МАТЕРИАЛЫ КОНГРЕССА

CONGRESS PROCEEDINGS

2017 BIO TECH WORLD

WWW.BIOMOS.RU

ТОМ 2 / PART 2

IX МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

20-22 ФЕВРАЛЯ 2017
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,
ИЛЬИНКА, 4

IX INTERNATIONAL CONGRESS

BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES

20-22 FEBRUARY, 2017
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,
MOSCOW

2017 BIO TECH WORLD

WWW.BIOMOS.RU

ТОМ 2 / PART 2

IX МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС

БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

20-22 ФЕВРАЛЯ 2017
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,
ИЛЬИНКА, 4

IX INTERNATIONAL CONGRESS

BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES

20-22 FEBRUARY, 2017
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,
MOSCOW

УДК 575.1/2::612.017.1
ББК 28.072
Б63

МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС «БИОТЕХНОЛОГИЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ»

Материалы международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития»
20-22 ФЕВРАЛЯ 2017 Г.

ООО “РЭД ГРУПП”, 2017
УДК 575.1/2::612.017.1
ББК 28.072
ISBN 978-5-9909118-0-2

Настоящие материалы конгресса созданы на основании информации, предоставленной участниками конгресса.

© ООО “РЭД ГРУПП”
119049, г. Москва, ул. Мытная,
д. 28, стр. 3, комн. 6

Материалы тезисов публикуются в авторской версии. Организаторы не несут ответственности за неточности и упущения в названиях и адресах, представленных в данном сборнике.

INTERNATIONAL CONGRESS «BIOTECHNOLOGY: STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES»

The proceedings of International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives»
FEBRUARY 20-22, 2017.

LLC “RED GROUP”, 2017

These proceedings are based on information provided by congress participants. Organizer does not bear any responsibility for omissions and mistakes.

© LLC “RED GROUP”, Moscow

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENT

Организационный комитет / Organizing Committee .....3 / 5

Редакционная коллегия / Editorial board .....7 / 10

Программный комитет / Program Committee .....12 / 16

Конкурсная комиссия / Contest Committee.....20 / 22

5. Биоэкономика/Bioeconomics

Весь спектр биотехнологии сельскохозяйственных животных /
The entire spectrum of agricultural animal biotechnology 24

Биотехнология в сельскохозяйственном производстве /
Biotechnology in agricultural production..... 67

Пищевая биотехнология / Food biotechnology 203

Роботические технологии / Robotic technology..... 308

Прогресс в области биосенсорных технологий для медицины, сельского хозяйства, экологического мониторинга/
Advances in biosensor technologies for medicine, agriculture, environmental monitoring..... 338

6.Конкурс молодых ученых / Young Researcher's contest..... 368

ELSEVIER

СПОНСОР СЕКЦИИ БИОИНФОРМАТИКА И IT
SPONSOR OF BIOINFORMATICS AND IT SECTION

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

Быков Валерий Алексеевич	академик РАН, советник Президиума РАН, главный научный сотрудник Всероссийского института лекарственных растений, председатель Организационного комитета
Арчаков Александр Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, сопредседатель Оргкомитета
Романовский Михаил Юрьевич	д.ф.-м.н., начальник Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере науки ФАНО России, сопредседатель Оргкомитета
Чехонин Владимир Павлович	академик РАН, член Президиума РАН, руководитель Отдела и зав. кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова, сопредседатель Программного комитета
Варфоломеев Сергей Дмитриевич	член-корр. РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
Егоров Алексей Михайлович	академик РАН, зав. лабораторией инженерной энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
Алешников Владимир Евгеньевич	директор Конгресса «Биотехнология:состояние и перспективы развития» и Выставки «Мир биотехнологии-2017», ответственный секретарь Оргкомитета
Иванов Виктор Петрович	Президент Российского союза химиков
Кирпичников Михаил Петрович	академик РАН, декан биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
Ковальчук Михаил Валентинович	член-корр. РАН, директор Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
Крюков Сергей Вениаминович	д.т.н., председатель Совета директоров ОАО «Биофарм»
Лисицын Андрей Борисович	академик РАН, ректор Российского государственного аграрного университета - МСХА им. К.А.Тимирязева
Мирошников Анатолий Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, Зам.директора Института биоорганической химииим. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Декан факультета Биотехнологии МГУ им.М.В.Ломоносова
Огородова Людмила Михайловна	член-корр. РАН, зам. министра науки и образования РФ

Скрябин Константин Георгиевич	академик РАН, директор Центра «Биоинженерия» РАН
Тихонович Игорь Анатольевич	академик РАН, директор Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии г. Санкт-Петербург
Тутельян Виктор Александрович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи
Хаитов Рахим Мусаевич	академик РАН, научный руководитель ГНЦ РФ «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
Харченко Петр Николаевич	академик РАН, научный руководитель Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии
Цыб Сергей Анатольевич	к.э.н., зам.министра Минпромторга РФ

