5, 6]. Эти вещества способствуют ранозаживлению, но в своем большинстве они являются гидрофобными соединениями, которые плохо растворимы в воде. В связи с этим, возможно их включение в циклодекстрины [2]. Такие клатраты приобретают способность растворяться в воде и пролонгировать действие биологически активных веществ. Полученный комплекс представляет собой порошок, который может быть растворен и добавлен к биополимерам. При электроформовании наноструктур таких смешанных растворов клатраты БАВ включаются в нановолокна биополимеров. Полученный таким образом ранозаживляющий 3-D скафолд будет содержать в нанопибриллах

циклодекстрин с включенными в него пептидами или другими биологически активными веществами.

В связи с этим, целью работы являлось исследование ранозаживляющих свойств гидролизата эмбрионов птиц, включение пептидов из них в клатраты циклодекстрина и разработка технологии получения ранозаживляющих 3-D скафолдов из пуллулана с включением в них клатратов БАВ.

#### **Материалы и методы.**

Гидролизаты из эмбрионов птиц получали с использованием ранее описанной методики [5]. Состав аминокислот и пептидов исследовался на автоматическом анализаторе аминокислот ARACUS (ABACUS, Германия). Масс-спектры пептидов гидролизата получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Включение пептидов и аминокислот гидролизатов эмбрионов птиц в клатраты с циклодекстрином осуществляли методом сорастворения и лиофилизации [1, 2].

Для оценки количества включенных аминокислот и пептидов в циклодекстрин использовался гравиметрический метод [2]. Содержание аминного азота в гидролизатах эмбрионов птиц и комплексах включения, определяли методом формальдегидного титрования [8].

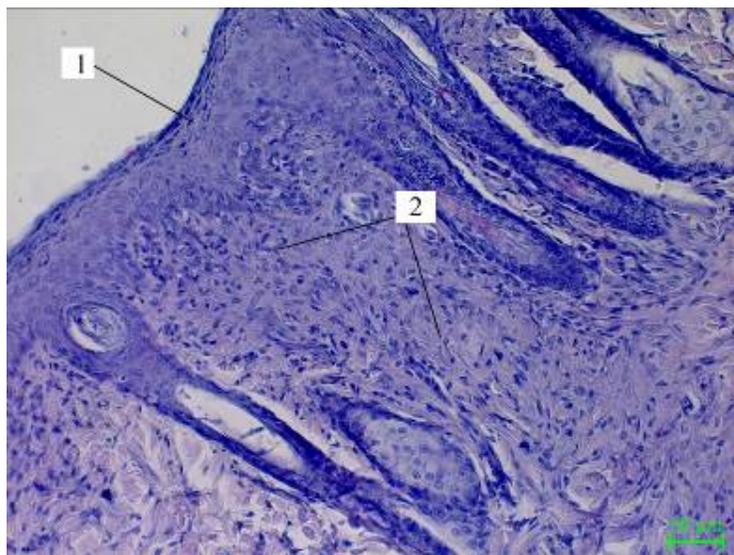
Термогравиметрическим методом анализировались образцы комплексов включения аминокислот и пептидов с  $\beta$ -ЦД, их физической смеси и циклодекстрина. Измерения проводились с помощью термоаналитической системы TA - 4000 «Mettler Toledo» Швейцария. Масса исследуемой навески  $\sim 10,5$  мг. Использовалось программирование температуры в диапазоне 25 – 550°C, скорость подъема температуры - 5 °C/мин [2]. Нановолокна из полулана с включением БАВ гидролизатов эмбрионов птиц и их клатратов с циклодекстрином получали методом электроформования на установке Yflow® StartUpElectrospinningMachine (Испания).

#### **Результаты и обсуждения.**

Ранее были проведены исследования по ранозаживляющему действию гидролизата эмбрионов птиц. Крысам наносилась линейная рана кожи длиной 1 см и глубиной 2 мм. После чего в нее помещался гель с гидролизатами. После заживления раны проводилось гистологическое исследование образцов кожи [6]. На рисунке 1 представлены результаты формирования рыхлой соединительной ткани и эпителизации. Микроскопия образцов кожи показала, что у животных полностью заживают дефекты после применения лекарственного средства.

Эффективность ранозаживляющего действия гидролизатов эмбрионов птиц определяется его составом и наличием в нем различных пептидов. В связи с этим исследован состав аминокислот и пептидов гидролизата с использованием аминокислотного анализа (таблица) и масс-спектроскопии на MALDI-TOF. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что в полученных гидролизатах содержится большое количество пептидов с

молекулярными массами от 490 до 3390 Да. Среди них доминируют пептиды с молекулярными массами 491, 602, 701, 862, 1515, 1753 Да и др.



1. Полная эпителизация дефекта; 2. Тонкий слой рубцовой ткани, клеточные соединительнотканые элементы в эпидерме.

Рисунок 1 – Общий план: эпидермис и дерма крыс. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

Таблица – Состав аминокислот и других продуктов гидролиза в гидролизате эмбрионов птиц, мкг/мл, n=10

| Аминокислоты и другие продукты гидролиза | Смешанный гидролизат эмбрионов птиц | Аминокислоты и другие продукты гидролиза | Смешанный гидролизат эмбрионов птиц |
|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------|
| 1  | 2                                   | 3  | 4                                   |
| Asp <sup>1</sup>                         | 739.2±19.4                          | P-Ser                                    | 51.4±1.3                            |
| *Thr                                     | 97.7±2.44                           | Tau                                      | 54.8±1.4                            |
| Ser                                      | 168.4±4.7                           | Urea                                     | 306.0±7.8                           |
| Glu <sup>2</sup>                         | 298.1±7.5                           | a-AAA                                    | 10.8±0.3                            |
| Gly                                      | 57.4±1.6                            | Cit                                      | 6.4±0.2                             |
| Ala                                      | 126.5±3.3                           | a-ABA                                    | 7.3±0.2                             |
| *Val                                     | 123.2±3.2                           | Cystha                                   | 52.5±1.4                            |
| (Cys) <sup>2</sup>                       | 0                                   | H-Cystine                                | 3.1±0.1                             |
| *Met                                     | 73.7±1.9                            | g-ABA                                    | 234.2±5.9                           |
| *Ile                                     | 75.4±1.9                            | lMehis                                   | 119.9±2.9                           |
| *Leu                                     | 431.5±10.8                          | Car                                      | 490.3±12.3                          |
| Tyr                                      | 468.1±12.3                          | Ans                                      | 24.5±0.6                            |
| *Phe                                     | 455.4±11.9                          | Hylys                                    | 1.8±0.1                             |
| His                                      | 254.1±6.8                           | Orn                                      | 21.2±0.6                            |
| *Trp                                     | 5.9±0.1                             | NH <sub>4</sub>                          | 136.3±3.7                           |
| *Lys                                     | 398.1±11.1                          | EOHNH <sub>2</sub>                       | 35.9±0.9                            |
| Arg                                      | 471.4±12.1                          | Hypro                                    | 1632.5±45.3                         |
| Pro                                      | 12.4±0.3                            |  |                                     |

Для дальнейшего использования гидролизата в качестве ранозаживляющего средства была разработана его новая оригинальная лекарственная форма в виде включенных в циклодекстрин продуктов гидролиза. Для получения комплексов включения в циклодекстрин использовался гидролизат эмбрионов птиц «НИКА 2500», который не содержал высокомолекулярные белки и пептиды. Получали комплекс продуктов гидролиза с циклодекстринами, используя метод сорастворения и лиофилизации. Циклодекстрин растворяли в дистиллированной воде при температуре 80°C на водяной бане до полного растворения. Раствор охлаждали до 60°C и при перемешивании вносили гидролизат белков эмбрионов птиц. При этом наблюдалось постепенное помутнение раствора и образование мелкодисперсных частиц комплексов включения. Полученный раствор охлаждали до 5°C и центрифугировали для отделения клатратов. Полученные клатраты лиофильно высушивались и растирались до гомогенного состояния в ступке [1, 2].

Определение аминного азота БАВ гидролизата связанных с циклодекстрином показало, что в состав клатрата включилось не менее 43,7±4,4% исходной субстанции. Термический анализ комплекса включения гидролизатов белков эмбрионов птиц с β-ЦД свидетельствует об его образовании. Для клатрата характерно два максимума тепловыделения при температурах 100,11 - 160,47°C и 212,13 - 260,35°C. При этом происходит сдвиг максимума термического разложения ЦД с 320°C до 295°C. Эти результаты свидетельствуют об образовании комплексов включения [1, 2].

Полученная лекарственная субстанция содержащая продукты гидролиза эмбрионов птиц может быть использована непосредственно для заживления ран или включена в нановолокна 3D-скафолдов.

Методом электроформования на основе пуллулана изготовили ранозаживляющие 3D-скафолды (рисунок 2 А); композитные 3D-скафолды пуллулана с включением в структуру бета-циклодекстрина (рисунок 2 Б) и пуллулана с включением в структуру формирующихся нановолокон клатратных комплексов циклодекстрина с гидролизатами куриных эмбрионов (рисунок 2 В). В качестве рабочих растворов использовали 20% раствор пуллулана в деионизированной воде, а также раствор 20% пуллулана с добавлением бета циклодекстрина в соотношении 3:1 и раствор 20% пуллулана с добавлением комплекса включения бета циклодекстрина с гидролизатом эмбрионов птиц в соотношении 3:1. Время экспонирования в электрическом поле каждого раствора – 0,5 ч. Нанесение нановолокон проводилось на алюминиевую фольгу толщиной 9 мкм (ТУ У 74.8-21509860-001-2002), закрепленную на коллекторе. На рисунке 2 представлены высококонтрастные фотографии поверхности полученных 3D-скафолдов.

Полученные результаты показывают, что добавление к раствору пуллулана бета циклодекстрина приводит к формированию гетерогенных структур с ярко выраженными включениями крупных кристаллов

циклических олигосахаридов (рисунок 1 Б), в то время как при электроформовании нативного раствора пуллулана образуется однородная структура без видимых гетерогенных образований (рисунок 2 А).



А. 3D-скафолды из пуллулана;

Б. Композитные 3D-скафолды пуллулан:β-циклодекстрин в соотношении 3:1;

В. Композитные 3D-скафолды пуллулан:клатрат β-циклодекстрин-гидролизат куриных эмбрионов в соотношении 3:1.

Рисунок 2 – Фотографии 3D-скафолдов на основе пуллулана, полученных методом электроспиннинга.

При электроформовании раствора пуллулана с добавлением комплексов включения бета-циклодекстрин: гидролизат куриных эмбрионов, наблюдается более однородная поверхность формирующихся 3D-скафолдов, что объясняется включением в структуру нановолокон пуллулана кристаллов комплексов включения, обладающих иной пространственной геометрией и более мелкими размерами, по сравнению с кристаллами бета-циклодекстрина.

Таким образом, был исследован состав и физико-химические свойства гидролизата эмбрионов птиц. Показана его высокая эффективность в заживлении ран. Для практического использования полученного гидролизата разработана оригинальная лекарственная форма в виде порошка клатрата циклодекстрина с включенными в него продуктами гидролизата эмбрионов кур. Этот клатрат использовался при создании композиционного раневого покрытия на основе 3D-скафолдов из пуллулана.

### Список литературы

1 Капустин, М.А. Клатратные комплексы бета-циклодекстрина с синтетическими простаноидами / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, В.С. Радевич, В.П. Курченко, Ф.С. Пашковский, Ф.А. Лахвич // Биомика. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 1-5.

2 Капустин, М.А. Методы получения нанок комплексов биологически активных веществ с циклическими олигосахаридами, анализ их физико-химических свойств и использование в пищевом производстве / М.А. Капустин, А.С. Чубарова, Т.Н. Головач, В.Г. Цыганков, В.П. Курченко // Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т. 11, ч. 1. – С. 73-100.

- 3 Макаренко, М.В. Гидрогели взаимопроникающих полимерных сетей для биомедицинского применения / М.В. Макаренко, В.П. Курченко, С.А. Усанов//Белорусские лекарства: сб. материалов Междунар. науч. конф., г. Минск, 17–18 ноября 2016 г.– Минск, 2016.– С. 136–140.
- 4 Макаренко, М.В. Современные подходы к разработке раневых покрытий / М.В. Макаренко, В.П. Курченко, С.А. Усанов // Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т. 11, ч. 1. – С. 273-279.
- 5 Патент № 2560845 РФ. Способ приготовления низкомолекулярного комплекса активированного эмбрионального (НИКА-ЭМ) / Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, В.Н. Вакулин, Г.Н. Блажнова. - опубл. 20.08.2015.
- 6 Ржепаковский, И.В. Отработка технологии получения пептидсодержащей субстанции на основе эмбриональных тканей птиц / И.В. Ржепаковский, С.С. Аванесян, Л.Д. Тимченко // Современные достижения биотехнологии. Новации пищевой и перерабатывающей промышленности: Матер. VI Междунар. научно-практ. конф. – Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2016. – С. 314-315.
- 7 Скрыбина, К.Г. Хитозан / под.ред. К.Г. Скрыбина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. – М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. – 593 с.
- 8 Тимченко, Л.Д. Новые ветеринарные препараты на основе эмбриональных тканей птиц: монография / Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, Д.А. Арешидзе., С.И. Писков, М.Н. Сизоненко. – Ставрополь, 2016. – 128 с.

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ  
РАЗДЕЛЕНИЯ МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ ПОЛИСАХАРИДАМИ  
В ЗАМКНУТОМ ЦИКЛЕ ПРОИЗВОДСТВА  
ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ**

Трухачёв В.И. <sup>1</sup>, Молочников В.В. <sup>1</sup>, Орлова Т.А. <sup>2</sup>, Храмцов А.Г. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ставропольский государственный аграрный университет, г. Ставрополь

<sup>2</sup> Ставропольский институт кооперации (филиал) БУКЭП, г. Ставрополь

<sup>3</sup> Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

orlovanutrition@yandex.ru

*Биотехнология переработки молока с применением полисахаридов предусматривает подготовку раствора пектина – «жидкой биомембраны»; получение концентрата натурального казеина (КНК) и сывороточно-полисахаридной фракции (СПФ), имеющих высокие медико-биологические характеристики; их использование в производстве функциональных молочных продуктов нового поколения по технологии «Био-тон» в замкнутом технологическом цикле.*

Создание ресурсосберегающих технологических процессов, обеспечивающих рациональное использование молочного и растительного сырья в составе молочных продуктов, может быть обеспечено на основе разделения молочного сырья полисахаридами. В результате разделения

молока на фракции и их смешения с различными видами молочного сырья получают готовые продукты в замкнутом технологическом цикле [2, 9]. Жидкостная структура получаемых фракций, гомогенность их смесей обеспечивают образование требуемой структуры готового продукта на заключительной стадии производства при полном использовании компонентов исходного сырья [2, 10].

В последнее время развивается новое направление в индустрии продуктов питания – пищевые нанотехнологии. На основе принципов бионанотехнологии возможно создание нового поколения функциональных молочных продуктов повышенного качества, безопасных и полученных на базе комплексных инновационных методов. Белковые компоненты молока и полисахариды, имеющие признаки наночастиц, представляют собой природные наноматериалы [1, 13, 14].

Разделение молочного сырья полисахаридами предусматривает смешивание молочного сырья с раствором полисахарида, представляющего собой «жидкую биомембрану» и получение в результате разделения смеси двух фракций – концентрата натурального казеина (КНК) и сывороточно-полисахаридной фракции (СПФ) [5, 7, 12].

Важной характеристикой полисахаридов для разделения молочного сырья является их взаимодействие с растворителем и ионогенными компонентами раствора [5, 11].

Качество раствора пектина – «жидкая биомембрана», определяется комплексом гидродинамических, физико-химических и технологических показателей. Биотехнология приготовления раствора пектина («жидкой биомембраны») заключается в подготовке компонентов – воды и пектина. Второй уровень процесса – набухание, заключается в том, что молекулы воды проникают в поверхностные слои погруженного в нее полисахарида и разрыхляют его, при этом объем полисахарида увеличивается. На заключительном этапе по мере набухания расстояние между структурными участками макромолекул увеличивается настолько, что отдельные макромолекулы начинают разъединяться и переходить в раствор, а молекулы полисахарида равномерно распределяются по всему объему системы, образуя гомогенный раствор, или в зависимости от условий трехмерную пространственную структуру. Концентрацию ионогенных компонентов в растворе оценивали по величине удельной электропроводности, определяемой переменноточковой кондуктометрией [11, 12].

Раствор пектина «жидкая биомембрана» – условная фазовая поверхность раствора биополимера-разделителя и комплексообразователя, или фактор, дестабилизирующий определенную белковую фракцию или набор фракций с их выделением в состоянии, близком к нативному, как и при использовании молекулярно-ситовой фильтрации. Процесс характеризуется более высоким осмотическим давлением, химическим и электрическим

потенциалами, чем аналогичный показатель белкового раствора. При этом перенос растворителя и ионов происходит в фазу «жидкой мембраны» до установления динамического равновесия.