ORGANIZING COMMITTEE

Valery A. Bykov	Academician of RAS, National Institute of Medicinal Plants, Chair of the Organizing Committee
Alexander I. Archakov	Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Director, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, the Russian Academy of Medical Sciences, Co-Chair of the Organizing Committee
Mikhail Y. Romanovsky	Grand PhD (Physics and Mathematics), Head, Department of Coordination and Support of Operations in Science, Federal Agency for Research Organizations (FANO of Russia), Co-Chair of the Organizing Committee
Vladimir P. Chekhonin	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Section Leader and Head of the Medical Nanobiotechnologies sub-Department, Pirogov Russian State Medical University, Co-Chair of the Program Committee
Sergey D. Varfolomeyev	Corresponding Member of RAS, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Vladimir Y. Aleshnikov	General Director, LLC Expo-Biochem-Technologies, Executive Secretary of the Organizing Committee
Alexey M. Yegorov	Academician of RAS, Professor, Head of Engineering Enzymology Laboratory, Chemical Department, Lomonosov Moscow State University
Victor P. Ivanov	President, Russian Union of Chemists
Vyacheslav M. Lukomets	Academician of RAS, Rector of K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University (MSKhA), Chair of the Conference's Program Committee
Rahim M. Khaitov	Academician of RAS, Director, director of Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology
Pyotr N. Kharchenko	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agriculture
Mikhail P. Kirpichnikov	Academician of RAS, Dean of Department of Biology, Lomonosov Moscow State University
Mikhail V. Kovalchuk	Corresponding Member of RAS, Director, Kurchatov Institute National Research Center
Sergey V. Kryukov	Grand PhD (Technology), Chair of the Board of Directors, OAO Biopharm
Andrey B. Lisitsyn	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director of Gorbatov FGBNU VNIIMP, Russian Academy of Agriculture

Anatoliy I. Miroshnikov	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Deputy Director of Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Dean of Biotechnology, Lomonosov Moscow State University
Lyudmila M. Ogorodova	Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences, Deputy Minister of Education and Science of the Russian Federation
Constantine G. Skryabin	Academician of RAS, Director, Bioengineering Center, RAS
Igor A. Tikhonovich	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural Microbiology, Russian Academy of Agriculture, St. Petersburg
Victor A. Tutelian	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director, Research Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences
Sergey A. Tsyb	PhD (Economics), Deputy Minister of Industry and Trade of the Russian Federation

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Варфоломеев Сергей Дмитриевич	член-корр. РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
Арчаков Александр Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, сопредседатель Оргкомитета
Власов Валентин Викторович	академик РАН, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
Градова Нина Борисовна	профессор, д.б.н., кафедра биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева
Дзантиев Борис Борисович	профессор,зам.директора Института биохимии им. А.Н.Баха
Евтушенко Евгений Геннадьевич	ассистент кафедры химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова
Зиновьева Наталия Анатольевна	академик РАН, член Президиума РАН, директор ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Кирпичников Михаил Петрович	академик РАН, декан биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
Клячко Наталья Львовна	д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, заместитель директора Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ
Колчанов Николай Александрович	академик РАН, директор Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
Красильников Игорь Викторович	д.б.н., профессор, заместитель директора по инновациям и международным отношениям ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, г. Санкт-Петербург
Курочкин Илья Николаевич	д.х.н., профессор, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Легонькова Ольга Александровна	д.т.н., зав. лабораторией ФГБУ «Институт хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России
Лисицын Андрей Борисович	академик РАН, член Президиума РАН, директор ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова
Мартынов Александр Игоревич	к.м.н., первый заместитель директора ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ

Мирошников Анатолий Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, зам. директора Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, декан факультета Биотехнологии МГУ им. М.В.Ломоносова
Овчинникова Татьяна Владимировна	профессор кафедры биотехнологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, руководитель Научно-образовательного центра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, сопредседатель конкурса молодых ученых
Орешкин Евгений Николаевч	первый вице-президент консорциума «Биомак», заместитель декана биологического факультета МГУ по инновациям
Панфилов Виктор Иванович	профессор, зав. кафедрой биотехнологии, РХТУ имени Д.И. Менделеева
Поляков Виктор Антонович	академик РАН, директор ГНУ ВНИИПБТ
Поройков Владимир Васильевич	профессор, заведующий отделом биоинформатики Институт биомедицинскокй химии им.В.Н. Ореховича
Седельникова Галина Васильевна	профессор, заместитель директора Центрального научно-исследовательского геологоразведочного института цветных и благородных металлов
Сорокина Анна Юрьевна	к.б.н., заместитель начальника отдела координации деятельности научных центров Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере наук ФАНО России
Тихонович Игорь Анатольевич	академик РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», И.о. декана Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Президент Вавиловского общества генетиков и селекционеров
Тутельян Виктор Александрович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель ФГУП « ФИЦ питания и биотехнологии»
Хаитов Рахим Мусаевич	академик РАН, ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
Хамитов Равиль Авгатович	генеральный директор ООО «МБЦ «Генериум»
Харитонов Владимир Дмитриевич	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИ молочной промышленности
Харченко Петр Николаевич	академик РАН, научный руководитель Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии

Чехонин Владимир Павлович	академик, член Президиума РАН, руководитель Отдела и зав. кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова, сопредседатель Программного комитета
Цыганов Дмитрий Игоревич	д.т.н., профессор, зам.начальника управления ФАНО России
Швец Виталий Иванович	академик РАН, Завкафедрой биотехнологии и бионанотехнологии Московского технологического университета (МИРЭА, МГУПИ, МИТХТ), председатель конкурса молодых ученых
Михаил Исаакович Штильман	д.х.н., профессор, руководитель Учебно-научного центра «Биоматериалы» РХТУ им. Д.И. Менделеева
Яненко Александр Степанович	д.б.н., профессор, зам. директора ФГУП ГНЦ ГосНИИгенетика