Для выработки функциональных молочных продуктов используют молоко коровье цельное, обезжиренное, отвечающее по качеству соответствующему ГОСТу, охлажденное до температуры 2-10 °С. Для фракционирования молочного сырья используют высокоэтерифицированный пектин [8]. Проявляемая пектином разделяющая способность в основном зависит от степени их этерификации, а именно, пектины со степенью этерификации 70 % и выше обладают способностью фракционировать молочное сырье. Для приготовления раствора пектина используется вода питьевая пастеризованная.

К обезжиренному молоку добавляют при перемешивании 10% раствор пектина – «жидкая биомембрана» (6-6,5%), приготовленного заранее и хорошо набухшего. Концентрат натурального казеина (КНК) – концентрированный раствор казеин-кальций фосфатного комплекса, содержат 17-20% сухих веществ, из которых 65-70% молочные белки, в основном, казеины (до 96-97%). Объем этой фракции составляет 15-16% от общего объема.

Сывороточно-полисахаридная фракция (СПФ) составляет 84-85% от общего объема, содержит всю водорастворимую часть молока и пектин. Исследования показали, что пектин присутствует в сывороточно-полисахаридной фазы в виде комплекса с сывороточными белками.

Верхнюю фракцию (СПФ) в натуральном или сгущенном виде используют для обогащения молока и молочных продуктов, а так же для выработки различных структурированных продуктов [6, 7].

Нижняя фракция (КНК) – готовое сырье для производства биологически-активных белковых или белково-жировых продуктов и концентратов. Их производят без отделения сыворотки путем сквашивания соответствующими заквасками. С использованием КНК разработана по технологии (Био-Тон) серия молочных и кисломолочных напитков, которые можно классифицировать по жирности, по применяемым для их получения закваскам, по массовой доле сухих веществ и белка. Использование КНК позволяет повысить содержание белковой фракции в продукте, снизить его калорийность при этом получить продукты плотной пластичной консистенции, по свойствам аналогичным жирным [7, 9, 10].

Продукты, полученные на основе фракционирования молочного сырья пектином, отличаются от традиционных продуктов по медико-биологическим характеристикам. КНК, СПФ и продукты с их использованием способствуют адаптации организма к интенсивным умственным, физическим и эмоциональным нагрузкам в процессе профессиональной деятельности, повышают устойчивость организма к

вредным воздействиям окружающей среды (в т.ч. при загрязнении радионуклидами), повышают общую резистентность организма [9, 10].

По технологии «Био-Тон» производят заданный ассортимент продуктов, при этом все перерабатываемое молоко полностью перераспределяется по вырабатываемой продукции [2, 4, 6, 10]. При этом количество сывороточной фракции в ней возрастает на 25- 30% от веса продуктов. Данное изменение состава продуктов обеспечивает их лечебно-профилактическое действие. Потребление таких продуктов уменьшало отрицательное влияние на человека временных физических и эмоциональных перегрузок и других отрицательных факторов, например, электромагнитных и радиационных излучений.

Ассортимент продукции определяет необходимое сочетание промежуточных продуктов и их количество, которые взаимно увязаны. При разработке технологии производства молочных продуктов в замкнутом цикле был соблюден принцип – масса выпускаемой продукции должна соответствовать количеству исходного сырья, за исключением незначительных технологических потерь. При производстве молочных продуктов СПФ и КНК, выделенные из обезжиренного молока, включают в состав молочных продуктов [4, 6]. В ассортименте вырабатываемых молочных продуктов представлены молочные напитки различных видов, кисломолочные продукты, творог и творожные изделия, и ряд структурированных продуктов [3, 6, 7]. На производство продуктов имеется техническая документация [8].

Биотехнология переработки молочного сырья «Био-Тон» предполагает комплексную переработку молока с определенным ассортиментом продуктов в замкнутом технологическом цикле, обладающих научно доказанным и практически подтвержденным лечебным и оздоровительным действием на организм человека.

Переработка молока с включением всех компонентов молока в состав продуктов (в виде сывороточно-полисахаридной фракции) позволяет повысить эффективность их производства за счёт рационального использования сырья, а также его экологичность.

Сывороточно-полисахаридная фракция, концентрат натурального казеина и содержащие данные компоненты продукты обладают выраженным лечебным и профилактическим действием на организм человека и животного.

Поэтому продукты, произведенные по технологии «Био-Тон» следует рассматривать как алиментарные средства, обладающие адаптогенным и иммуномодулирующим действием.

В заключение необходимо отметить, что биотехнология разделения молочного сырья полисахаридами предлагает комплексное производство продуктов в замкнутом технологическом цикле, обладающих научно доказанными и подтвержденными на практике лечебным и

профилактическим действиями на организм человека. Эффективность переработки молока при этом возрастает за счет увеличения выработки продукции из единицы сырья, снижения затрат на производство.

### **Список литературы:**

1. Лодыгин, А. Д. Инновационные технологии продуктов на основе биокластеров молочной сыворотки: учебное пособие / А.Д. Лодыгин, А.Г. Храмцов, Д.Н. Лодыгин и др. – Ставрополь: СевКавГТУ, 2010. – 143 с.
2. Молочников, В.В. Основные принципы производства молочных продуктов нового поколения / В.В. Молочников, Т.А. Орлова / Переработка молока. – 2008. – № 11. – С. 52-54.
3. Молочников, В. В. Переработка молочного сырья с применением полисахаридов по технологии «Био-Тон» / В.В. Молочников, Т.А. Орлова, О.А. Суюнчев // Пищевая промышленность. – 1996. – № 5. – С. 34–35.
4. Молочников, В. В. Современные направления в производстве новых видов молочных продуктов: обзорная информация / В.В. Молочников, Т.А. Орлова, С.В. Анисимов: АгроНИИТЭИММП. – М, 1987. – 39 с.
5. Орлова, Т.А. Технологические принципы производства функциональных молочных продуктов с применением полисахаридов / дис.... докт. техн. наук: 05.18.04 // Орлова Татьяна Александровна. – Ставрополь: Северо-Кавказский государственный технический университет, 2010. – 362 с.
6. Орлова, Т.А. Структурированные продукты на основе КСП / Т.А. Орлова // Материалы 2-ой Всероссийской научно-практической конференции. «Современные достижения биотехнологии». – Ставрополь, 2002, Т. 2. – С. 49–51.
7. Продукты молочные «БИО-ТОН» Технические условия ТУ 9222-035-07532800-97. Без ограничения срока действия
8. Трухачев, В.И. Концентраты белков молока: получение и применение / В. И. Трухачев, В.В. Молочников, Т.А. Орлова. – Ставрополь: АГРУС, 2009. – 152 с.
9. Трухачев, В.И. Теория и практика безотходной переработки молока в замкнутом технологическом цикле / В.И. Трухачев, В.В. Молочников, Т.А. Орлова и др. – Ставрополь, АГРУС, 2012. – 360 с.
10. Трухачёв, В.И. Основополагающие принципы высокоэффективного производства функциональных молочных продуктов / В.И. Трухачев, В.В. Молочников, Т.А. Орлова, А.Г. Храмцов, // Вестник АПК Ставрополья, 2016. – № 3. – С. 52-56.
11. Храмцов, А.А. Теоретическое и экспериментальное обоснование биомембранной технологии молочного полисахаридного концентрата / Дисс..... д-ра техн. наук: 05.18.04 / Храмцов Андрей Андреевич. – М.: Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности, 1999. – 405 с.

12. Храмцов, А.А. Научно-технические основы биомембранной технологии молочных продуктов // Известия вузов. Пищевая технология. – №2-3. – 1999. – С.42-45.
13. Храмцов, А.Г. Биомембранные технологии научной школы «ЖИВЫЕ СИСТЕМЫ» СКФУ. Учебное пособие /А.Г. Храмцов И. А. Евдокимов, С.А. Емельянов, С.А. Рябцева, А.Д. Лодыгин, Р.О. Будкевич // Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2014. – 126 с.
14. Храмцов, А.Г. Доктрина инновационных технологий молочных продуктов – возможности реализации / А.Г. Храмцов // Молочная промышленность. – 2008. – № 4. – С. 64. – 67.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЭКСТРАКЦИЮ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Халанская Д.М.<sup>1</sup>, Лодыгин А.Д.<sup>1</sup>, Курченко В.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Северо-Кавказский Федеральный университет, г. Ставрополь

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет, г. Минск  
allodygin@yandex.ru

*В статье обоснована актуальность получения экстрактов биологически активных веществ растительного сырья и их применения в технологии молочных продуктов функционального назначения. Представлены результаты исследований процесса экстракции биологически активных веществ алоэ, боярышника и солодки с применением нетрадиционных экстрагентов (молочная сыворотка, пермеат обезжиренного молока).*

Интерес к исследованию биологически активных веществ растительного происхождения в последнее время особенно возрос в связи с большим распространением производства биологически активных добавок к пище. Растения издавна используются как для лечения, так и для профилактики многих заболеваний, в том числе таких широко распространенных, как сердечно-сосудистые нарушения, желудочно-кишечные, нервные, кожные и другие болезни различного происхождения. Популярность использования растительного сырья в кисломолочных продуктах заключается в широком спектре биологически активных веществ входящих в их состав [2].

На процесс экстракции оказывают влияние множество различных факторов. Сложный характер межфакторного взаимодействия не позволяет установить общий для всех случаев экстрагирования принцип интенсификации этого процесса [3, 4].

Нами было изучено влияние на процесс экстрагирования витамина С и антиоксидантных веществ следующих технологических факторов: температура и соотношение сырья и экстрагента.

При выборе технологических параметров процесса экстракции биологически активных веществ необходимо учитывать следующие факторы:

- аскорбиновая кислота окисляется в присутствии кислорода. Скорость деградации витамина С и флавоноидов возрастает с повышением температуры (разрушаются при температуре выше 60 °С), при увеличении рН раствора, под действием УФ – лучей, в присутствии солей тяжелых металлов [5];

- в процессе экстракции разность концентраций извлекаемого вещества и жидкой и твердой фазы постепенно уменьшается в результате чего в определенный момент времени наступает динамическое равновесие процесса и дальнейшее проведение процесса не целесообразно;

- при увеличении соотношения расхода масс экстрагента и экстрагируемого вещества возрастает скорость экстрагирования, однако удорожаются и осложняются последующие процессы выделения целевого компонента [1].

Для проведения экспериментов на начальном этапе исследований были выбраны следующие параметры процесса экстрагирования: температура 40 – 60 °С, продолжительность экстрагирования – 30 мин., соотношение сырья и экстрагента в трех разных соотношениях:

- 1:2 50 г на 100 мл экстрагента;
- 1:4 25 г на 100 мл экстрагента;
- 1:6 12,5 г на 100 мл экстрагента.

В качестве экстрагента использовали сыворотку подсырную – в дальнейшем как контрольный образец для сравнения, дистиллированную воду и пермеат обезжиренного молока. Характеристика подсырной сыворотки, применяемой для получения экстрактов приведена в таблице 1. Таблица 1 – Характеристика подсырной сыворотки, применяемой для получения образцов экстрактов

| Сухие вещества, % | Ph        | Титруемая Кислотность, °Т | Точка замерзания |
|-------------------|-----------|---------------------------|------------------|
| 5,6-5,7           | 5,85±0,05 | 85±2,0                    | -0,712±0,002     |

Предварительно высушенное и измельченное растительное сырье, смешивали в соотношениях 1:2, 1:4, 1:6, заливали экстрагентами и выдерживали при постоянной температуре 30 мин. Результаты представлены в таблице 2. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что точка замерзания экстрактов обусловлена концентрацией составных частей. При понижении точки замерзания низкомолекулярные вещества в экстракт переходят наиболее полно. Для экстракта алое и солодки выявлена прямая зависимость точки замерзания от соотношения растительного сырья и

экстрагентов (понижением концентрации растительного сырья точка замерзания увеличивается), для экстракта боярышника - обратная.

Таблица 2 – Точка замерзания в экстрактах

| Соотношение сырья и экстрагента | Растительное сырье | Экстрагент |                       |         |
|---------------------------------|--------------------|------------|-----------------------|---------|
|                                 |                    | Сыворотка  | Дистиллированная вода | Пермеат |
| 1:2                             | Алое               | -0,518     | -0,488                | -0,361  |
| 1:4                             | Алое               | -0,619     | -0,476                | -0,472  |
| 1:6                             | Алое               | -0,627     | -0,465                | -0,405  |
| 1:2                             | Боярышник          | -1,938     | -1,457                | -1,745  |
| 1:4                             | Боярышник          | -1,065     | -1,321                | -1,651  |
| 1:6                             | Боярышник          | -0,886     | -0,962                | -1,649  |
| 1:2                             | Солодка            | -0,498     | -0,367                | 0,353   |
| 1:4                             | Солодка            | -0,499     | -0,354                | -0,378  |
| 1:6                             | Солодка            | -0,501     | -0,341                | -0,384  |

Наибольшее выделение веществ наблюдается при соотношении 1:2. Результаты измерения рН экстрактов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – рН экстрактов при различных соотношениях фаз

| Соотношение сырья и экстрагента | Растительное сырье | Экстрагент |                       |         |
|---------------------------------|--------------------|------------|-----------------------|---------|
|                                 |                    | Сыворотка  | Дистиллированная вода | Пермеат |
| 1:2                             | Алое               | 9,1        | 8,8                   | 9,531   |
| 1:4                             | Алое               | 9,07       | 8,7                   | 9,530   |
| 1:6                             | Алое               | 9,03       | 8,6                   | 9,529   |
| 1:2                             | Боярышник          | 9,45       | 8,7                   | 9,61    |
| 1:4                             | Боярышник          | 9,44       | 8,68                  | 9,60    |
| 1:6                             | Боярышник          | 9,43       | 8,63                  | 9,59    |
| 1:2                             | Солодка            | 6,58       | 6,56                  | 6,73    |
| 1:4                             | Солодка            | 6,27       | 6,54                  | 6,51    |
| 1:6                             | Солодка            | 6,08       | 6,53                  | 6,67    |

По данным таблицы 3 можно сделать вывод о том, что все полученные экстракты дают смещение рН в сторону щелочной реакции среды. Преположительно, экстрагент с кислой реакцией среды способствует переводу трудно растворимых соединений в легко растворимые. Анализ таблицы свидетельствует о том, что в экстрактах, полученных на основе подсырной сыворотки и пермеата молочной сыворотки экстракция протекает лучше (при меньших концентрациях - большее смещение фаз), что обусловлено химическим составом экстрагентов.

Биологическая ценность экстрактов из растительного сырья обусловлена их уникальным составом и свойствами. Флавоноиды, входящие в их состав, оказывают противовоспалительное, антиаллергическое, противовирусное и противоопухолевое свойства, предотвращают преждевременное старение организма. Полисахариды являются одним из основных источников энергии,

образующейся в результате обмена веществ организма. Они принимают участие в иммунных процессах, обеспечивают сцепление клеток в тканях, являются основной массой органического вещества в биосфере. Органические кислоты растворяют в организме солевые отложения, задерживают развитие бактерий, оказывают благоприятное действие на кислотно-щелочное равновесие, на работу желудочно-кишечного тракта, улучшают аппетит, стимулируют выделение желчи, пищеварительных соков, подавляют гнилостные процессы в пищеварительном тракте, активируют обмен веществ. Также в состав экстрактов входят: минеральные вещества, микро и макроэлементы, каротиноиды, дубильные вещества, катехины, и т.д.

Разработка технологии получения экстрактов растительного сырья на основе молочной сыворотки является перспективным направлением, поскольку сочетание молочнокислой микрофлоры и биоактивных веществ экстрактов позволит объединить их ценные свойства. Применение сыворотки и её ультрафильтрата в качестве экстрагента позволяет значительно расширить гамму функциональных продуктов [3].

#### **Список литературы:**

1. Герасимова, Т. В. Разработка технологии кисломолочных напитков с использованием растительных экстрактов, обогащенных биологически активными веществами: диссертация кандидата технических наук / Герасимова Татьяна Владимировна, Северо-Кавказ. гос. тех. университет, Ставрополь, 2012. – С. 51-54.
2. Максютин, Н. П. Методы выделения и исследования флавоноидных соединений / Н. П. Максютин, В. П. Литвиненко // Фенольные соединения и их биологические функции. – М., 1968. – С. 7.
3. Решетник, Е. И. Исследование влияния растительных компонентов на функциональные свойства сывороточно-растительного продукта / Е. И. Решетник, Е. Ю. Водолагина, В. А. Максимюк // Техника и технология пищевых производств. – 2014. – № 4 – С. 50-56.
4. Соколов, С. Я. Справочник по лекарственным растениям (Фитотерапия) / С. Я. Соколов, И. П. Замотаев. – 2-е издание, стереотипное. – М.: Медицина, 1988. – 464 с.
5. Храмцов, А. Г. Технология продуктов из молочной сыворотки: учебное пособие / А. Г. Храмцов, П. Г. Нестеренко. – М. : ДеЛи принт, 2004. – 587 с.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ  
МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ, ЕЁ КОМПОНЕНТОВ И  
ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ  
КОСМЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ПРИМЕРЕ ШАМПУНЕЙ

Чикатуева М.А., Абакумова Е. А.

Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь  
abacumoff@yandex.ru

*В статье поставлена задача, рассмотреть состав шампуней на основе вторичного молочного сырья и изучить аминокислотный состав подсырной сыворотки, как основы для их производства. В результате анализа сделан вывод о целесообразности создания шампуня на основе вторичного молочного сырья, оказывающего полезное воздействие на структуру волоса.*

Косметические средства для кожи – это специально разработанные химические препараты, которые применяют с целью очищения, защиты кожи от неблагоприятного влияния факторов внешней среды и для поддержания ее в хорошем состоянии.

Все косметические изделия представляют собой сложную, многокомпонентную систему, в состав которой входят жировые, структурообразующие, поверхностно – активные вещества, эмульгаторы, наполнители, красители, специальные добавки (антимикробные, фотозащитные, антиоксиданты и др.), биологически активные вещества (витамины, экстракты трав, коллагены), отдушки.

Шампунь – одно из главных и самых распространенных средств по уходу за волосами. Слово является опосредованным англоязычным заимствованием из хинди, как «чампа» – название цветка растущего в Индии, из которого делается масло для втирания в волосы (отсюда англ. *shampoo* – «массировать»)[1].

Шампунь представляет собой смесь нескольких веществ. Компонент, содержащийся в наибольшем количестве – вода, затем следуют поверхностно-активные вещества (ПАВ). Также используются в составе консерванты, ароматизаторы, неорганические соли – хлорид натрия или другие, для поддержания желаемой вязкости. В состав современных шампуней часто входят природные масла, витамины или другие компоненты, которые, по утверждению производителей, способствуют укреплению волос или представляют какую-либо пользу для потребителей [2].

Доклад подготовлен по рекомендации академика РАН, профессора-консультанта А.Г. Храмова

В состав шампуня, созданного на основе вторичного сырья, входят следующие компоненты:

- Подсырная сыворотка – главный компонент шампуня. Подсырная сыворотка является ценным пищевым сырьем, включающее все компоненты

молока. В подсырную сыворотку переходит около 50 % сухих веществ молока, в том числе (88 – 94) % молочного сахара, (20 – 25) % белковых веществ, (61 – 62) % молочного жира, (59 – 65) % минеральных веществ [3].

- Сусло – водный раствор водорастворимых сухих веществ, извлеченного сырья, применяемого для получения пива.

- $\beta$  – галактозидаза – фермент, катализирующий расщепление лактозы на глюкозу и галактозу.  $\beta$  – галактозидаза относится к группе адаптивных ферментов, то есть его синтез не происходит при отсутствии субстрата (лактозы) во внешней среде [4].

- Панкреатин – пищеварительное ферментное средство, представляющее собой экстракт содержимого поджелудочной железы. Входящие в его состав панкреатические ферменты – амилаза, липаза, протеаза – участвуют в переваривании углеводов, жиров и белков [5].

- Пивные дрожжи являются превосходным натуральным белково – витаминным продуктом, который назначают в целях лечения и профилактики многих заболеваний кожи и органов пищеварения, а также для восполнения недостатка полезных веществ.

- Мыльная основа для шампуня изготовлена из растительных компонентов. Содержит злаковые протеины ржи, овса, пшеницы, D – пантенол.

- Витамины – питательные вещества, которые нужны организму для нормального функционирования. Вместе с минералами и другими питательными веществами они участвуют в жизненно важных процессах, которые происходят в нашем организме – дыхание, питание, очищение и регенерация тканей организма.

В шампуне, созданного на основе переработки молочного сырья содержатся витамины группы B, отвечающие за рост волос, их блеск и толщину. Именно из – за нехватки этих витаминов рост волос может значительно замедлиться, а сами волосы потускнеть и сделаться ломкими [6].

- Репейное масло получают из корней лопуха, только в отличие от многих других масел растительного происхождения, которые непосредственно отжимаются из определенных частей растений, семян, плодов или косточек, оно получается методом масляной экстракции – корни лопуха настаивают на оливковом, миндальном, арахисовом, кунжутном или другом жирном растительном масле.

Эксперимент по сравнительной оценке аминокислотного состава подсырной сыворотки и основы для шампуня.

Ниже (рисеурб 1 и 2; таблбws 1 и 2) приведены хроматограммы образцов и количественные характеристики отдельных аминокислот в пробе.

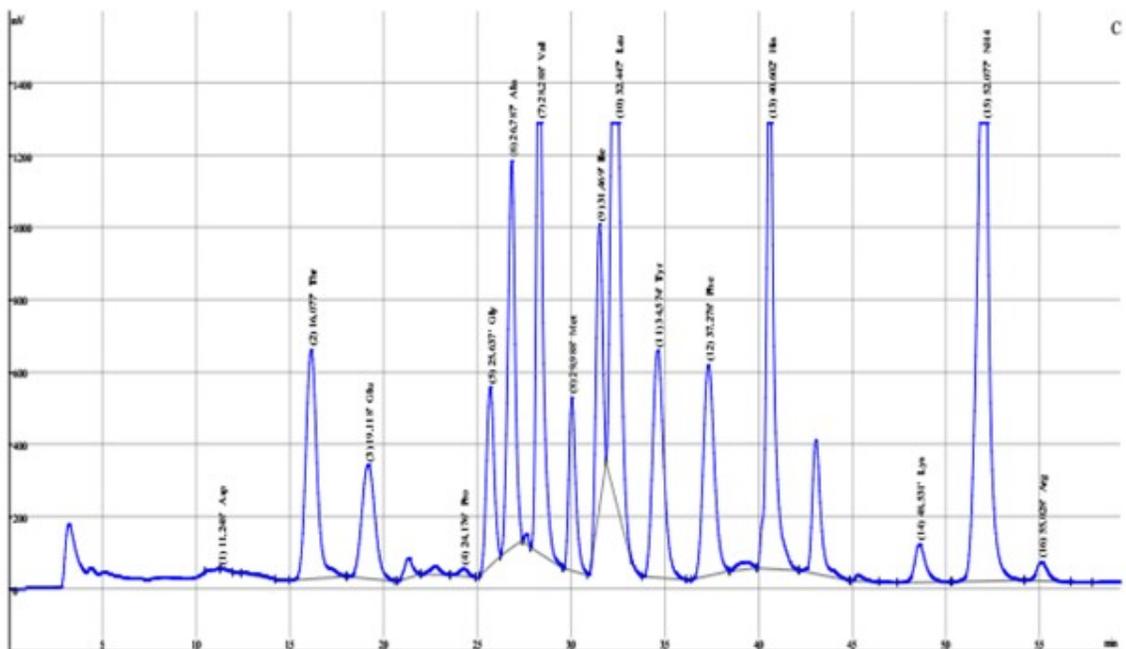


Рисунок 1 – Аминокислотный анализ подсырной сыворотки

Таблица 1 – Результаты содержания аминокислот в подсырной сыворотке

| Номер            | Время выхода | Название                    | нмоль      | результат нг/мл |
|------------------|--------------|-----------------------------|------------|-----------------|
| 1                | 11.248       | Аспарагиновая кислота (ASP) | 1.32       | 175.639         |
| 2                | 16.077       | Треонин (Thr)               | 718.8      | 85605.081       |
| 1                | 2            | 3                           | 4          | 5               |
| 3                | 17.417       | Серин (Ser)                 | 0          | 0.000           |
| 4                | 19.118       | Глутаминовая кислота (Glu)  | 348.5      | 51268.972       |
| 5                | 24.176       | Пролин (Pro)                | 612.1      | 70454.444       |
| 6                | 25.637       | Глицин (Gly)                | 283.8      | 21313.567       |
| 7                | 26.787       | Аланин (Ala)                | 1072       | 95471.106       |
| 8                | 28.288       | Валин (Val)                 | 565.3      | 66247.325       |
| 9                | 29.988       | Метионин (Met)              | 269.4      | 40196.113       |
| 10               | 31.469       | Изолейцин (Ile)             | 819        | 107450.900      |
| 11               | 32.477       | Лейцин (Leu)                | 1292       | 169555.275      |
| 12               | 34.574       | Тирозин (Tyr)               | 503.9      | 91308.500       |
| 13               | 37.278       | Фенилаланин (Phe)           | 449        | 74182.269       |
| 14               | 40.602       | Гистидин (His)              | 675.2      | 104783.794      |
| 15               | 48.531       | Лизин (Lys)                 | 92.63      | 13542.844       |
| 16               | 52.077       | NH4                         | 3623       | 61586.063       |
| 17               | 55.028       | Аргинин (Arg)               | 44.76      | 7798.044        |
| Общее количество |              |                             | 1.137e+004 | 1.061e+006      |

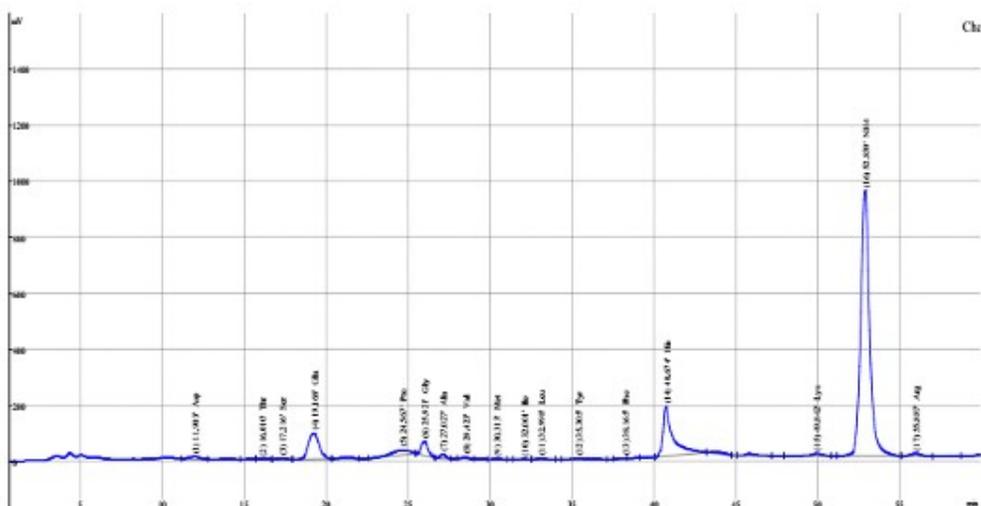


Рисунок 2 – Аминокислотный анализ основы для шампуня

Таблица 2 – Результаты содержания аминокислот в основе для шампуня

| Номер            | Время выхода | Название                    | нмоль  | результат нг/мл |
|------------------|--------------|-----------------------------|--------|-----------------|
| 1                | 2            | 3                           | 4      | 5               |
| 1                | 11.903       | Аспарагиновая кислота (ASP) | 12.36  | 1645.336        |
| 2                | 16.010       | Треонин (Thr)               | 0.8941 | 106.488         |
| 3                | 17.216       | Серин (Ser)                 | 5.837  | 613.435         |
| 4                | 19.168       | Глутаминовая кислота (Glu)  | 141.6  | 20828.975       |
| 5                | 24.567       | Пролин (Pro)                | 1830   | 210599.075      |
| 6                | 25.921       | Глицин (Gly)                | 42.95  | 3225.609        |
| 7                | 27.027       | Аланин (Ala)                | 19.21  | 1711.870        |
| 8                | 28.423       | Валин (Val)                 | 3.421  | 400.911         |
| 9                | 30.313       | Метионин (Met)              | 1.501  | 223.914         |
| 10               | 32.001       | Изолейцин (Ile)             | 2.371  | 311.043         |
| 11               | 32.998       | Лейцин (Leu)                | 5.941  | 779.421         |
| 12               | 35.305       | Тирозин (Tyr)               | 8.092  | 1466.269        |
| 13               | 38.165       | Фенилаланин (Phe)           | 1.223  | 202.040         |
| 14               | 40.674       | Гистидин (His)              | 187.3  | 29064.291       |
| 15               | 49.842       | Лизин (Lys)                 | 12.5   | 1826.772        |
| 16               | 52.839       | NH <sub>4</sub>             | 2501   | 42513.969       |
| 17               | 55.887       | Аргинин (Arg)               | 13.93  | 2427.327        |
| Общее количество |              |                             | 4790   | 3.179e+005      |

После проведения исследования сделал вывод, что общее количество аминокислот в готовой жидкой основе больше чем в разведенной подсырной сыворотке. Данный рост произошел за счет аспарагиновой кислоты, серина и пролина.

На рост волос оказывают влияние следующие аминокислоты: пролин – глубоко восстанавливает кожу головы, а также активизирует обмен веществ; метионин – является незаменимой аминокислотой, которая спасает от преждевременного выпадения волос, также улучшает текстуру волоса, качество и рост; лизин – способствует росту волос, играет большую роль в функции многих белков и является незаменимой аминокислотой против выпадения волос, необходимой для роста в целом. Лизин не вырабатывается в организме. Как незаменимая аминокислота, лизин должен быть потреблен дополнительно; аргинин – стимулирует выделение гормонов роста и имеет важное значение для метаболических процессов.

Общее количество аминокислот способствующих росту волос в основе для шампуня возросло за счет пролина, остальных аминокислот стало меньше.

При разработке нового шампуня нами были рассмотрены состав, физико–химические, органолептические и токсикологические свойства шампуня, а также установлены основные требования, предъявляемые к средствам по уходу за волосами.

В ходе выполнения экспериментов было определено допустимое количество молочных протеинов в составе шампуня, установлено рН и определена пенообразующая способность.

Таким образом, новые косметические продукты, в состав которых входят компоненты молочного и растительного сырья являются не только натуральными, но и оказывают полезное воздействие на структуру волоса.

### **Список литературы:**

1. Вайнштейн, А. Уход за кожей и волосами / А. Вайнштейн – Львов : Книжно – журнальное издательство. 1960. – 4 с.
2. Соколова, З. С. Технология сыра и продуктов переработки сыворотки / З. С. Соколова, Л. И. Лакомова , В. Г. Тиняков.– М. : «Агропромиздат» – 1992. – 335 с.
3. Храмцов, А. Г. Рациональная переработка молочной сыворотки. Молочная промышленность. / А. Г. Храмцов, П. Г. Нестеренко: Производственно-практическое издание – М. : – 1996.
4. Арефьев, В. А., Лисовенко В. А. Англо – русский толковый словарь генетических терминов./ В. А. Арефьев, В. А. Лисовенко – Волгоград: – 2000. – 22 с.
5. Саблин, О. А. Ферментные препараты. / О. А. Саблин, Е.В. Бутейко. – СПб: – 2004. – т. 6.
6. Морозкина, Т. С. Витамины: Краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармацевтических и биологических специальностей [Текст] / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсёнок. – М.: ООО «Асар». – 2002 – 112с.

## ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Элькаиб Х. М., Леонтьев В. Н.

Белорусский государственный технологический университет,

Минск, Республика Беларусь

e-mail: хусам83@mail.ru, leontiev@belstu.by

В статье представлены результаты скрининга образцов молока, говяжьего фарша, рыбы, куриных грудок и крыльев, огурцов, турецкого гороха, фасоли, томатов, винограда, подвергшихся микробиологической порче. Исследованы 44 изолята бактерий рода *Pseudomonas*, идентификацию которых проводили по определителю бактерий Берджи.

### Введение

Нарушение целостности клеток пищевых продуктов приводит к активации гидролитических ферментов, которые катализируют расщепление углеводов, белков, липидов. Это ведет к их разрушению с последующей микробной контаминацией. Основной является именно микробиологическая порча [1], она наиболее опасная для человека из-за выделяющихся токсинов и развития болезнетворной микробиоты [2].

Псевдомонады являются грамотрицательными, условно патогенными бактериями из семейства *Pseudomonadaceae*, способными продуцировать различные флуоресцентные и нефлуоресцентные пигменты и передвигаться с помощью полярных жгутиков [3].

*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fragi* являются наиболее часто встречающимися видами, однако распределение видов в пищевой экосистеме остается относительно малоизученным [4]. Основная микробная популяция у овощных культур в полевых условиях состоит из видов рода *Pseudomonas*, в особенности присутствующие пигменты обладающие флуоресценцией. Культуры бактерий рода *Pseudomonas* иногда утрачивают способность синтезировать пигмент. Например, некоторые бактерии *Pseudomonas aeruginosa* могут временно или совсем утратить пигментацию. Известны и беспигментные штаммы этого вида. Во время хранения и обработки культур их число возрастает, а при минимальной обработке овощей они играют важную роль в процессе потемнения плодов благодаря их пектинолитической активности. Наиболее широко распространенными видами являются *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chicorii* и *Pseudomonas maltophilia*. Рыбные продукты служат хорошим субстратом для размножения бактерий рода *Pseudomonas*, особенно в условиях аэробного хранения во льду. Действительно, бактерии данного рода считаются одними из главных продуцентов летучих соединений, придающих продуктам неприятный запах (альдегидов, кетонов и сложных эфиров) [5]. *Pseudomonas fragi* оказался

наиболее мощным продуцентом неприятного фруктового запаха, появляющегося в результате расщепления аминокислот [6]. Бактерии *Pseudomonas spp.* также играют важную роль в процессе ферментативной порчи молока. Во время хранения сырого молока они производят много термоустойчивых липолитических и протеолитических ферментов, которые приводят к снижению качества и срока годности переработанного молока [7].