EDITORIAL BOARD

Sergey D. Varfolomeyev	Corresponding Member of RAS, Research Head of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Alexander I. Archakov	Academician, Member of the Presidium of the RAS, Academic Leader of Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, the Russian Academy of Medical Sciences, Co-Chair of the Organizing Committee
Vladimir P. Chekhonin	Academician, Member of the Presidium of RAS, Section Leader and Head of the Medical Nanobiotechnologies sub-Department, Pirogov Russian State Medical University, Co-Chair of the Program Committee
Nina B. Gradova	Professor, Grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Boris B.Dzantiev	Professor, deputy director of A.N. Bach Institute of Biochemistry
Yevgeny G. Evtushenko	teaching assistant Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University
Natalia A. Zinovyeva	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director of Ernst FGBNU VIZh, Dubrovitsy
Rahim M. Khaitov	Academician of RAS, Academic Leader, FGBU GNC Institute of Immunology, Federal Agency for Medicine and Biology
Pyotr N. Kharchenko	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural Biotechnology
Vladimir D. Kharitonov	Academician of RAS, FGBNU National Institute of Dairy Industry
Mikhail P. Kirpichnikov	Academician of RAS, Dean of Department of Biology, Lomonosov Moscow State University
Nikolay A. Kolchanov	Academician of RAS, Director of FGBUN Institute of Cytology and Genetics, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Igor V. Krasilnikov	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director for Innovations and International Relations, FGUP SPbNIIVS, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg
Natalia L. Klyachko	Grand PhD (Chemistry), Professor, Head of Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University, deputy director of MSU Nanotechnology Education and Research Center
Ilya N. Kurochkin	Grand PhD (Chemistry), Professor, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
Olga A. Legonkova	Grand PhD (Technology), Head of Laboratory, A.V. Vishnevsky Institute of Surgery FSHE, RF Ministry of Health

Andrey B. Lisitsyn	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director of Gorbatov FGBNU VNIIMP
Alexander I. Martynov	PhD (Medicine), First Deputy Director of FGBU Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology
Natalia V. Menshutina	Professor, Director of International Training and Research Center for Transfer of Pharmaceutical Biotechnologies, Mendeleyev Russian University of Chemical Technologies
Anatoly I. Miroshnikov	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Deputy Director of Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Chair of the Academic Council of Pushino Research Center of RAS
Tatiana V. Ovchinnikova	Professor, Biotechnology sub-Department, Sechenov First Moscow State Medical University, Head of Research and Education Center, Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Co-Chair of Young Researchers' Contest
Victor I. Panfilov	Professor, Head of sub-Department of Biotechnology of Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Victor A. Polyakov	Academician of RAS, Director of FGBNU VNIIPBT
Vladimir V. Poroykov	Professor, Head of Bioinformatics Section, Head of Laboratory of Structural and Functional Design of Pharmaceuticals, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
Galina V. Sedelnikova	Professor, Deputy Director, Central Research Institute of Geological Exploration of Non-Ferrous and Noble Metals
Vitaly I. Shvets	Bionanotechnology, Lomonosov State University of Fine Chemical Technologies (MITKh), Chair of Young Researchers' Contest
Michail I. Shtilman	Grand PhD (Chemistry), professor, D.I. Mendeleyev National University of Chemical Technology
Anna Yu. Sorokina	Grand PhD (Biology), Deputy director of Department of Coordination and Operational Support to Scientific Research Organizations, Federal Agency for Scientific Organizations
Igor A. Tikhonovich	Academician of RAS, Director, FGBNU National Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg
Dmitry I. Tsyganov	Grand PhD (Technology), Professor, Deputy Head of Department, Federal Agency for Research Organizations
Victor A. Tutelian	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director, FGBNU Research Institute of Nutrition
Valentin V. Vlasov	Academician of RAS, Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Alexander S. Yanenko	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director of FGUP GosNIIgenetica State Research Center

ПРОГРАММНЫЙ КОМИТЕТ

Петров Рэм Викторович	академик РАН, почетный председатель
Варфоломеев Сергей Дмитриевич	член-корр. РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
Быков Валерий Алексеевич	академик РАН, советник Президиума РАН, Главный научный сотрудник ФГБНУ Всероссийский институт лекарственных растений, председатель Организационного комитета
Арчаков Александр Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, сопредседатель Оргкомитета
Алешников Владимир Евгеньевич	директор конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» и выставки «Мир биотехнологии-2017», ответственный секретарь Оргкомитета
Власов Валентин Викторович	академик РАН, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
Градова Нина Борисовна	профессор, д.б.н., кафедра биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева
Дзантиев Борис Борисович	профессор,зам.директора Института биохимии им. А.Н.Баха
Дыгай Александр Михайлович	академик РАН, научный руководитель ФГБУ «Научно-исследовательский институт фармакологии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Томск
Евтушенко Евгений Геннадьевич	ассистент кафедры химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова
Егоров Алексей Михайлович	академик РАН, профессор, заведующий лабораторией инженерной энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
Зиновьева Наталия Анатольевна	академик РАН, член Президиума РАН, директор ВИЖ им. Л.К. Эрнста
Золина Галина Дмитриевна	директор Департамента научно-технологической политики и образования Минестерства сельского хозяйства РФ
Кирпичников Михаил Петрович	академик РАН, декан биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
Клячко Наталья Львовна	д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, заместитель директора Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ

Ковальчук Михаил Валентинович	член-корр. РАН, директор Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
Колчанов Николай Александрович	академик РАН, директор Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
Красильников Игорь Викторович	д.б.н., профессор, заместитель директора по инновациям и международным отношениям ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, г. Санкт-Петербург
Крюков Сергей Вениаминович	д.т.н., председатель Совета директоров ОАО «Биофарм»
Курочкин Илья Николаевич	д.х.н., профессор, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Легонькова Ольга Александровна	д.т.н., зав. лабораторией ФГБУ «Институт хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России
Лисицын Андрей Борисович	академик РАН, член Президиума РАН, директор ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова
Лукомец Вячеслав Михайлович	академик РАН, ректор Российского государственного аграрного университета - МСХА им.К.А.Тимирязева
Мартынов Александр Игоревич	к.м.н., первый заместитель директора ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
Мартынюк Александр Александрович	директор Всероссийского института лесоводства и механизации лесного хозяйства
Медведев Алексей Михайлович	первый заместитель руководителя ФАНО России
Меньшутина Наталия Васильевна	профессор, директор Российско-Швейцарского учебно-научного центра трансфера фармацевтических биотехнологий, РХТУ им. Д.И. Менделеева
Мирошников Анатолий Иванович	академик РАН, член Президиума РАН, зам. директора Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, декан факультета Биотехнологии МГУ им. М.В.Ломоносова
Нетесов Сергей Викторович	член-корр. РАН, проректор по научной работе Новосибирского Государственного Университета, г. Новосибирск
Овчинникова Татьяна Владимировна	профессор кафедры биотехнологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, руководитель Научно-образовательного центра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, сопредседатель конкурса молодых ученых
Огородова Людмила Михайловна	член-корр. РАН, зам. министра Минобрнауки РФ

Панфилов Виктор Иванович	профессор, зав. кафедрой биотехнологии, РХТУ им. Д.И. Менделеева
Петров Владимир Иванович	академик РАН, ректор Волгоградского государственного медицинского университета
Поляков Виктор Антонович	академик РАН, директор ГНУ ВНИИПБТ
Попов Владимир Олегович	член-корр. РАН, директор Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Поройков Владимир Васильевич	профессор, заведующий отделом биоинформатики Институт биомедицинскокй химии им.В.Н. Ореховича
Романовский Михаил Юрьевич	д.ф.м.н., начальник Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере наук ФАНО России, сопредседатель Оргкомитета
Северин Евгений Сергеевич	член-корр. РАН, генеральный директор ВНЦ молекулярной диагностики
Седельникова Галина Васильевна	профессор, заместитель директора Центрального научно-исследовательского геологоразведочного института цветных и благородных металлов
Середенин Сергей Борисович	академик РАН, научный руководитель ФГБУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»
Систер Владимир Григорьевич	член-корр. РАН, зав. каф. «Процессы и аппараты химической технологии» МПУ (МАМИ)
Сорокина Анна Юрьевна	к.б.н., заместитель начальника отдела координации деятельности научных центров Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере наук ФАНО России
Скрябин Константин Георгиевич	академик РАН, директор Центра «Биоинженерия» РАН
Титов Евгений Иванович	академик РАН, заведущий кафедрой Технологии и биотехнологии продуктов питания животного происхождения МГУПП
Тихонович Игорь Анатольевич	академик РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», И.о. декана Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Президент Вавиловского общества генетиков и селекционеров
Тутельян Виктор Александрович	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель ФГУП « ФИЦ питания и биотехнологии»
Усанов Сергей Александрович	член-корр. НАН Беларуси, член Президиума НАН Беларуси, директор Института биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Хаитов Рахим Мусаевич	академик РАН, ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ
Хамитов Равиль Авгатович	генеральный директор ООО «МБЦ «Генериум»
Харитонов Владимир Дмитриевич	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИ молочной промышленности
Харченко Петр Николаевич	академик РАН, научный руководитель Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии
Чехонин Владимир Павлович	академик, член Президиума РАН, руководитель Отдела и зав. кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова, сопредседатель Программного комитета
Цыб Сергей Анатольевич	к.э.н., зам.министра Минпромторга РФ
Цыганов Дмитрий Игоревич	д.т.н., профессор, зам.начальника управления ФАНО России
Швец Виталий Иванович	академик РАН, Завкафедрой биотехнологии и бионанотехнологии Московского технологического университета (МИРЭА, МГУПИ, МИТХТ), председатель конкурса молодых ученых
Шестибратов Константин Александрович	к.б.н., руководитель группы лесной биотехнологии Филиала ИБХ, г. Пущино
Ширяева Ирина Андреевна	начальник Управления экологической политики Департамента природопользования и охраны окружающей среды города Москвы
Шоба Сергей Алексеевич	член-корр. РАН, декан факультета почвоведения, МГУ им. М.В. Ломоносова
Юдин Борис Григорьевич	член-корр. РАН, руководитель проекта ЮНЕСКО «Биоэтический форум»
Яруллин Рафинат Саматович	генеральный директор ОАО «Татнефтехиминвест-Холдинг», Республика Татарстан
Яненко Александр Степанович	д.б.н., профессор, зам. директора ФГУП ГНЦ ГосНИИгенетика