Таким образом, учитывая значительный интерес к роду *Pseudomonas* и его доминантную роль в процессах порчи пищевых продуктов, целью данной работы было классифицировать и оценить ферментативную деятельность большого количества штаммов, выделенных из различных продуктов.

### **Материалы и методы исследования**

Материалом для данного исследования являлись некоторые виды овощей (огурцы, томаты, виноград, турецкий горох, фасоль), а также молоко, мясо, домашняя птица, рыба и жабры рыб.

В начале эксперимента, для выявления представителей рода *Pseudomonas* культуры микроорганизмов высевали на плотные питательные среды (ПА с 2 % глицерином, среду Эндо), а затем на дифференциально-диагностические среды (среду Кинга-Б, среду Хью-Лейфсона, цетримидный агар, среду с 0,3 % агаром) [6].

Навеску измельченного исследуемого материала 20 г помещали в коническую колбу емкостью 100 мл, приливали 5 мл стерильного физиологического раствора. Инкубировали при 30°C в течение 3 сут. Из полученной накопительной культуры осуществляли высев на плотную селективную синтетическую питательную среду ММ9 для выделения бактерий рода *Pseudomonas* [6]. В качестве селективных факторов использовали способность микроорганизмов к росту в присутствии триптофана – единственного источника углерода и энергии, а также в присутствии кислорода. Образовавшиеся колонии пересевали на дифференциально-диагностическую среду Блеск для исключения патогенных псевдомонад, которые формировали колонии с металлическим блеском. Непатогенные бактерии рода *Pseudomonas* идентифицировали по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам.

Среду Хью-Лейфсона с глюкозой применяют для определения способности псевдомонад окислять глюкозу до глюконовой кислоты в аэробных условиях [7]. Среду Кинга-Б используют для усиления способности псевдомонад продуцировать сине-зеленый пигмент пиоцианин, ярко-красный – пиорубин и бурый – пиовердин. *Ps. Aeruginosa* образует зеленовато-желтый пигмент – флюоресцеин, флюоресцирующий в проходящем УФ свете [8, 9].

Каталазную активность бактерий наблюдали по образованию пузырьков газа в присутствии перекиси водорода [9]. Морфологические особенности клеток бактерий определяли с помощью общепринятых методов [10]. Отнесение бактерий к роду *Pseudomonas* осуществляли по способности

восстанавливать нитраты и нитриты, а также гидролизовать крахмал [9]. Принадлежность бактерий *Pseudomonas* к видам *fluorescens* и *aeruginosa* определяли по способности роста при оптимальных значениях температуры [12].

Для определения бактерий рода *Pseudomonas* принимали во внимание такие показатели, как рост при температуре 4°C и 41°C. Таким образом, псевдомонады выращивали при температуре 4°C в течение 7-10 дней и при температуре 41°C в течение 24 часов соответственно [13, 14].

### Результаты

В результате скрининга из образцов молока, говяжьего фарша, рыбы (карп, толстолобик и свежемороженая скумбрия), куриных грудок и крыльев, огурцов, турецкого гороха, фасоли, томатов, винограда, подвергшихся порче, были отобраны 44 изолята бактерий рода *Pseudomonas*, идентификацию которых проводили по определителю бактерий Берджи [15].

Характеристика некоторых выделенных штаммов бактерий представлена в таблице.

Таблица – Характеристика некоторых выделенных штаммов бактерий

| Штамм | Отношение к кислороду |       | Пигменты | Окраска по Граму | Форма клеток | Каталаза | Рост |      | Восст. Нитратов, нитритов | Гидролиз крахмала |
|-------|-----------------------|-------|----------|------------------|--------------|----------|------|------|---------------------------|-------------------|
|       | Аэр                   | Анаэр |          |                  |              |          | 4°C  | 41°C |                           |                   |
| 1     | 2                     | 3     | 4        | 5                | 6            | 7        | 8    | 9    | 10                        | 11                |
| Ви-1  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | –    | +    | +                         | –                 |
| Ви-2  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | –    | +    | +                         | –                 |
| Ви-3  | –                     | –     | –        | +                | К            | +        | –    | –    | –                         | +                 |
| Ви-4  | ГК                    | –     | –        | –                | П            | +        | +    | +    | –                         | –                 |
| Жа-1  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | +    | –    | +                         | –                 |
| Жа-2  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | +    | –    | +                         | –                 |
| Жа-4  | –                     | –     | –        | +                | К            | +        | +    | –    | –                         | +                 |
| Жа-5  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | –    | +    | +                         | –                 |
| Жа-6  | –                     | –     | –        | –                | К            | +        | +    | –    | –                         | –                 |
| Жа-7  | –                     | –     | –        | +                | К            | +        | –    | –    | –                         | +                 |
| Жа-8  | –                     | –     | –        | +                | К            | +        | –    | –    | –                         | +                 |
| Жа-9  | ГК                    | –     | –        | –                | П            | +        | +    | +    | –                         | –                 |
| Мо-1  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | +    | –    | +                         | –                 |
| Мо-2  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | +    | –    | +                         | –                 |
| Мя-1  | ГК                    | ГК    | +        | –                | П            | +        | +    | –    | –                         | +                 |
| Мя-2  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | –    | +    | +                         | –                 |
| Мя-3  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | +    | –    | +                         | –                 |
| Мя-4  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | +    | –    | +                         | –                 |
| Ту-1  | –                     | –     | –        | +                | К            | +        | +    | –    | –                         | +                 |
| Ту-2  | ГК                    | –     | +        | +                | К            | +        | +    | –    | –                         | –                 |
| Ту-3  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | –    | +    | +                         | –                 |
| Ту-4  | ГК                    | ГК    | +        | –                | П            | +        | +    | –    | –                         | +                 |
| Ту-5  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | +    | –    | +                         | –                 |
| Ог-1  | –                     | –     | –        | +                | К            | +        | –    | –    | –                         | +                 |
| Ог-2  | ГК                    | –     | +        | –                | П            | +        | +    | –    | +                         | –                 |

Продолжение таблицы

| 1    | 2  | 3   | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|------|----|-----|---|---|---|---|---|---|----|----|
| Ог-3 | –  | –   | – | + | К | + | – | – | –  | +  |
| Ог-4 | ГК | –   | + | + | К | + | + | – | –  | –  |
| По-1 | –  | ГКГ | – | + | К | + | – | – | –  | +  |
| По-2 | ГК | –   | + | – | П | + | + | – | +  | –  |
| По-3 | ГК | –   | + | – | П | + | + | – | +  | –  |
| Ры-1 | ГК | ГК  | – | + | К | + | + | + | –  | +  |
| Ры-2 | ГК | ГКГ | – | + | К | + | + | + | –  | +  |
| Ры-3 | ГК | –   | + | + | К | + | + | – | –  | –  |
| Ры-4 | –  | ГКГ | – | + | К | + | – | – | –  | +  |
| Ры-5 | ГК | ГК  | – | + | К | – | + | – | –  | +  |
| Ры-6 | –  | –   | – | – | К | + | – | – | –  | –  |
| Ры-7 | ГК | –   | + | – | П | + | – | + | +  | –  |
| Ры-8 | –  | –   | – | + | К | + | – | – | –  | +  |
| Ф-1  | ГК | –   | + | – | П | + | – | + | +  | –  |
| Ф-2  | ГК | –   | + | – | П | + | + | – | +  | –  |
| Ф-3  | –  | –   | – | – | К | + | – | – | –  | –  |
| Ф-4  | ГК | –   | + | – | П | + | – | + | +  | –  |
| Ф-5  | ГК | –   | + | + | К | + | + | – | –  | –  |
| Ф-6  | –  | ГКГ | – | + | К | + | – | – | –  | +  |

*Примечание.* Ви – виноград  
 Жа – жабры;  
 Мо – молоко;  
 Мя – мясо.  
 Ту – турецкий горох  
 Ог – огурец

По – помидоры  
 Ры – рыба;

Аэр – аэробные бактерии;  
 Анаэр – анаэробные бактерии;  
 ГК – образование глюконовой кислоты;  
 Г – газа образование;  
 П – палочки;  
 К – кокки.

Как видно из таблицы, 19 штаммов непатогенных бактерий, относящихся к роду *Pseudomonas*, являются аэробами (окисляют глюкозу до глюконовой кислоты), образуют специфические пигменты, представляют собой грамтрицательные палочки, обладают каталазной активностью, восстанавливают нитраты и нитриты, не гидролизуют крахмал.

Большинство изолятов бактерий *P. fluorescens* образовывали бесцветные или желтоватые, выпуклые, гладкие, блестящие колонии. Характерной особенностью колоний являлась внешняя микроструктура, которая имела сетчатое или ячеистое строение. Клетки окрашивали среду в зеленовато-желтый цвет за счет продуцирования пигментов – пиовердина и флуоресцеина.

Бактерии *P. aeruginosa* образовывали бесцветные или желтоватые плоские колонии. Клетки окрашивали среду в сине-зеленый цвет за счет продуцирования пигмента – пиоцианина. Бактерии *P. fluorescens* росли при температуре 4°C, а бактерии *P. aeruginosa* – при температуре 41°C.

Проведенные исследования показали, что штаммы Жа-1, Жа-2, Мо-1, Мо-2, Мя-3, Мя-4, Ог-2, По-3, По-4, Ф-2 принадлежат к виду *fluorescens*, а

штаммы Ви-1, Ви-2, Жа-5, Мя-2, Ту-3, Ту-5, Ры-7, Ф-1, Ф-4 к виду *aeruginosa*.

### **Выводы**

В ходе экспериментальной работы выделены 44 изолята, бактерий рода *Pseudomonas*, вызывающих порчу пищевых продуктов, установлены их морфологические и физиолого-биохимические характеристики, на основании которых идентифицированы 27 штаммов из них 19 штаммов непатогенных бактерий. Образование специфических пигментов и способность к росту при разных температурах позволили установить принадлежность бактерий рода *Pseudomonas* к видам *fluorescens* и *aeruginosa*.

Создана коллекция штаммов бактерий *P. fluorescens* и *P. aeruginosa*, которая в ходе дальнейших исследований послужит основой для изучения и разработки средств защиты продуктов питания от порчи.

### **Список литературы:**

1. Kumar, A. Isolation and Characterization of Microorganisms Responsible for Different Types of Food Spoilages. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology / A. Kumar [et.al.]. 2011; 1(2): 22-31.
2. Rawat S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention/ Asian Journal of Plant Science and Research, 2015, 5(4):47-56
3. Леонтьев В. Н., Элькаиб Х. М., Эльхедми А. Э. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения // Труды БГУ. 2013. Т. 8, ч. 1. С. 125–130.
4. Жарикова Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена. М.: АСАДЕМА, 2005. 297 с.
5. Джей Дж. М., Лесснер М. Дж., Гольден Д. А. Современная пищевая микробиология / пер. с англ. Е. А. Барановой [и др.]. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 886 с.
6. Меджидов М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам. М.: Медицина, 2003. 208 с.
7. Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С., Быков А. С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. М.: Мастерство, 2001. 224 с.
8. Леванова Г.Ф., Парфенова О.В., Кашников С.Ю. Молекулярно-биологические способы идентификации и дифференциации бактерий. М.: АСАДЕМІА, 1995. 158 с.
9. Сиволодский Е.П. Синтетическая питательная среда King BS для определения синтеза флюоресцеина бактериями рода *Pseudomonas*. Клиническая лабораторная диагностика, 2012, 10.
10. Смирнов В.В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990. 264 с.
11. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии: в 3 т. / пер. с англ. под ред. Е. Н. Кондратьевой, Л. В. Калакуцкого. М.: Мир, 1983. Т. 1. 536 с.

12. Franzetti L., Scarpellini M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 2007, vol. 57, no. 1, pp. 39–47.
13. Palleroni, N.J., *Pseudomonaceae* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, Ed.Krigr, N.R., Holt, J.G., et al. 9th ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, (1984) 114.
14. Васильев Д.А. [и др.]. Выделение и типирование бактерии *Pseudomonas putida*. Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, 2009, 3 (10).
15. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. М.: Мир, 1997. Т. 1. 432 с. Т. 2. 368 с.

РОЛЬ ФОСФОЛИПИДОВ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ ПОКОЯЩИХСЯ  
И ПРОРАСТАЮЩИХ СПОРАНГИОСПОР  
*CUNNINGHAMELLA ECHINULATA* И *UMBELOPSIS RAMANNIANA* –  
ПРОДУЦЕНТОВ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Мысякина И.С.\*, Бокарева Д.А.\*\*\*, Сергеева Я.Э.\*\*

\*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
Москва, РФ

\*\*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
Москва, РФ

*Changes in the content and composition of lipids and fatty acids in exogenously dormant ("spores 0") and germinating sporangiospores ("spores P") of zygomycete fungi Cunninhamella echinulata VKM F-663 and Umbelopsis ramanniana VKM F-582 in distilled water were investigated. Changes in spores P lipids compared with spores 0 are expressed in an increase in the proportion of unsaturated fatty acids, in the decrease in the content of massive phospholipids (phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine) and in the increase in the levels of phosphatidylglycerol and phosphatidic acid, which can function as signaling compounds. The level of the basic phospholipid of mitochondrial membranes – cardiolipin in the process of spore exit from the state of dormancy increased in both representatives of zygomycetes. A certain increase in the content of free and esterified sterols was observed in the composition of neutral lipids of the spores of U. ramanniana. During the C. echinulata sporangiospores germination there did not occur any significant changes in the composition of neutral lipid classes, which can be explained by the fact that they are not the main reserve, mobilizing at the exit from the state of dormancy.*

**Введение.** Мицелиальные грибы широко используются в биологических и экологических технологиях в процессах получения биологически активных соединений, органических кислот, ферментов, хитина, липидов, а также в детоксикации ксенобиотиков, процессах очистки сточных вод, биосорбции и

др., поэтому состояние спорового материала и скорость прорастания спор имеют большое значение для эффективности микробных технологий.

Процесс выхода спор микроорганизмов из состояния покоя, несмотря на длительную историю изучения, до сих пор является предметом интереса исследователей [4; 5]. Ранее нами было проведено сравнительное исследование прорастания спор бесполого спороношения (спорангиоспор) и определение особенностей выхода их из состояния покоя у представителей зигомицетовых грибов – *Cunninghamella echinulata* и *Umbelopsis ramanniana* [1]. Было показано, что споры изученных штаммов находятся в состоянии экзогенного покоя, но имеют разные длительность лаг-фазы и скорость прорастания: у *C. echinulata* споры прорастали через 1–5 ч, а у *U. ramanniana* – через 20 ч. Кроме того, установлено, что в процессе выхода спор из состояния покоя в среде, не содержащей экзогенных питательных веществ (в дистиллированной воде), уровень трегалозы – сахара покоя – в покоящихся спорах *C. echinulata* и *U. ramanniana* значительно различался, а в проросших спорах снижался [2].

Споры грибов имеют существенные различия, как в химическом составе, так и в особенностях выхода из покоящегося состояния [3; 9]. Изменения в составе и содержании липидов, как резервных (триацилглицерины, эфиры стерина), так и мембранных (фосфо-, гликолипиды и стерина), а также в составе жирных кислот помогут прояснить роль липидов в процессе выхода из состояния экзогенного покоя спорангиоспор зигомицетовых грибов, различающихся по скорости прорастания.

Цель работы – исследовать изменения содержания и состава липидов и жирных кислот в экзогенно покоящихся и прорастающих в дистиллированной воде спорагиоспорах *Cunninghamella echinulata* ВКМ F-663 и *Umbelopsis ramanniana* ВКМ F-582 – продуцентов ненасыщенных жирных кислот, в том числе  $\gamma$ -линоленовой.

**Методы исследования.** В работе использовали 2 штамма из коллекции мицелиальных грибов ВКМ ИБФМ РАН, характеризующиеся разной скоростью роста: высокой – *Cunninghamella echinulata* (Thaxter 1891) Thaxter ex Blakeslee 1905 ВКМ F-663, и низкой – *Umbelopsis ramanniana* (Moeller 1903) W.Gams 2003 ВКМ F-582.

Грибы выращивали в стеклянных матрасах со скошенным агаризованным сусликом в течение 7 сут для получения обильного спорообразования. Смытые с поверхности мицелия и осажденные центрифугированием споры дважды промывали дистиллированной.