PROGRAM COMMITTEE

Ram V. Petrov	Academician of the Russian Academy of Sciences, Advisor to the Russian Academy of Sciences, Chair of the Program Committee
Sergey D. Varfolomeyev	Corresponding Member of RAS, Research Head of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Co-Chair of the Program Committee
Valery A. Bykov	Academician, VILAR Institute, Chair of the Organizing Committee
Alexander I. Archakov	Academician, Member of the Presidium of the RAS, Academic Leader of Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, the Russian Academy of Medical Sciences, Co-Chair of the Organizing Committee
Vladimir Y. Aleshnikov	General Director, LLC Expo-Biochem-Technologies, Executive Secretary of the Organizing Committee
Vladimir P. Chekhonin	Academician, Member of the Presidium of RAS, Section Leader and Head of the Medical Nanobiotechnologies sub-Department, Pirogov Russian State Medical University, Co-Chair of the Program Committee
Nina B. Gradova	Professor, Grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Alexander M. Dygay	Academician of RAS, Director of FGBU Pharmacology Research Institute, Siberian Section of RAS, Tomsk
Boris B. Dzantiev	Professor, deputy director of A.N. Bach Institute of Biochemistry
Yevgeny G. Evtushenko	teaching assistant Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University
Alexey M. Yegorov	Academician of RAS, Professor, Head of Engineering Enzymology Laboratory, Chemical Department, Lomonosov Moscow State University
Natalia A. Zinovyeva	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director of Ernst FGBNU VIZh, Dubrovitsy
Rahim M. Khaitov	Academician of RAS, Academic Leader, FGBU GNC Institute of Immunology, Federal Agency for Medicine and Biology
Pyotr N. Kharchenko	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural Biotechnology
Vladimir D. Kharitonov	Academician of RAS, FGBNU National Institute of Dairy Industry
Mikhail P. Kirpichnikov	Academician of RAS, Dean of Department of Biology, Lomonosov Moscow State University
Mikhail V. Kovalchuk	Corresponding Member of RAS, Director, Kurchatov Institute National Research Center

Nikolay A. Kolchanov	Academician of RAS, Director of FGBUN Institute of Cytology and Genetics, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Igor V. Krasilnikov	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director for Innovations and International Relations, FGUP SPbNIIVS, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg
Natalia L. Klyachko	Grand PhD (Chemistry), Professor, Head of Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University, deputy director of MSU Nanotechnology Education and Research Center
Sergey V. Kryukov	Grand PhD (Technology), Chair of the Board of Directors, OAO Biopharm
Ilya N. Kurochkin	Grand PhD (Chemistry), Professor, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
Olga A. Legonkova	Grand PhD (Technology), Head of Laboratory, A.V. Vishnevsky Institute of Surgery FSHE, RF Ministry of Health
Andrey B. Lisitsyn	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director of Gorbatov FGBNU VNIIMP
Vyacheslav M. Lukomets	Academician of RAS, Rector of K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University (MSKhA), Chair of the Conference's Program Committee
Alexander I. Martynov	PhD (Medicine), First Deputy Director of FGBU Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology
Alexander A. Martynuk	Director of All-Russian Research Institute of Silviculture and Mechanisation of Forestry
Natalia V. Menshutina	Professor, Director of International Training and Research Center for Transfer of Pharmaceutical Biotechnologies, Mendeleyev Russian University of Chemical Technologies
Alexey M. Medevedev	first duputy director of Federal Agency for Scientific Organizations
Anatoly I. Miroshnikov	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Deputy Director of Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Chair of the Academic Council of Pushino Research Center of RAS
Sergey V. Netyosov	Corresponding Member of RAS, Pro-Rector for Research, Novosibirsk State University, Novosibirsk
Tatiana V. Ovchinnikova	Professor, Biotechnology sub-Department, Sechenov First Moscow State Medical University, Head of Research and Education Center, Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Co-Chair of Young Researchers' Contest
Lyudmila M. Ogorodova	Corresponding Member of RAS, Deputy Minister of Education and Science of the Russian Federation

Victor I. Panfilov	Professor, Head of sub-Department of Biotechnology of Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Vladimir I. Petrov	Academician of RAS, Rector of Volgograd State Medical University, Volgograd
Victor A. Polyakov	Academician of RAS, Director of FGBNU VNIIPBT
Vladimir O. Popov	Corresponding Member of RAS, Director of Bakh Institute of Biochemistry, RAS, Coordinator of Bioindustry and Bioresources BioTech-2030 Technological Platform
Vladimir V. Poroykov	Professor, Head of Bioinformatics Section, Head of Laboratory of Structural and Functional Design of Pharmaceuticals, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
Michail Yu. Romanovskiy	Grand PhD (Physics and Mathematics), Head of Department of Coordination and Operational Support to Scientific Research Organizations, Federal Agency for Scientific Organizations, Co- Chair of the Organizing Committee
Yevgeny S. Severin	Corresponding Member of RAS, General Director of Molecular Diagnostics and Treatment National Research Center
Galina V. Sedelnikova	Professor, Deputy Director, Central Research Institute of Geological Exploration of Non-Ferrous and Noble Metals
Sergey B. Seredenin	Academician of RAS, Director, FGBU Zakusov Research Institute of Pharmacology
Vitaly I. Shvets	Bionanotechnology, Lomonosov State University of Fine Chemical Technologies (MITKh), Chair of Young Researchers' Contest
Constantine A. Shestibratov	PhD (Biology), Forestry Biotechnology Team Lead, Pushino Branch of Institute of Bio-Organic Chemistry, Pushino
Irina A. Shiryayeva	Head, Directorate of Environmental Policy, Department of Nature and Environmental Protection, Moscow City Government
Sergey A. Shoba	Corresponding Member of RAS, Dean of Edaphology Department, Lomonosov Moscow State University
Vladimir G. Sister	Corresponding Member of RAS, Head of sub-Department of Engineering Ecology of Urban Environment, Director of Institute of Alternative Energy Chemical Technology, University of Machine Engineering
Constantine G. Skryabin	Academician of RAS, Director, Bioengineering Center, RAS
Anna Yu. Sorokina	Grand PhD (Biology), Deputy director of Department of Coordination and Operational Support to Scientific Research Organizations, Federal Agency for Scientific Organizations
Yevgeny I. Titov	Academician of RAS, Director, Institute of Applied Biotechnology