Одну часть спорового материала (непроросшие, "споры 0") использовали как контрольный вариант. Другую часть спор переносили в 2-литровые колбы со стерильной дистиллированной водой и инкубировали на качалке (180 об./мин) при 28°C. Споры 0, а также проросшие споры с ростовыми трубками ("споры П") быстро прорастающего штамма (*C.*

*echinulata* ВКМ F-663) использовали для определения состава липидов через 5 ч инкубации, а медленно прорастающего (*U. ramanniana* ВКМ F-582) через 20 ч.

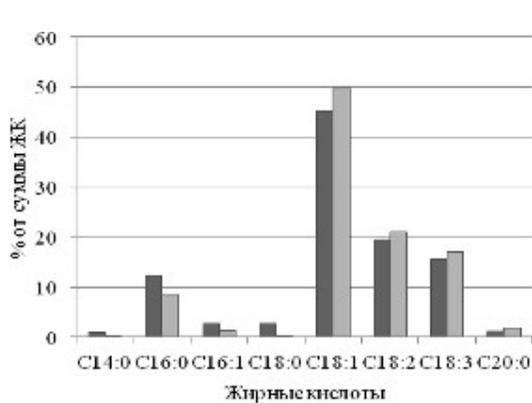
Липиды из биомассы спор экстрагировали методом Фолча. Для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) липиды подвергали кислотному метанолизу в смеси метанола и хлористого ацетила при 80°C в течение 1.5 ч. Метиловые эфиры жирных кислот анализировали методом ГЖХ на газовом хроматографе Bruker 430 GC, снабженном пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой Select™ Biodiesel for FAME (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm), в режиме линейного программирования температуры: 140°C (3 мин) – 4°C мин – 260°C (5 мин). Температура инжектора – 250°C, температура детектора – 250°C, линейная скорость потока газа-носителя (азота) – 20 см/с, деление потока 1:20. Объем вводимой пробы 1 мкл. Идентификацию индивидуальных жирных кислот проводили в сравнении времен удерживания со стандартом (FAME mix Supelco-37).

Состав классов липидов определяли методом ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (“Merck”, Германия) [6].

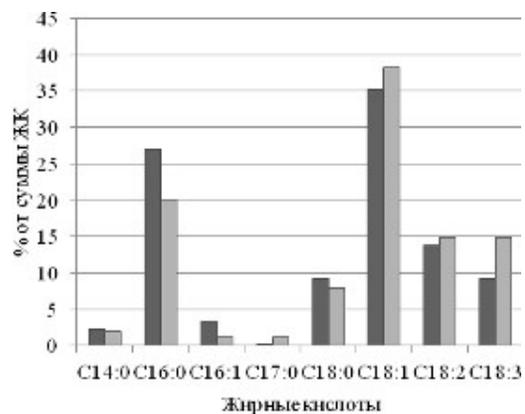
Статистическую обработку результатов проводили с использованием метода медианы. Представлены значения результатов 3 независимых опытов.

**Результаты и обсуждение.** Процесс выхода спор из состояния покоя проводили в среде, не содержащей экзогенных питательных веществ (в дистиллированной воде). Такой подход позволяет получить адекватные данные об изменениях в составе метаболитов и оценить значение эндогенных соединений (в данном случае липидов) в процессе выхода спор из состояния покоя без стимулирующего влияния компонентов питательной среды.

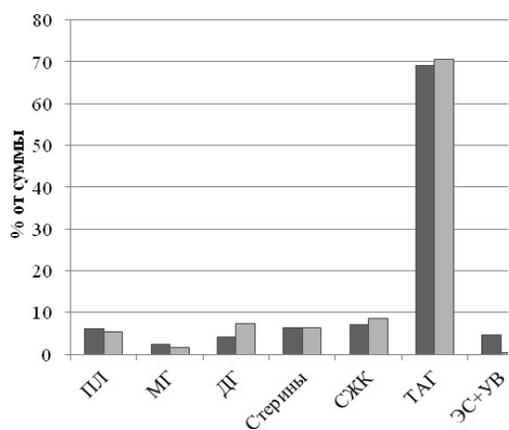
Состав жирных кислот (ЖК) общих липидов спор *C. echinulata* ВКМ F-663, находящихся в состоянии неглубокого покоя и быстро переходящих в первую (набухание; 1 ч) и вторую (формирование ростовой трубки; 2–5 ч) стадии прорастания представлен на рисунке (а). Основные изменения выразались в снижении относительного содержания насыщенных пальмитиновой и стеариновой кислот и возрастании доли ненасыщенных С<sub>18</sub>-кислот (олеиновой – С<sub>18:1</sub>, линолевой – С<sub>18:2</sub>, γ-линоленовой – С<sub>18:3</sub>), в результате чего степень ненасыщенности липидов в прорастающих спорангиоспорах увеличилась со 133.9 (споры 0) до 145.5 Δ/100 мол. ЖК (споры II). Споры 0 *U. ramanniana* ВКМ F-582, для которых был характерен длительный период прорастания (20 ч), имели по сравнению со спорами *C. echinulata* ВКМ F-663 более высокое содержание насыщенных ЖК (С<sub>16:0</sub> и С<sub>18:0</sub>) и более низкое – олеиновой и линолевой кислоты (рисунок, б). Уровень полиненасыщенной γ-линоленовой кислоты в спорах этого штамма также увеличивался в процессе выхода спорангиоспор из состояния покоя, что приводило к возрастанию степени ненасыщенности липидов (споры 0 – 93.9, споры II с – 113.8 Δ/100 мол. ЖК).



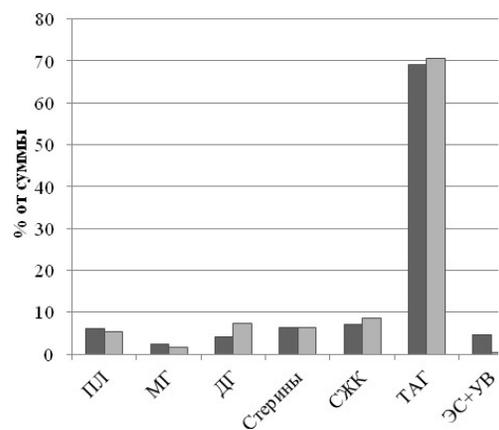
а



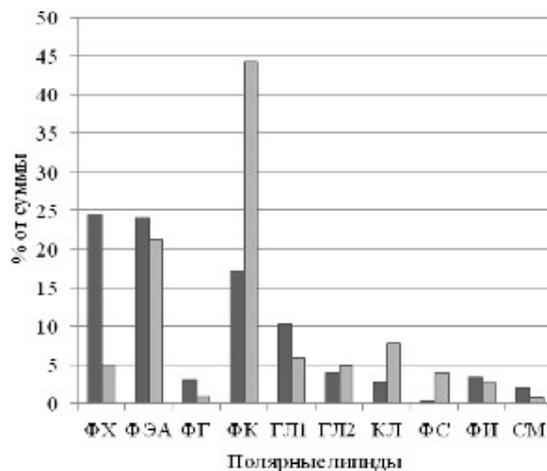
б



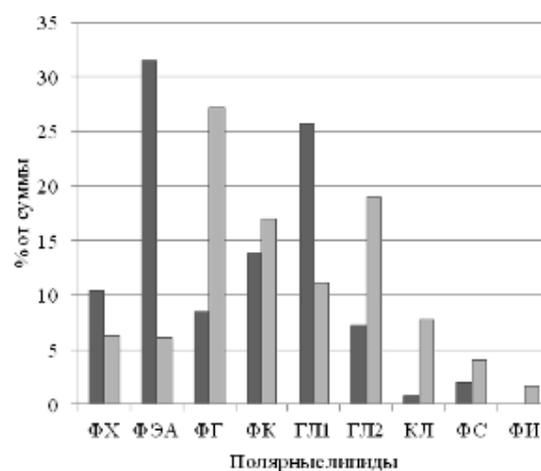
в



г



д



е

Рисунок. Состав липидов спорангиоспор *C. echinulata* ВКМ F-663 (а, в, д) и *U. ramanniana* ВКМ F-582 (б, г, е). ■ – споры 0 (покоящиеся); □ – споры II (прорастающие).

В общих липидах спорангиоспор штамма *C. echinulata* ВКМ F-663 основными липидами были триацилглицерины (ТАГ) (рис. в), а у спорангиоспор штамма *U. ramanniana* ВКМ F-582 – ТАГ, стерины (Ст), свободные жирные кислоты (СЖК) и диацилглицерины (ДАГ) (рис. г). Обращает на себя внимание тот факт, что в процессе прорастания спорангиоспор *C. echinulata* ВКМ F-663 не происходило сколько-нибудь значительных изменений в составе классов общих липидов, что можно объяснить тем, что нейтральные липиды не являются основным резервом, мобилизуемым на этапе выхода из состояния покоя. Ранее нами были получены данные по изменению содержания трегалозы в спорах зигомицетов [2]. В спорах 0 *C. echinulata* ВКМ F-663 ее содержание достигало 8.9% от сухой биомассы спор и снижалось при выходе из состояния покоя. Споры 0 *U. ramanniana* ВКМ F-582 имели значительно более низкое содержание трегалозы – 0.34%, и ее уровень в спорах П изменялся незначительно, однако в составе общих липидов наблюдалось некоторое увеличение содержания свободных и этерифицированных стеринов (рис. б).

Основными полярными липидами покоящихся спор *C. echinulata* ВКМ F-663 были фосфатидихолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидная кислота (ФК) и гликолипид 1 (ГЛ1) (рис. д). В процессе выхода из состояния покоя в спорах П происходило стремительное снижение доли ФХ и увеличение содержания ФК. В покоящихся спорах медленно прорастающего гриба *U. ramanniana* ВКМ F-582 соотношение мембранных липидов отличалось: основным были ФЭА, ГЛ1, ФХ и ФК (рис. е). Процесс прорастания его спорангиоспор также, как и спор *C. echinulata*, сопровождался снижением уровня ФХ и увеличением – ФК, однако для спор П *U. ramanniana* было характерно значительное снижение другого массивного фосфолипида – ФЭА и возрастание уровня фосфатидилглицерина (ФГ).

Примечательно, что уровень основного фосфолипида митохондриальных мембран – кардиолипина (КЛ) в процессе выхода спор из состояния покоя увеличивался у обоих представителей зигомицетов, что свидетельствует об активизации дыхательных процессов по сравнению с покоящимися спорами.

Высокое относительное содержание ФХ рассматривается как показатель гипометаболического состояния, в то время как его снижение и возрастание доли ФЭА и ФК свидетельствует о протекании активных метаболических процессов у грибов [3]. Кроме того, ФК является одним из соединений, принимающих участие в передаче клеточных сигналов при изменении условий внешней среды и в стрессовых условиях. Все вторичные липидные мессенджеры – сигнальные соединения – образуются из основных мембранных предшественников – ФХ и сфингомиелина (СМ) [8]. ФХ гидролизует в результате рецептор-опосредованной стимуляции специфической фосфолипазы С с образованием ДАГ или через стимуляцию

фосфолипазы D с образованием ФК [7]. Образованные в результате действия фосфолипаз ФК, лизо-ФК и ДАГ имеют отношение к контролированию многих клеточных функций [10] и оказывают влияние на пролиферативные свойства клеток.

В условиях отсутствия источников углерода и азота в среде (т.е. в условиях стресса “голодной среды”) споры, тем не менее, способны к прорастанию, однако изменения в их липидном составе свидетельствуют о том, что отдельные их классы играют скорее структурную и сигнальную роль, нежели запасную.

**Выводы.** Основные изменения, которые происходят в спорангиоспорах зигомицетовых грибов при выходе из покоящегося состояния в условиях отсутствия питательных веществ в среде заключаются в изменении содержания эндогенных запасов углеводов (трегалозы) и мембранных липидов. Изменения в липидах выражаются в увеличении доли ненасыщенных жирных кислот, в снижении содержания массивных фосфолипидов (ФХ и ФЭА) и увеличении уровня ФГ и ФК, которые могут выполнять функцию сигнальных соединений. Что касается считающихся резервными ТАГ, то их содержание в спорангиоспорах исследуемых зигомицетов при выходе из покоящегося состояния практически не изменялось, поэтому можно сделать вывод о выполнении ими в процессе прорастания функций, отличной от запасной.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-04-03484).

### Список литературы

1. Мысякина И.С., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Бокарева Д.А., Феофилова Е.П. Прорастание спор мицелиальных грибов в связи с экзогенным покоем // Микробиология. 2016. Т. 85. № 3. С. 269–274.
2. Мысякина И.С., Усов А.И., Бокарева Д.А., Феофилова Е.П. Содержание трегалозы в покоящихся и прорастающих спорах мицелиальных грибов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3 (1). С. 143–145.
3. Феофилова Е.П., Ивашечкин А.А., Алехин А.И., Сергеева Я.Э. Споры грибов: покой, прорастание, химический состав и значение для биотехнологии // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 5–17.
4. D’Enfert C. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa* // Fungal Genet. Biol. 1997. V. 21. P. 163-172.
5. Dantigny P., Nanguy S.P.-M., Judet-Correia D., Bensoussan M. A new model for germination of fungi // Int. J. Food Microbiol. 2011. V. 146. P. 176-181.

6. Kates M. Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. 2<sup>nd</sup> edn. Amsterdam–NY–Oxford: Elsevier, 1986. 464 p.
7. Moritz A., De Graan P.N.E., Gipsen W.H., Wirtz K.W.A. Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 7207–7210.
8. Sciorra V.A., Rudge S.A., Jiyao Wang, McLaughlin S. Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes // J. Cell Biol. 2002. V. 159. № 6. P. 1039.
9. Wyatt T.T., Wösten H.A.B., Dijksterhuis J. Fungal spores for dispersion in space and time // Adv. Appl. Microbiol. 2013. V. 85. P. 43–91.
10. Xie Z., Fang M, Rivas M.P., Faulkner A.J., Sternweis P.C., Engebrecht J.A., Bancaitis V.A. Phospholipase D activity is required for suppression of yeast phosphatidylinositol transfer protein defects // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 12346–12351.

## ВСТРЕЧАЕМОСТЬ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ У ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА МИНСКА

Головач Т.Н.<sup>1</sup>, Иванов А.А.<sup>2</sup>, Яцков Н.Н.<sup>1</sup>, Курченко В.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет, г. Минск

<sup>2</sup> Таможенный комитет Республики Беларусь, г. Минск

*kurchenko@tut.by*

*В статье приведены данные по встречаемости IgE к различным аллергенам в сыворотках крови 3522 пациентов города Минска и Минского района. Показано, что у 5,87% больных содержатся IgE к пищевым аллергенам. В том, числе к растительным антигенам – 2,56% и животным антигенам – 3,3%. Наиболее часто аллергия обнаруживается у больных к животным белкам: коровьему молоку – 0,77%, казеину – 0,58%, α-лактальбумину – 0,89%, β-лактоглобулину – 0,22%. Предложена технология получения ферментативного гидролизата белков сыворотки молока с низким аллергенным потенциалом. Частичный гидролизат белков сыворотки молока, полученный по этой технологии, может быть использован в качестве продуктов лечебно-профилактического и профилактического назначения в питании здоровых детей, входящих в группы риска, а так же в питании больных с нетяжелыми формами аллергических проявлений.*

**Введение.** В настоящее время около 30% населения земного шара страдает различными аллергическими заболеваниями, при этом каждый третий житель России подвержен аллергии. Значительное место среди этих заболеваний занимает аллергия, вызванная пищевыми продуктами. Показано, что она встречается в среднем, у 10% детей и 2% взрослых. При этом наследственная отягощенность по аллергическим заболеваниям обнаружена

у 65,4% больных. У 80% пациентов это заболевание проявляется в форме атопического дерматита. Атопический дерматит – хроническое аллергическое воспаление кожи. Основной причиной заболевания являются нарушения функционирования иммунной системы [1].

Более выраженными аллергенными свойствами обладают продукты белкового происхождения, содержащие животные и растительные белки. Одним из первых аллергенов, вызывающих это заболевание у детей первого года жизни являются белки коровьего молока. В раннем возрасте у детей наблюдается повышенная проницаемость желудочно-кишечного тракта для белков молока, которые устойчивы к действию протеолитических ферментов. Как видно на рисунке 1 такие нерасщепленные макромолекулы белков достигают эпителия тонкой кишки и адсорбируются энтероцитами. Большая часть белка, поглощенного энтероцитами, расщепляется в эндолизосомальной системе на аминокислоты (50%) и пептиды (40%), тогда как 10% не подвергается гидролизу и переносятся в неизменном виде. В физиологических условиях количество чужеродных молочных белков, переносимых через кишечный эпителий и попадающих в кровь, может составлять около 2 микрограмм белка за один час на см<sup>2</sup> кишечника [2, 3].

Рисунок 1 – Формирование иммунного ответа на белки-аллергены [1 ]

При взаимодействии негидролизированных белков со специализированными клетками иммунной системы запускается синтез IgE к различным антигенным детерминантам этих белков. По результатам

исследования пациентов с пищевой аллергией установлена высокая частота обнаружения аллергенспецифических IgE к различным белкам [1]. Таким образом, развитие атопического дерматита вызванного белками пищи связано, в первую очередь, с синтезом аллергенспецифических IgE.

Для снижения аллергенности белков необходимо использовать технологии, которые позволяют добиться снижения или отсутствия антигенных детерминант в их структуре. Такие технологии основаны на использовании ферментативного гидролиза белков пищи. При этом степень элиминации антигенных детерминант, способных вызывать аллергические реакции, должна быть достаточно полной. Характеристикой остаточной антигенности (АГ) белков молока является количество нерасщепленного белка, сохраняющего способность взаимодействовать с иммуноглобулинами IgE и IgG классов.

*Целью исследования* являлся анализ встречаемости иммуноглобулинов IgE к животным и растительным белкам пищи у жителей города Минска и Минского района, а так же разработка технологии получения ферментативных гидролизатов белков сыворотки молока с низким аллергенным потенциалом для заместительной терапии.

**Методы исследования.** В исследование использованы результаты тестирования сывороток крови 3522 пациентов, направленных централизованно в УЗ «10-я городская клиническая больница» из медицинских учреждений г. Минска и Минской области. В поступивших на исследование сыворотках определялось содержание специфических Ig E к различным аллергенам.

Для диагностики была применена тест-система «RIDА qLine Allergy» (R-Biopharm, Германия). Данная тест-система представляет собой иммуноферментный анализ на нитроцеллюлозной мембране (иммуноблот), предназначенный для количественного определения аллергенспецифических IgE-антител в сыворотке крови человека. С нитроцеллюлозной мембраной связаны 20 различных антигенов, образующих аллергопанель. В исследовании использованы результаты анализов 4 аллергопанелей.

Аллергопанель ингаляционная. Аллергены: пыльники ольхи, березы, лещины, дуба, смеси трав, ржи, полыни, подорожника; бытовых клещей *Dermatophagoides pretronyssinus* и *Dermatophagoides farinae*; домашних животных (кошка, собака, лошадь, морская свинка, хомяк, кролик); плесневых грибов *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria flternata*.

Аллергопанель педиатрическая. Смешанная, содержит ингаляционные и пищевые аллергены: аллергены смеси трав, пыльники березы, бытовых клещей *Dermatophagoides pretronyssinus* и *Dermatophagoides farinae*, домашних животных (кошка, собака), пищевые аллергены (белок яйца, желток яйца,

молоко,  $\alpha$ -лактальбумин,  $\beta$ -лактоглобулин, казеин, бычий сывороточный альбумин, пшеничная мука, соя, арахис, лесной орех, морковь, картофель), плесневых грибов *Alternaria flternata*.

Аллергопанель 3Н, пищевая. Аллергены: глютена, смеси орехов 1 (арахис, лесной орех, бразильский орех), смесь орехов 2 (миндаль, грецкий орех, кокос), смеси фруктов 3 (банан, апельсин, ананас), смеси фруктов 4 (зелёное яблоко, персики), смеси др. фруктов (груша, лимон, клубника), молока, белка яйца, желтка яйца, казеина, картофеля, сельдерея, моркови, помидоров, смеси специй 1 (анис, карри, кардамон, чеснок), смеси специй 2 (лавровый лист, паприка, зелёный перец, горчица), пшеничной муки, ржаной муки, кунжута, соевых бобов.

Аллергопанель 3 МЕНА, пищевая. Аллергены: моркови, лука, соевых бобов, помидоров, бананов, апельсинов, желтка яйца, белка яйца, коровьего молока, пшеницы, кунжута, риса, дрожжей, кукурузы, арахиса, смеси орехов (миндаль, фундук, грецкий орех), краба, трески, мяса цыпленка, баранины.

При анализе базы данных у пациентов определялось содержание Ig E к аллергенам, представленным в 4 аллергопанелях.

Получение ферментативного гидролизата сывороточных белков молока. Для ферментативного гидролиза применяли концентрат сывороточных белков, полученный методом ультрафильтрации (КСБ–УФ–80, ТУ ВУ 100377914.550–2008) с м.д. белка 80 %, а также сериновую протеазу (алкалаза, КФ 3.4.21.62, протеаза из *Bacillus licheniformis*, активность 2,64 Е/г; Sigma, США). Для изготовления опытного образца гидролизата получали 8 % раствор КСБ–УФ–80, проводили тепловую обработку белкового субстрата и охлаждали до температуры, оптимальной для гидролиза. В полученный термообработанный раствор вносили ферментный препарат; гидролиз осуществляли в термостатируемых условиях. По окончании протеолиза фермент инактивировали нагреванием; полученный жидкий гидролизат направляли на сушку (методика согласно[4]).

Анализ физико-химических и биологически активных свойств гидролизата. За основу электрофоретического разделения белков молока и их ферментативных гидролизатов принята методика, представленная в практическом пособии [5]. ВЭЖХ-анализ продуктов гидролиза проводили на хроматографе Agilent 1100 (Agilent, США) с применением колонки Zorbax–300SB C8 (4,6×250 мм, 5 мкм; Agilent, США) в соответствии с методикой [4]. Исследование молекулярно-массового распределения пептидов осуществляли с использованием прибора Bruker Microflex (Bruker, США). За основу конкурентного ИФА для определения остаточной АГ сывороточных белков и их гидролизатов приняты методики, описанные в [6].

Гидролизат сывороточных белков фракционировали с применением фильтров Amicon Ultra–4 10К (Millipore, США; пропускающая способность

10 кДа). Концентрацию белка (TN) в гидролизате и ультрафильтрате определяли по ГОСТ 30648.2–99. Долю фракции с молекулярной массой  $\leq 10$  кДа (%) определяли как соотношение значения TN, установленного для ультрафильтрата, к концентрации белка в исходном гидролизате. Содержание  $\alpha$ -аминного азота (AN) в образцах гидролизата определяли методом формолового титрования по ГОСТ 13805–76. Степень гидролиза рассчитывали как соотношение AN/TN.

Для оценки уровня антиоксидантной активности (АОА) применяли ТЕАС (Trolox equivalent antioxidant capacity)-метод. Измерение АВТС-радикал-восстанавливающей активности предполагало применение предварительно полученного катион-радикала на основе диаммониевой соли 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты)[7]. АВТС<sup>+</sup> – метастабильный радикал, который может существовать в растворе достаточно продолжительное время; при внесении в среду различных антирадикальных агентов (тролокса) наблюдается быстрое восстановление радикала. Реакцию контролировали спектрофотометрически при  $\lambda_{734}$ : АВТС<sup>+</sup>-радикал (синее окрашивание раствора) при восстановлении преобразуется в свою бесцветную нейтральную форму. В описанной системе присутствует лишь один тип радикала и исключено влияние антиоксиданта на процесс его образования, поэтому осуществляется механизм прямого взаимодействия антиоксиданта с катион-радикалом. Измерение АОА проведено на основе модифицированной методики, описанной в статье [7].

Математическую обработку результатов исследований осуществляли при помощи компьютерной программы «Microsoft Office Excel 2003» (Microsoft Corporation, США).

**Результаты и их обсуждение.** Для разработки и производства гипоаллергенных специализированных продуктов питания на основе ферментативных гидролизатов, необходимо иметь информацию о встречаемости IgE к белкам пищи у больных аллергией. В связи с этим, была создана база данных результатов исследования содержания IgE к различным аллергенам в сыворотках крови 3522 пациентов города Минска и Минского района, наблюдаемых в период с 06.08.2013 г. по 16.12.2014 г. Всего в исследовании представлены результаты обработки 4 аллергопанелей.

С использованием различных аллергопанелей у пациентов проведен анализ встречаемости IgE к пищевым и ингаляционным белковым аллергенам, результаты которого представлены в таблице 1.

Следует отметить, что количество выполненных тестов на ингаляционные аллергены в 1,96 раз превышает количество тестов на пищевые аллергены. При этом положительные тесты на наличие IgE к ингаляционным аллергенам в 2,13 превышает количество положительных тестов на пищевые аллергены.

Таблица 1 – Количество положительных тестов к пищевым и ингаляционным аллергенам

| Перечень выявляемых аллергенов  | Общее количество тестов, ед. | Количество положительных тестов |       |
|---|------------------------------|---------------------------------|-------|
|   |                              | ед.                             | %     |
| Всего ингаляционных и пищевых аллергенов                                | 66115                        | 12129                           | 18,35 |
| Пищевые аллергены   | 22300                        | 3879                            | 5,87  |
| Ингаляционные аллергены (пыльцевые, бытовые, эпидермальные и грибковые) | 43815                        | 8250                            | 12,48 |

С возрастом пищевая аллергия теряет доминирующую роль. У детей от 3 до 7 лет этиологическое значение пищевой аллергии в целом сохраняется, но сенсibilизация к некоторым аллергенам: белок коровьего молока, куриного яйца и др. снижается. В этот период увеличивается этиологическая значимость бытовых, клещевых, пыльцевых аллергенов, причем характерно как постепенное возрастание частоты моновалентной аллергии, так и расширение спектра аллергенов. Так, у 24 % детей формируется сенсibilизация к шерсти собаки, у 19,2 % – к шерсти кролика, у 16 % – к шерсти кошки, у 15,4 % – к шерсти овцы [8].

У взрослых больных выявляется превалирующая роль пыльцевой аллергии (67 %). На втором месте оказываются бытовые аллергены (38 %), на третьем – эпидермальные (35 %), на четвертом – грибковые (32 %). Пятое и шестое места по ранговой принадлежности занимают пищевые и паразитарные аллергены – у 31 % и 15 %. При обследовании больных с бытовыми аллергенами наиболее часто выявлялись IgE-антитела к домашней пыли – от 25 % до 30 %, в меньшей степени к клещам рода *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae* – 14 % и 10 %, соответственно. Особо следует отметить аллергию к домашней пыли, в частности к компонентам домашней пыли, поскольку она обладает множественной аллергенностью. В домашней пыли могут содержаться все упомянутые ингаляционные аллергены – и пыльца, и плесень, и в большом количестве перхоть и шерсть домашних животных, и фрагменты насекомых [8].

Для разработки функциональных продуктов питания особое значение имеет анализ встречаемости иммуноглобулинов IgE к животным и растительным белкам пищи. Результаты проведенных исследований положительной реакции на различные пищевые аллергены позволяют

определить основные технологии получения ферментативных гидролизатов белков, обладающих гипоаллергенными свойствами.

В таблицах 2 и 3 приведены результаты анализа встречаемости специфических IgE к пищевым аллергенам растительного и животного происхождения. В структуре исследованных пищевых белков с аллергенным потенциалом компоненты растительного происхождения проявляли положительную реакцию в 2,56 % случаев, а на животные белки – 3,3 %.

Установлено, что из исследованного перечня растительных аллергенов наиболее часто встречается сенсibilизация к лесному ореху и арахису. Наряду с этим, максимальное количество положительных тестов выявлено на коровье молоко (0,77 %), казеин (0,58 %) и  $\alpha$ -лактальбумин (0,89 %). Белок яйца также обладает высоким аллергенным потенциалом (0,5 %).

Таблица 2 – Выявление IgE к пищевым аллергенам растительного происхождения

| Перечень и коды выявляемых аллергенов               | Общее количество тестов, ед. | Количество положительных тестов |             |
|---|------------------------------|---------------------------------|-------------|
|   |                              | ед.                             | %           |
| Всего пищевые аллергены растительного происхождения | 12444                        | 1694                            | 2,56        |
| F79 глютен  | 42                           | 0                               | 0           |
| FxH3 смесь фруктов 3 (банан, апельсин, ананас)      | 83                           | 10                              | 0,02        |
| F35 картофель                                       | 1199                         | 114                             | 0,17        |
| F85 сельдерей                                       | 823                          | 134                             | 0,20        |
| F31 морковь   | 1215                         | 72                              | 0,11        |
| F25 помидоры  | 584                          | 49                              | 0,07        |
| F4 пшеничная мука                                   | 1258                         | 165                             | 0,25        |
| F5 ржаная мука                                      | 141                          | 17                              | 0,03        |
| F10 кунжут  | 304                          | 36                              | 0,05        |
| F14 соевые бобы                                     | 1286                         | 120                             | 0,18        |
| F29 бананы  | 404                          | 25                              | 0,04        |
| F33 апельсин  | 544                          | 62                              | 0,09        |
| F9 рис  | 121                          | 24                              | 0,04        |
| F13 арахис  | 2023                         | 371                             | <b>0,56</b> |
| Fx орехи  | 121                          | 19                              | 0,03        |
| F17 лесной орех                                     | 1936                         | 459                             | <b>0,69</b> |

Таблица 3 – Выявление IgE к пищевым аллергенам животного происхождения

| Перечень и коды выявляемых аллергенов           | Общее количество тестов, ед. | Количество положительных тестов |             |
|---|------------------------------|---------------------------------|-------------|
|   |                              | ед.                             | %           |
| Всего пищевые аллергены животного происхождения | 9856                         | 2185                            | 3,30        |
| F1 белок яйца                                   | 2023                         | 332                             | <b>0,50</b> |
| F75 желток яйца                                 | 1565                         | 111                             | 0,17        |
| F23 краб  | 261                          | 23                              | 0,03        |
| F3 треска                                       | 263                          | 10                              | 0,02        |
| F83 мясо цыпленка                               | 159                          | 13                              | 0,02        |
| F88 баранина                                    | 107                          | 20                              | 0,03        |
| F2 коровье молоко                               | 1915                         | 512                             | <b>0,77</b> |
| F78 казеин                                      | 1320                         | 384                             | <b>0,58</b> |
| F76 $\alpha$ -лактальбумин                      | 990                          | 587                             | <b>0,89</b> |
| F77 $\beta$ -лактоглобулин                      | 948                          | 148                             | 0,22        |
| E204 БСА  | 305                          | 45                              | 0,07        |

В связи с высокой встречаемостью у пациентов IgE к белкам молока актуальным является разработка технологии получения ферментативных частичных гидролизатов белков сыворотки молока. Известно что, в белках детерминанты, распознаваемые иммунокомпетентными клетками и антителами, могут представлять собой три типа: последовательные короткие фрагменты пептидной цепи, петлевые короткие фрагменты, стабилизированные дисульфидными мостиками и конформационные эпитопы, образованные пространственно сближенными в молекуле белка аминокислотными остатками.

Для снижения аллергенности белков молока необходимо использовать технологии, которые позволяют добиться снижения или отсутствия антигенных детерминант в их структуре. Такие технологии основаны на использовании высокого давления, тепловой обработки и ферментативного гидролиза молока. При этом степень элиминации антигенных детерминант, способных вызывать аллергические реакции, должна быть достаточно полной. Характеристикой остаточной антигенности (АГ) белков молока является количество нерасщепленного белка, сохраняющего способность взаимодействовать с иммуноглобулинами IgE и IgG классов. С использованием конкурентного иммуноферментного анализа показано [9], что термическая обработка концентрата сывороточных белков (КСБ), может приводить к снижению количества антигенных эпитопов в четыре раза от уровня антигенности исходных белков молока (таблица 4).

Таблица 4 - Остаточная антигенность термизированного концентрата сывороточных белков

| Режим тепловой обработки КСБ | Остаточная антигенность |
|------------------------------|-------------------------|
| Контроль                     | 1,0±0,052               |
| 10 минут при 60°C            | 0,93±0,06               |
| 10 минут при 70°C            | 0,87±0,06               |
| 10 минут при 80°C            | 0,33±0,03               |
| 10 минут при 90°C            | 0,28±0,02               |
| 10 минут при 97°C            | 0,27±0,02               |

Наблюдаемое снижение антигенности термоденатурированных белков связано с разрушением конформационных эпитопов, образованных пространственно сближенными аминокислотными остатками. Аналогичные эффекты наблюдаются и при обработке молока высоким давлением [4].

Наиболее эффективным способом снижения аллергенности белков молока является их ферментативный гидролиз.

Проведение частичного ферментативного гидролиза белков сыворотки молока, при котором глубина протеолиза молочных белков достигает 18 - 24%, позволяет получить продукт с остаточной антигенностью (АГ) –  $10^{-3}$  от АГ негидролизированных белков молока.

Комплексный анализ органолептических, физико-химических и иммунохимических свойств полученного частичного гидролизата сывороточных белков молока представлен в таблице 5. По результатам ДСН-электрофореза в гидролизате установлен практически полный протеолиз  $\beta$ -лактоглобулина,  $\alpha$ -лактальбумина и БСА на пептиды. Изучение ВЭЖХ-профилей образца позволило установить, что в нем не содержатся нативные сывороточные белки.

Согласно экспериментальным данным в образце гидролизата количество фракции с  $m_r \leq 10$  кДа достигает 98 %, а остаточная АГ снижена в  $0,8 \times 10^3$  раза (таблица 5). По данным литературы остаточная АГ частичных гидролизатов, используемых в смесях профилактического назначения, составляет  $\geq 10^{-3}$  отн. ед. (или в  $\leq 10^3$  раз меньше АГ нативных белков) [6,7]. Изучение масс-спектров подтвердило отсутствие высокомолекулярной фракции в полученном гидролизате; среди продуктов протеолиза преобладают пептиды с  $m_r < 5$  кДа. Таким образом, установлено соответствие изучаемого гидролизата требованиям, предъявляемым к категории частичных ферментативных гидролизатов.