Igor A. Tikhonovich	Academician of RAS, Director, FGBNU National Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg
Dmitry I. Tsyganov	Grand PhD (Technology), Professor, Deputy Head of Department, Federal Agency for Research Organizations
Victor A. Tutelian	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director, FGBNU Research Institute of Nutrition
Sergey A. Usanov	Corresponding Member of National Academy of Sciences of Belarus, Member of the Presidium of NAS, Director, Institute of Bio-Organic Chemistry, Minsk, Belarus
Valentin V. Vlasov	Academician of RAS, Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
Boris G. Yudin	Corresponding Member of RAS, Project Manager, UNESCO Bioethics Forum
Rafinat S. Yarullin	General Director, OAO Tatneftekhiminvest-Holding, Republic of Tatarstan
Alexander S. Yanenko	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director of FGUP GosNIIgenetica State Research Center

КОНКУРСНАЯ КОМИССИЯ

СОПРЕДСЕДАТЕЛИ КОНКУРСНОЙ КОМИССИИ:

Швец Виталий Иванович	д.х.н., академик, заведующий кафедрой биотехнологии МИТХТ им. М.В.Ломоносова
Овчинникова Татьяна Владимировна	д.х.н., профессор кафедры биотехнологии Первого МГМУ им. И.М.Сеченова, руководитель Учебно-научного центра ИБХ им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

ЧЛЕНЫ КОНКУРСНОЙ КОМИССИИ:

Булаев Александр Генрихович	к.б.н., и.о. зав. лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов, ФИЦ Биотехнологии РАН
Власов Валентин Викторович	академик РАН, директор Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
Гаппаров Минкаил Гаджиевич	д.м.н., член-корр. РАН, зам.директора НИИ питания РАМН
Глазко Валерий Иванович	д.с.-х.н., академик, профессор Российского государственного аграрного университета им. К.А.Тимирязева
Градова Нина Борисовна	д.б.н., профессор кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И.Менделеева
Дзантиев Борис Борисович	д.х.н., профессор, зам. директора Института биохимии им. А.Н.Баха РАН
Егоров Алексей Михайлович	д.б.н., академик, профессор, зав. лабораторией химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова
Клячко Наталья Львовна	д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, заместитель директора Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ
Курочкин Илья Николаевич	д.х.н., профессор, зав. лабораторией экобиокатализа химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова
Курек Денис Вячеславович	к.х.н., генеральный директора Future Biotech
Мартынов Александр Игоревич	к.м.н., Первый зам. директора ГНЦ РФ «Институт иммунологии» ФМБА РФ

Меньшутина Наталья Васильевна	профессор, директор Российско-Швейцарского учебно-научного центра трансфера фармацевтических биотехнологий, РХТУ им. Д.И. Менделеева
Орешкин Евгений Николаевич	первый вице-президент консорциума «Биомак»
Римарева Любовь Вячеславовна	член-корреспондент РАН, д.т.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБНУ ВНИИПБТ
Панфилов Виктор Иванович	д.т.н., профессор, проректор и зав. кафедрой биотехнологии РХТУ им. Д.И.Менделеева
Поройков Владимир Васильевич	профессор, заведующий отделом биоинформатики Научно-исследовательского Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН

СОВЕТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ РАН

Титов Евгений Иванович	академик, МГУ прикладной биотехнологии
Харитонов Владимир Дмитриевич	д.т.н., академик, профессор, ГНУ ВНИИ молочной промышленности РАСХН
Харченко Петр Николаевич	д.б.н., академик, директор ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН
Цыганов Дмитрий Игоревич	д.т.н., профессор, зам.начальника управления ФАНО РФ
Яненко Александр Степанович	д.б.н., профессор, зам. директора ГНЦ РФ ФГУ«ГосНИИгенетика»

CONTEST COMMITTEE

CO-CHAIR OF CONTEST COMMITTEE	
V.I. Shvets	Bionanotechnology, Lomonosov State University of Fine Chemical Technologies (MITKh), Chair of Young Researchers' Contest
T.V. Ovchinnikova	Professor, Biotechnology sub-Department, Sechenov First Moscow State Medical University, Head of Research and Education Center, Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Co-Chair of Young Researchers' Contest

MEMBERS OF CONTEST'S COMMITTEE:	
A.G. Bulaev	PhD (Biology), acting Head of Chemolithotrophic Microorganism Laboratory, Federal Research Center for Biotechnology of RAS
V.V. Vlasov	Academician of RAS, Director of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
G.M. Gapparov	Grand PhD (Medicine), Corresponding Member of RAS, deputy director of FGBNU Research Institute of Nutrition
V.I Glazko	PhD (Agriculture), academician, professor K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University (MSKhA)
N.B. Gradova	Professor, Grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
Boris B.Dzantiev	Professor, deputy director of A.N. Bach Institute of Biochemistry
A.M. Yegorov	Academician of RAS, Professor, Head of Engineering Enzymology Laboratory, Chemical Department, Lomonosov Moscow State University
P.N. Kharchenko	Academician of RAS, Director, National Research Institute of Agricultural
V. D. Kharitonov	Academician of RAS, FGBNU National Institute of Dairy Industry
N.L. Klyachko	Grand PhD (Chemistry), Professor, Head of Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University, deputy director of MSU Nanotechnology Education and Research Center
I.N. Kurochkin	Grand PhD (Chemistry), Professor, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
D.V. Kurek	PhD (Chemistry), General Director Future Biotech

A.I. Martynov	PhD (Medicine), First Deputy Director of FGBU Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology
N.V. Menshutina	Professor, Director of International Training and Research Center for Transfer of Pharmaceutical Biotechnologies, Mendeleyev Russian University of Chemical Technologies
E.N. Oreshkin	PhD (Chemistry), First Vice President, Biomak Consortium
V.I. Panfilov	Professor, Head of sub-Department of Biotechnology of Mendeleyev Russian University of Chemical Technology
V.V. Poroykov	Professor, Head of Bioinformatics Section, Head of Laboratory of Structural and Functional Design of Pharmaceuticals, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
L.V. Rimareva	Correspondent Member of RAS, Grand PhD (Technical Science), professor, deputy director of FGBNU VNIIPBT

COUNCIL OF YOUNG SCIENTISTS OF RAS

Y.I. Titov	Academician of RAS, Director, Institute of Applied Biotechnology Biotechnology
D.I. Tsyganov	Grand PhD (Technology), Professor, Deputy Head of Department, Federal Agency for Research Organizations
A.S. Yanenko	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director of FGUP GosNIIgenetica State Research Center

СЕКЦИЯ

ВЕСЬ СПЕКТР БИОТЕХНОЛОГИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

SECTION

THE ENTIRE SPECTRUM OF AGRICULTURAL ANIMAL BIOTECHNOLOGY

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 636.2:612.621

ОТ ООЦИТА К ЭМБРИОНУ: ПУТИ УНИФИКАЦИИ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО СОЗРЕВАНИЯ ЖЕНСКИХ ГАМЕТ BOS TAURUS

Кузьмина Т.И.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных» 196625, Санкт-Петербург, поселок Тярлево, Московское шоссе, дом 55а. e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Унифицирована система культивирования ооцитов Bos taurus, не завершивших фазу роста in vivo, путем превентивной ВСВ-диагностики исходной популяции донорских ооцитов, модификацией среды для экстракорпорального созревания введением 50 нг/мл бычьего пролактина и пролонгированием времени культивирования до 30 часов. Уровень полученных эмбрионов на стадии бластоцисты составил 30%. **Ключевые слова**: ооцит; ВСВ-диагностика; эмбрион; пролактин

Эффективность инновационных клеточных репродуктивных технологий (получение эмбрионов in vitro, клонирование, трансгенез, получение линий эмбриональных стволовых клеток) предопределяется, прежде всего, качеством донорских ооцитов и адекватностью системы их экстракорпорального дозревания условиям формирования яйцеклетки in vivo. Причина низкого выхода эмбрионов из ооцитов, созревших и оплодотворенных in vitro, - гетерогенность исходной популяции женских гамет. Превентивная ВСВ-диагностика исходной популяции донорских ооцитов, позволяющая идентифицировать функциональный статус ооцитов (растущие или завершившие фазу роста), выявила высокие потенции ооцитов, тестированных как завершившие фазу роста in vivo, к созреванию и оплодотворению in vitro [1]. Модификация системы экстракорпорального дозревания ооцитов, не завершивших фазу роста in vivo, путем введения в среду дозревания 50 нг/мл бычьего пролактина и пролонгированием времени культивирования до 30 часов позволила значительно повысить уровень дробления зародышей (78% против 63% в контроле, $P<0,05$) и количество развившихся из них эмбрионов (30% против 12% в контроле, $P<0,01$) [2].

Литература.
1.Kuzmina T.I., X.Torner, H.Alm. Innovative embryotechnology in the reproduction of animals: from basic researches to practice. J. Adv. in science and technology agroindustrial.-2010. - № 4. - p. 66-68. 2.Кузьмина Т.И., Татарская Д.Н., Станиславович Т.И. Патент №2602448 «Способ экстракорпорального культивирования ооцитов коров».25.08. 2015.

UDC 636.2:612.621

FROM OOCYTE TO EMBRYO: THE PATH OF UNIFICATION OF THE IVM/IVF TECHNOLOGY IN BOS TAURUS

KuzminaT.I.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding;
196625, St. Petersburg, the village Tiarlevo, Moscow highway,55a. e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Key words: oocyte; BCB-diagnostics; embryo, prolactin

System of cultivation of bovine oocytes that have not finished growth phase in vivo had unificated. Preventive BCB-diagnostics were used before the extracorporeal maturation of oocytes. The medium of culture was modified by the addition of 50 ng/ml prolactin and the prolongation of the time of culture up 30 hours. The level of embryos on blastocyst stage had achieved up 30%.