Таблица 5 - Органолептические и физико-химические показатели гидролизата сывороточных белков молока

| Наименование показателя   | Значение показателя                                       |
|---|---|
| Внешний вид и консистенция  | Желто-кремовый порошок                                    |
| Вкус и запах  | Свойственный молоку запах.<br>Слабо горький молочный вкус |
| Растворимость   | Растворим в воде  |
| Активная кислотность, ед. рН<br>(1 % раствор)                       | 6,7   |
| Массовая доля общего белка, %                                       | 80,0  |
| Пептидный профиль:<br>Фрагменты с молекулярной массой<br>>10 кДа, % | 2*  |
| Нативные сывороточные белки   | Не обнаружены**   |
| Снижение остаточной АГ (по сравнению<br>с нативным КСБ)             | $0,8 \times 10^3$   |

Примечание – \* – Значения показателей установлены в результате определения общего азота в гидролизате и ультрафильтрате, полученном с применением фильтров Amicon Ultra-4 10K с пропускающей способностью 10 кДа. \*\* – Согласно данным ДСН-электрофореза, ВЭЖХ и масс-спектрометрии

**Заключение.** Проведен анализ встречаемости IgE к различным аллергенам в сыворотках крови 3522 пациентов города Минска и Минского района. Показано, что у 5,87% больных содержатся IgE к пищевым аллергенам. В том, числе к растительным антигенам – 2,56% и животным антигенам – 3,3%. Наиболее часто аллергия обнаруживается у больных к животным белкам: коровьему молоку – 0,77%, казеину – 0,58%,  $\alpha$ -лактальбумину – 0,89%,  $\beta$ -лактоглобулину – 0,22%. Для коррекции пищевых аллергий к белкам молока разработана технология получения частичных гидролизатов белков сыворотки молока обладающих гипоаллергенными свойствами. Сравнительный анализ органолептических, физико-химических и иммунохимических свойств показал соответствие разработанного образца требованиям, предъявляемым к категории частичных ферментативных гидролизатов сывороточных белков. Положительный физиологический эффект при потреблении частично гидролизованных белков достигается за счет лучшего усвоения короткоцепочечных пептидов в кишечном тракте в сравнении с нативными белками и аминокислотами. Разработанная технология позволяет получить дешевые частичные ферментативные гидролизаты сывороточных белков. Они могут быть использованы в качестве компонента продуктов детского и специального питания: спортивного, геродиетического. Ими можно обогащать молочные, мясные, хлебо-булочные и др. изделия.

## Список литературы

1. Головач Т.Н., Курченко В.П. Аллергенность белков молока и пути ее снижения// Труды БГУ. 2010. т.5, ч.1.
2. Terpend, K. Protein transport and processing by human HT29–19A intestinal cells: effect of interferon gamma / K. Terpend, F. Boisgerault, M.A. Blaton, J.F. Desjeux, M. Heyman // Gut. – 1998. – Vol. 42. – P. 538–545.
3. Heyman, M. Antigen handling by intestinal epithelial cells / M. Heyman, J. Desjeux // In Antigen Presentation by Intestinal Epithelial Cells. [D Kaiserlian, editor], Heidelberg: Springer Verlag. 1997.
4. Kurchenko V.P. , Golovach T.N. , Chervyakovskii E.M. , Simonenko S.V. , Kharitonov V.D. Whey protein partial hydrolysates for specialized and infant nutrition // Russian Agricultural Sciences. 2011. Vol. 37. V.№ 1.
5. И.Е. Евдокимов, Т.Н. Головач, В.П. Курченко, Л.Р. Алиева, Р.О. Будкевич «Современные проблемы науки в пищевых и перерабатывающих отраслях АПК», Ставрополь, 2013. 80 с.
6. Halavach, T.M. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology / T.M. Halavach, V.P. Kurchenko, A.I. Albulov // Ural Scientific Bulletin. – 2014. – № 25 (104). – P. 69–79.
7. Halavach, T.N. Determination of physicochemical, immunochemical and antioxidant properties, toxicological and hygienic assessment of whey protein concentrate and its hydrolysate / T.N. Halavach, V.P Kurchenko, V.G. Zhygankov, I.A. Evdokimov // Foods and Raw Materials. – 2015. – Vol. 3, № 2. – P. 105–114.
8. Сергеев, Ю.В. Атопический дерматит (Руководство для врачей) / М.: Медицина для всех, 2002. – 187 с.
9. Круглик В.И. Теория и практика реализации технологий специализированных продуктов на основе ферментативных гидролизатов молочных белков.- М: Университеты России, 2007.

### ОЦЕНКА СТЕПЕНИ СХОДСТВА НЕКОТОРЫХ ГЕНОМОВ ТЛЕЙ НА ОСНОВЕ ВЫРАВНИВАНИЯ ПРОЧТЕНИЙ ГЕНОМА *APHIS FABAE* SSP. ПО ДОСТУПНЫМ РЕФРЕНСНЫМ ГЕНОМАМ

Кветко П.Ю., Воронова Н.В., Бондаренко Ю.В., Буга С.В.  
*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*  
*e-mail: pavelkvetko@gmail.com*

*Произведена оценка степени сходства геномов различных видов тлей на основании маппинга прочтений генома *A. fabae mordvilko* с референсными геномами. Сделан вывод о невозможности использования маппинга при сборке геномов тлей, для которых отсутствуют референсы представителей, по меньшей мере, того же биологического рода.*

**Введение.** Полногеномное секвенирование в последние годы применяется все более широко, в некоторых случаях превращаясь в почти

рутинный метод исследования. Существование секвенаторов нескольких поколений, отсутствие необходимости предварительного клонирования больших геномных библиотек и доступность обращения в крупные коммерческие лаборатории способствуют тому, что расшифровка геномов, в том числе крупных, становится все более простой задачей. Однако, как и при использовании любого другого биологического метода, получение данных представляет собой лишь первый этап исследования. Анализ результатов полногеномного секвенирования, а именно, сборка и аннотация генома, зачастую значительно более сложный в исполнении и трудоемкий этап [1].

При первичном анализе данных полногеномного секвенирования происходит выравнивание коротких участков прочтения по референсному, ранее собранному геному или без такового. Наличие качественно аннотированного референсного генома значительно облегчает дальнейшую работу и повышает доверие к получаемым данным. Однако, несмотря на то, что количество организмов, геномы которых расшифрованы и опубликованы, каждый год увеличивается, вопрос корректности выбираемого референса для выравнивания результатов секвенирования генома организмов, для которых эта работа проводится впервые, по-прежнему остается открытым [2].

Количество видов, геном которых к настоящему моменту расшифрован, значительно уступает числу известных видов живых организмов. В случае тлей, по состоянию на середину 2017 г., расшифрованы и опубликованы геномы 6 видов, принадлежащих к семейству Aphididae. *Acyrtosiphon pisum* (Harris), геном которого, усилиями большой группы исследователей из нескольких стран мира, был расшифрован и аннотирован первым, в настоящее время принято считать модельным видом в работах по изучению тлей [3]. Учитывая, однако, что рецентная фауна тлей насчитывает около 5200 видов [4], даже при высоком сходстве биологии, характерном для тлей, возникает закономерное опасение, что при работе с не модельными организмами исследователь может столкнуться с ограничением применимости данных, полученных для модели, для решения собственных задач. В нашем исследовании мы преследовали цель оценить полезность уже расшифрованных геномов тлей для выравнивания и сборки результатов полногеномного секвенирования тли, геном которой ранее расшифрован не был.

**Материалы и методы.** Секвенирование генома *Aphis fabae mordvilko* Börner & Janisch, коллектированных с *Philadelphus* sp. L., произрастающих в качестве орнаментальной растительности в г. Минск (Беларусь), было проведено в Центре ДНК-секвенирования Университета штата Юта (США). Принадлежность объекта исследования к конкретному подвиду была определена по ассоциации с конкретным кормовым растением [5].

Данные секвенирования генома были получены с использованием технологии IonTorrent и содержали 29 137 023 прочтений, общей длиной 4 294 765 822 нуклеотидов и средней длиной – 147,4 нуклеотидов.

В качестве референсных геномов использовали геномы тлей *A. pisum*, *Aphis glycines* Matsumura, *Myzus cerasi* (Fabricius), *Myzus persicae* (Sulzer) и *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) из базы данных IAGC с доступом через ресурс BIRAA [6]. Шестой из опубликованных геномов тли – геном *Diuraphis noxia* (Mordvilko ex Kurdjumov) – в настоящее время не представлен в базе данных IAGC и не был использован в работе только по этой причине. Справочная информация о геномах, использованных в нашей работе в качестве референсных, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнение референсных геномов тлей, представленных в IAGC

| Вид тли                   | Версия сборки | Размер генома (число нуклеотидов) | Процент непрочтенных нуклеотидов | Количество фрагментов* | Средняя длина фрагмента* |
|---------------------------|---------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Aphis glycines</i>     | 1,0           | 302 918 163                       | 0,14                             | 8 397                  | 36 075                   |
| <i>Acyrtosiphon pisum</i> | 2,0           | 541 000 000                       | 7,58                             | 23 923                 | 22 642                   |
| <i>Myzus cerasi</i>       | 1,1           | 405 711 039                       | 0,05                             | 49 285                 | 8 232                    |
| <i>Myzus persicae</i>     | 1,0           | 354 689 803                       | 3,26                             | 4 021                  | 86 351                   |
| <i>Rhopalosiphum padi</i> | 1,0           | 319 422 546                       | 0,02                             | 15 586                 | 20 493                   |

Примечание\* – скаффолдов или контиг, в зависимости от степени сборки каждого генома

Процедура обработки данных секвенирования выполнялась с использованием программного обеспечения и вычислительных мощностей сервера Galaxy [7].

Оценка качества отдельных прочтений производилась с помощью утилиты FastQC. Для конвертации и объединения файлов прочтений использовалась утилита BAM Tools. Обрезка последовательностей осуществлялась с помощью средства Trimmomatic. Прочтения обрезали до максимальной длины в 200 оснований, последовательности длиной менее 150 оснований удаляли. Процент покрытия референсного генома прочтениями и глубина покрытия рассчитывались с помощью программы BED Tools.

Маппинг прочтений по референсному геному производили с использованием алгоритма Bowtie2. Обработанные данные секвенирования генома *A. fabae mordvilko* содержали 18 779 422 прочтений общей длиной 3 369 783 989 и средней длиной 179,44 нуклеотидов.

Выравнивание проводилось в режиме «весьма чувствительного локального» («--very-sensitive-local»), что соответствует параметрам «-D 20 -R 3 -N 0 -L 20 -i S,1,0.50».

**Результаты и их обсуждение.** Данные, полученные при сравнении результатов выравнивания генома *A. fabae mordvilko* по разным геномам, используемым в качестве референсных, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты маппинга прочтений генома *A. fabae mordvilkoii* с использованием разных референсных геномов

| Референсный геном         | Процент использованных прочтений | Процент покрытия референсного генома | Средняя глубина покрытия участка перекрытия (раз) |
|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|
| <i>Aphis glycines</i>     | 72,61                            | 83,96                                | 8,369   |
| <i>Acyrtosiphon pisum</i> | 33,62                            | 14,10                                | 10,571  |
| <i>Myzus cerasi</i>       | 32,86                            | 25,22                                | 7,373   |
| <i>Myzus persicae</i>     | 30,93                            | 25,81                                | 7,909   |
| <i>Rhopalosiphum padi</i> | 40,09                            | 44,68                                | 6,856   |

Как видно из представленных результатов, наибольшее покрытие референса достигается при выравнивании прочтений генома *A. fabae mordvilkoii* по референсному геному *A. glycines* (83,96 %), что было предсказуемо, учитывая, что эти виды принадлежат к одному и тому же биологическому роду. Тем не менее, несмотря на то, что геном *A. glycines* наименьший из всех использованных в работе, уровень покрытия референса все еще оставляет пространство для неоднозначных интерпретаций результатов выравнивания (рисунок).

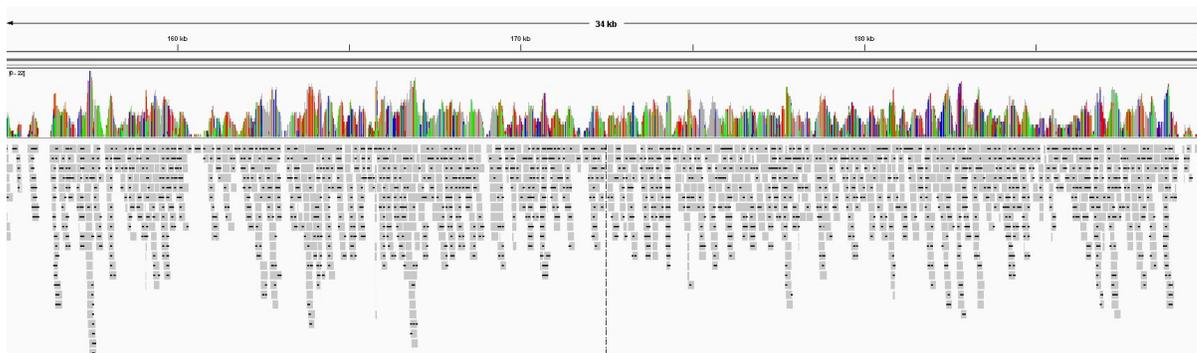


Рисунок – Участок выравнивания прочтений генома *Aphis fabae mordvilkoii* и скаффолда 426 *Aphis glycines* в области 150000–190000 пар оснований, глубина покрытия от 0 до 22

В рамках этой работы мы не пытались провести взаимное выравнивание геномов *M. cerasi* и *M. persicae*, что позволило бы ответить на вопрос, является ли такой процент перекрытия геномов у видов, принадлежащих к одному роду, нормальным значением для тлей, что возможно, если 16 % генома представляют собой высоковариабельные участки.

Интересно, что процент перекрытия прочтений генома *A. fabae mordvilkoii* с геномом *R. padi* около 45 %, в то время как с остальными геномами – лишь около 25 %. *A. fabae mordvilkoii* и *R. padi* принадлежат к

одной трибе – Aphidini, что отличает их от других видов, чьи геномы были использованы в исследовании, поскольку три оставшихся вида принадлежат к трибе Macrosiphini. К сожалению, крайне малое число расшифрованных геномов тлей в настоящее время не позволяет оценить, какие именно изменения генома сопровождают образование таксонов у тлей, однако в будущем такой вопрос может быть поставлен.

Стоит отметить, что различия в геномах тлей существенно усложняют задачу сборки ранее не секвенированных геномов по референсным последовательностям, а, следовательно, и их аннотацию. Сборка геномов в таких случаях может потребовать комбинирование алгоритмов маппинга и сборки геномов *de novo*.

*Исследования выполнены при частичной финансовой поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (проекты Б17МС-025, Б17-081).*

### **Список литературы**

1. Miller, W. Comparison of genomic DNA sequences: solved and unsolved problems / W. Miller // *Bioinformatics*. – 2001. – Vol. 17, N. 5. – P. 391–397.
2. Aligned: a competitive assessment of whole-genome alignment methods / D. Earl [et al.] // *Genome Res*. – 2014. – Vol. 24. – P. 2077–2089.
3. Brisson, J.A. The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: an emerging genomic model system for ecological, developmental and evolutionary studies / J.A. Brisson, D.L. Stern // *Ideas that push the boundaries*. – 2006. – Vol. 28, Iss. 7. – P. 747–755.
4. Воробьева, М.М. Представленность нуклеотидных последовательностей тлей подтрибы Anuraphidina в генетических базах данных: обзорный анализ / М.М. Воробьева, А.В. Стеколыщиков, Н.В. Воронова // Материалы I Международной научно-практической конференции «Современные проблемы энтомологии Восточной Европы», 8–10 сентября 2015 г., ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам». – Минск, 2015. – С. 71–75.
5. Van Emden, H.F. Aphids as crop pests / H.F. Van Emden, R. Harrington. – CAB International. – 2007. – 717 pp.
6. BIPAA Bioinformatics platform for agroecosystem. Arthropods [Электронный ресурс]. – 2017. – Режим доступа: <https://bipaa.genouest.org/>. – Дата доступа: 15.08.2017.].
7. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update / E. Afgan [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, N. W1. – P. W3–W10.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>РАЗДЕЛ 1 ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЖИВОТНОГО, РАСТИТЕЛЬНОГО И ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ</b>   | <b>4</b>  |
| <b>Evteev A., Pankin K., Larionova O., Bannikova A. RATIONALIZATION OF FISH OIL KINETICS TRANSPORT FROM ALGINATE CAPSULES</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Gorbunova N., Evteev A., Larionova O., Evdokimov I., Bannikova A. EFFECT OF ULTRASOUND ON THE EXTRACTION AND CHARACTERISATION OF BIOACTIVES FROM PLANTS</b>   | <b>8</b>  |
| <b>Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Сафина В.Р. ОСОБЕННОСТИ БИОДЕГРАДАЦИИ ХИТИНА И ХИТОЗАНА ПОЧВЕННЫМ МИКРОМИЦЕТОМ <i>PENICILLIUM GLABRUM</i> IB-37-2</b>   | <b>12</b> |
| <b>Буткевич Т.В., Сушинская Н.В., Курченко В.П. СОРБЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ХИТОЗАН-ГЛЮКАНОВЫМ КОМПЛЕКСОМ ИЗ <i>ASPERGILLUS NIGER</i></b>   | <b>17</b> |
| <b>Воробьева М.М., Н.В. Воронова, С.В. Буга ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЕ РЕЦЕНТНЫХ ВИДОВ ТЛЕЙ ФАУНЫ БЕЛАРУСИ</b>   | <b>22</b> |
| <b>Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф., Кузьмина Л.Ю., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. СИНТЕЗ ХИТИНАЗ И ЦЕЛЛЮЛАЗ ГРИБАМИ РОДА <i>TRICHODERMA</i> – ДЕСТРУКТОРАМИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>                            | <b>30</b> |
| <b>Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г., Кравченко В.А, Рябушко В.И., Нехорошев М.В., Бобко Н.И. ДИАТОМОВАЯ ВОДОРОСЛЬ <i>CYLINDROTHECA CLOSTERIUM</i> (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И КАРОТИНОИДОВ.</b> | <b>35</b> |
| <b>Иванов О.А., Домаш В.И. ФУНГИСТАТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКТОВ РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЕЙ ИНВАЗИВНЫХ ВИДОВ РОДА <i>SOLIDAGO</i> В ОТНОШЕНИИ НЕКОТОРЫХ ЗНАЧИМЫХ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ</b>   | <b>39</b> |
| <b>Куликова И.К., Анисимов Г.С., Карасева А.В., Евдокимов И.А. ИССЛЕДОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ <math>\beta</math>-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ В ПРОЦЕССЕ ЭЛЕКТРОДИАЛИЗА ПЕРМЕАТА МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ</b>  | <b>42</b> |
| <b>Курченко В.П., Ризевский С.В., Эсауленко М.А., Цыганков В.Г., Бондарук А.М., Филонюк В.А., Спиридович Е.В. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА В КОРЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СИРЕНИ</b>   | <b>46</b> |
| <b>Леонтьев В.Н., Феськова Е.В., Игнатовец О.С., Титок В.В. ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ ФЛАВОНОИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ КОЛЛЕКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА НАН БЕЛАРУСИ</b>   | <b>53</b> |
| <b>Мелентьев А.И., Логинов О.Н., Бойко Т.Ф., Актуганов Г.Э. УНИКАЛЬНЫЙ ПРИРОДНЫЙ ШТАММ <i>BAENIBACILLUS ENIMENSIS</i> IB-739</b>   | <b>58</b> |
| <b>Молчан О.В., Петринчик В.О., Запрудская Е.В., Шабуня П.С., Фатыхова С.А., Лешина Л.Г., Булко О.В. LED-ОСВЕЩЕНИЕ ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССАМИ БИОСИНТЕЗА И МОРФОГЕНЕЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ <i>INVIVO</i> и <i>INVITRO</i></b>                  | <b>63</b> |
| <b>Молчан О.В. , Ханько А.В. , Джус М.А., Скуратович Т.А. БОТАНИКО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЧЕРЕДЫ СРОСТНОЙ (<i>BIDENSONNATUSWILLD., ASTERACEAE</i>) – ИНВАЗИОННОГО ВИДА ФЛОРЫ БЕЛАРУСИ</b>  | <b>68</b> |
| <b>Молчан О.В., Шабуня П.С., Фатыхова С.А., Юрин В.М., ПОЛУЧЕНИЕ</b>   |           |

|  |     |
|--|-----|
| ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ЛИНИЙ КУЛЬТУР IN VITRO ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ – ОДНО ИЗ НАПРАВЛЕНИЙ РАЗВИТИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОЭКОНОМИКИ  | 73  |
| <b>Острикова К.В., Потапович М.И.</b> ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ ОВЕЧЬИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ $\alpha$ - И $\gamma$ -ИНТЕРФЕРОНОВ  | 79  |
| <b>Попов Е.Г., Кручонок А.В., Титок В.В.</b> ВИДОСПЕЦИФИЧНОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ <i>ESCHINACEA</i>  | 81  |
| <b>Пушкина Н.В., Максимов С.И., Карпович В.А.</b> ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВЛИЯНИЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ СТИМУЛЯЦИИ СЕМЯН КУКУРУЗЫ ЭМП СВЧ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА  | 87  |
| <b>Ржепаковский И.В., Тимченко Л.Д., Писков С.И., Аванесян С.С., Сизоненко М.Н., Привалова К.А., Арешидзе Д.А.</b> ЭФФЕКТИВНАЯ МИКРОТОМОГРАФИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КУРИНОГО ЭМБРИОНА НА РАННИХ ЭТАПАХ ЭМБРИОГЕНЕЗА И ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДА      | 91  |
| <b>Ризевский С.В., Hoang Ngoc Cuong, Huynh Thanh Tung</b> ГРИБЫ РОДА GANODERMA - ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ   | 96  |
| <b>Рогинский А.С., Бугакова А.В., Буга С.В.</b> ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ КОМАРОВ-ГАЛЛИЦ (SECIDOMYIINAE) ФАУНЫ БЕЛАРУСИ   | 101 |
| <b>Сироткина Д.П., Н.В. Воронова.</b> ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПЕРЕЧНЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ У ТЛЕЙ MACROSIPHUM GEI KOSCH, 1855, КОЛЛЕКТИРОВАННЫХ С ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЙ   | 105 |
| <b>Скурагович Т.А., Молчан О.В., Голенченко С.Г.</b> БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ VIDENSFRONDOSUS L.- ИНВАЗИВНОГО ВИДА ВО ФЛОРЕ БЕЛАРУСИ  | 109 |
| <b>Совгир Н. В., Бусленко А. В., Прокулевич В. А.</b> КОНСТРУИРОВАНИЕ ГИБРИДНОГО ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФЬОЖН-БЕЛОК СВМТ-ESC-B(1–20)   | 114 |
| <b>Тарасова Ю.В., Лодыгина С.В., Лодыгин А.Д., Капустин М.А., Ризевский С.В., Буткевич Т.В., Цыганков В.Г., Бондарук А.М., Филонюк В.А., Курченко В.П.</b> ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КЛАТРАТОВ ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ЭФИРНЫМ МАСЛОМ БУТОНОВ ГВОЗДИКИ | 119 |
| <b>Тарасова Ю.В., Лодыгина С.В., Лодыгин А.Д., Капустин М.А., Ризевский С.В., Буткевич Т.В., Цыганков В.Г., Бондарук А.М., Филонюк В.А., Курченко В.П.</b> ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КЛАТРАТОВ ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ЭФИРНЫМ МАСЛОМ КАРДАМОНА        | 125 |
| <b>Тарасова Ю.В., Лодыгина С.В., Лодыгин А.Д., Капустин М.А., Ризевский С.В., Буткевич Т.В., Цыганков В.Г., Бондарук А.М., Филонюк В.А., Курченко В.П.</b> ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КЛАТРАТОВ ЦИКЛОДЕКСТРИНА С ЭФИРНЫМ МАСЛОМ МУСКАТНОГО ОРЕХА | 132 |
| <b>Чубарова А.С., Капустин М.А., Якимович Е.А., Курченко В.П.</b> ОСОБЕННОСТИ АГРОТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СИЛИМАРИНА В КАЧЕСТВЕ ХЕЛАТОРА ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ                 | 138 |
| <b>Чухчин Д.Г., Е.В.Новожилов, К.С.Болотова, И.В.Тышкунцова, А.В.Малков, Л.В. Майер, Гурьянова А.А.</b> НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ  |     |

|   |     |
|---|-----|
| РАСТИТЕЛЬНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ  | 147 |
| <b>Шабунин С.В., Востроилова Г.А. КРИОФАРМАКОЛОГИЯ: ПРОДУКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ</b>  | 152 |
| <b>Элькаиб Х.М., Феськова Е.В., Леонтьев В.Н., Игнатовец О.С. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ЭКСТРАКТАХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС</b>   | 156 |
| <b><i>РАЗДЕЛ 2 ИННОВАЦИОННЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ, ВЕТЕРИНАРИИ, СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ДРУГИХ ОТРАСЛЯХ</i></b>  | 161 |
| <b>Храмцов А. Г. BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ПРИРОДНЫХ БАВ НА ОСНОВЕ УНИВЕРСАЛЬНОГО СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ – МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ</b>   | 162 |
| <b>Албулов А.И., Фролова М.А., Мельник Н.В., Еремец В.И., Мурадян Ж.Ю., Гринь А.В. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХИТОЗАНА В СОСТАВЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЕКРОБАКТЕРИОЗА ЖИВОТНЫХ</b>   | 165 |
| <b>Алиева Л.Р., Евдокимов И.А., Буткевич Т.В., Курченко В.П. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КАЗЕИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИТОЗАНА</b>   | 169 |
| <b>Баранов С.А., Евдокимов И.А. НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МИКРОПАРТИКУЛЯЦИИ В ПЕРЕРАБОТКЕ ТВОРОЖНОЙ СЫВОРОТКИ</b>   | 178 |
| <b>Богданова Е.В., Мельникова Е.И., Пономарева Н.В. ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОЛИЗАТА <math>\beta</math>-ЛАКТОГЛОБУЛИНА С ЗАДАННЫМ ХИМИЧЕСКИМ СОСТАВОМ И СВОЙСТВАМИ</b>   | 181 |
| <b>Будкевич Р.О., Мартак А.А., Будкевич Е.В., Еремина А.И. АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ В ПРОЦЕССЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ</b>   | 185 |
| <b>Варламов В.П. ПРОИЗВОДНЫЕ ХИТИНА И ХИТОЗАНА В BIOTEХНОЛОГИИ</b>  | 188 |
| <b>Гершончик К.Н., Кондратова И.И., Лодыгина С.В., Лодыгин А.Д., Курченко В.П. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТВОРИМОГО ПЕЧЕНЬЯ ДЛЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА</b>   | 191 |
| <b>Гершончик К.Н., Кондратова И.И., Лодыгина С.В., Лодыгин А.Д., Курченко В.П. ВЛИЯНИЕ САХАРА И ЖИРА НА ПРОЦЕСС ФЕРМЕНТАЦИИ КЛЕЙКОВИНЫ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТВОРИМОГО ПЕЧЕНЬЯ ДЛЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА.</b>  | 197 |
| <b>Головач Т.Н., Жабанос Н.К., Фурик Н.Н., Катович В.Е., Емельянов С.А., Лодыгин А.Д., Курченко В.П. ФЕРМЕНТАЦИЯ БЕЛКОВ МОЛОКА МЕЗОФИЛЬНЫМИ ЛАКТОКОККАМИ И ТЕРМОФИЛЬНЫМИ СТРЕПТОКОККАМИ</b>   | 203 |
| <b>Евдокимов И.А., Анисимов Г.С., Шрамко М.И. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ЛАКТОЗЫ</b>   | 213 |
| <b>Заерко В.И., Абакин С.С., Потапович М.И., Прокулевич В.А. АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИСТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ИЗ ШТАММА «АУФ» ЖИВОЙ, СУХОЙ «ЛИСТЕКС» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ ИММУНОСТИМУЛЯТОРА БИОПРЕПАРАТА «БИФЕРОН-Б» ПРОИЗВОДСТВА ООО «НПЦ «ПРОБИОТЕХ»» (РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ)</b> | 217 |
| <b>Капустин М.А., Чубарова А.С., Курченко В.П., Лодыгин А.Д., Ржепаковский И.В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОСПИННИНГА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ 3D-СКАФФОЛДОВ С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ КУРКУМЫ</b>   | 221 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Кравченко Л.М., Кудин К.В., Прокулевич В.А. СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ</b>  | <b>227</b> |
| <b>Крохмаль М.В., Евдокимов И.А. СОЗДАНИЕ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО НАПИТКА НА ОСНОВЕ ПЕРМЕАТА ОБЕЗЖИРЕННОГО МОЛОКА</b>   | <b>230</b> |
| <b>Кузнецов В.В., Димитриева С.Е., Лукин Д.Е. ОТДЕЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ВЫБОРУ НУТРИЕНТОВ ДЛЯ ОБОГАЩЕНИЯ ПРОДУКТОВ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ</b>   | <b>234</b> |
| <b>Левитская А.А., Анисимов С.В., Храмцов А.Г., Евдокимов И.А., Анисимов Г.С. ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ И НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ КОМПЛЕКСНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ПРОЕКТА ПО ПОЛУЧЕНИЮ И ПРИМЕНЕНИЮ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННОЙ ЛАКТОЗЫ – ПРИРОДНОГО ПРЕБИОТИКА ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ</b> | <b>239</b> |
| <b>Лодыгин А.Д., Поротова Е.Ю., Парамонова А.А., Купуста А.А. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАПИТКОВ И ДЕСЕРТОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ</b>  | <b>244</b> |
| <b>Писков С.И., Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В., Аванесян С.С., Лионова С.С. ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СУШКИ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ВЕШЕНКИ В УСЛОВИЯХ IN VITRO, ИМИТИРУЮЩИХ ПРОЦЕСС ПИЩЕВАРЕНИЯ</b>  | <b>248</b> |
| <b>Родная А.Б., Лодыгин А.Д., Храмцов А.Г. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПРЕБИОТИКОВ – ГАЛАКТООЛИГОСАХАРИДЫ</b>   | <b>253</b> |
| <b>Рябцева С.А., Скрипнюк А.А., Котова А.А., Храмцов А.Г., Родная А.Б., Лодыгин А.Д., Мартак А.А. НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗ ДРОЖЖЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ</b>   | <b>257</b> |
| <b>Соколовская Л.Н., Сороко О.Л., Дымар О.В. РЕОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВАРЕННЫХ СГУЩЕННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗОВАННОЙ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ</b>  | <b>261</b> |
| <b>Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В., Писков С.И., Арешидзе Д.А., Капустин М.А., Курченко В.П., Ульшина Д.В. РАНЕВЫЕ ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ 3-D СКАФОЛДОВ ИЗ НАНОВОЛОКОН БИОПОЛИМЕРОВ С ВКЛЮЧЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ</b>   | <b>266</b> |
| <b>Трухачёв В.И., Молочников В.В., Орлова Т.А., Храмцов А.Г. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗДЕЛЕНИЯ МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ ПОЛИСАХАРИДАМИ В ЗАМКНУТОМ ЦИКЛЕ ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ</b>  | <b>272</b> |
| <b>Халанская Д.М., Лодыгин А.Д., Курченко В.П. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЭКСТРАКЦИЮ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ</b>  | <b>277</b> |
| <b>Чикатуева М.А., Абакумова Е. А. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ, ЕЁ КОМПОНЕНТОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ КОСМЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ПРИМЕРЕ ШАМПУНЕЙ</b>  | <b>281</b> |
| <b>Элькаиб Х. М., Леонтьев В. Н. ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ</b>  | <b>286</b> |
| <b>Мысякина И.С., Бокарева Д.А., Сергеева Я.Э. РОЛЬ ФОСФОЛИПИДОВ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ЛИПИДОВ ПОКОЯЩИХСЯ И ПРОРАСТАЮЩИХ СПОРАНГИОСПОР <i>CUNNINGHAMELLA ECHINULATA</i> И <i>UMBELOPSIS</i></b>   |            |

|   |     |
|---|-----|
| <i>RAMANNIANA</i> – ПРОДУЦЕНТОВ НЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ  | 291 |
| Головач Т.Н., Иванов А.А., Яцков Н.Н., Курченко В.П. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ У ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА МИНСКА   | 297 |
| Кветко П.Ю., Воронова Н.В., Бондаренко Ю.В., Буга С.В. ОЦЕНКА СТЕПЕНИ СХОДСТВА НЕКОТОРЫХ ГЕНОМОВ ТЛЕЙ НА ОСНОВЕ ВЫРАВНИВАНИЯ ПРОЧТЕНИЙ ГЕНОМА <i>APHIS FABAE</i> SSP. ПО ДОСТУПНЫМ РЕФРЕНСНЫМ ГЕНОМАМ | 307 |

*Научное издание*

**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ  
ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ  
СИНТЕТИЧЕСКИХ  
И ПРИРОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ»  
(НАРОЧАНСКИЕ ЧТЕНИЯ - 11)**

Материалы  
Международной научно-практической конференции  
20–23 сентября 2017 г.

Издается в авторской редакции  
Компьютерная верстка

---

Подписано в печать  
Формат 60x84 1/8 Усл. п. л.    Уч.-изд. л.  
Бумага офсетная Заказ    Тираж 100 экз.

---

Отпечатано в