The efficiency of innovative cell reproductive technologies (producing of embryos in vitro, cloning, transgenesis, obtaining embryonic stem cell lines) depending on the quality of the donor's oocytes and the adequacy of the in vitro maturation system to conditions of egg formation in vivo. One of the cause of the low yield of embryos from IVM/IVF oocytes is the heterogeneity of the initial population of oocytes that were aspirated from follicles. Preventive BCB- diagnostics that evaluate of the functional status of oocytes (growing oocytes or oocytes that have finished growth phase in vivo) had shown the high potency of oocytes that have finished growth phase in vivo for maturation and fertilization in vitro [1]. The IVM system of oocytes that have not finished growth phase in vivo was modernized by the addition of 50 ng/ml prolactin and prolongation of the time of culture up to 30 hours. The modernization of the system of cultivation of the oocytes that have not finished growth phase in vivo resulted in a significant increasing the level of cleaved oocytes (78% versus 63% in controls, P <0, 05) and the embryos on the blastocyst stage (30% versus 12% in controls, P <0,01) [2].

References:
1.Kuzmina T.I., X.Torner, H.Alm Innovative embryotechnology in the reproduction of animals: from basic researches to practice. J. Adv. in science and technology agroindustrial.-2010. - № 4. - p. 66-68. 2.Kuzmina T.I., Tatarskaya D.N., Stanislavovich T.I. Patient №2602448 «Method of extracorporeal cultivation of bovine oocytes». 25.08. 2015.

УДК 636.294:575.174

ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ ЯКУТИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ АНАЛИЗА ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

Доцев А.В., Харзинова В.Р., Охлопков И.М., Федоров В.И., Виммерс К, Рейер Х., Брем Г., Зиновьева Н.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», Московская область, Дубровицы, Россия
142132, Московская область, Подольский район, п.Дубровицы, д.60
e-mail: asnd@mail.ru

С помощью анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) была изучена степень генетического разнообразия дикой и домашних популяций северного оленя Якутии.

Ключевые слова: северный олень, SNP, биоразнообразие, популяция

Территория республики Саха (Якутия) традиционно является местом обитания северных оленей. Дикий северный олень в Якутии представлен несколькими тундровыми и таежными популяциями, самой многочисленной из которых является лено-оленекская. Ее численность, согласно данным авиаучета 2013 г составляет 90-95 тыс. особей. Также в республике занимаются разведением 3-х пород домашнего оленя: эвенской, эвенкийской и чукотской. Для оценки состояния популяции в текущий момент и представления направления ее дальнейшего развития необходимо изучение структуры популяции. В настоящее время с появлением методики использования анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) представляется

возможность дать точную генетическую характеристику популяций. В связи с этим целью данной работы являлось изучение генетического разнообразия домашних и диких северных оленей, населяющих территорию республики Саха (Якутия).

В качестве биологического материала были использованы образцы тканей домашнего северного оленя эвенской (EVN) (n=14), эвенкийской (EVK) (n=16) и чукотской (CHU) (n=16) пород, а также дикого северного оленя лено-оленекской популяции (WLD) (n=15). Для выделения ДНК использовали колонки «Nexttec» (Германия). Генотипирование проводили с помощью чипа средней плотности Bovine SNP50 BeadChip, фирмы Illumina. После проведения контроля качества (MAF = 0.05) осталось 312 полиморфных локусов, которые были использованы для дальнейших анализов. Для описания генетической структуры популяций отбирались животные, для которых коэффициент членства Q в своем кластере составлял не менее 90%. Из пары полных сибсов оставляли только один образец. Статистический анализ проводили с помощью программ: PLINK 1.07, ML-Relate, STRUCTURE 2.3.4, GENETIX 4.05, HP-Rare 1.1.

После исключения из анализа животных, не подходящих выше описанным требованиям, для оценки биоразнообразия было отобрано следующее количество проб: EVN – 8, EVK – 11, CHU – 8 и WLD – 12. Кластерный анализ показал четкую дифференциацию изучаемых популяций. При K=2 отдельный кластер образовала чукотская порода, при K=3 образовался кластер с лено-оленекской популяцией. При K=4 было показано, что все популяции имеют свой уникальный генетический профиль. Для визуализации положения исследуемых групп в генетическом пространстве было проведено многомерное шкалирование (MDS), которое также показало, что все популяции образуют свои кластеры. Анализ попарных генетических дистанций Fst показал, что наибольшее расстояние наблюдается между CHU и WLD – 0.134, а наименьшее между EVN и EVK – 0.061. Следует также отметить, что для EVN и EVK генетические расстояния с другой домашней формой CHU были выше (0.124 и 0.118, соответственно), чем с дикой формой (0.078 и 0.076). Наибольший уровень ожидаемой гетерозиготности скорректированной для малых выборок отмечался для CHU - 0.291±0.011, а наименьший для EVN и WLD – 0.261±0.011 и 0.261±0.010. Для EVK этот показатель составил - 0.279±0.010. Скорректированный методом рарификации, показатель аллельного разнообразия был выше у EVK и CHU - 1.808±0.021 и 1.795±0.023 по сравнению с EVN и WLD - 1.740±0.025 и 1.764±0.022.

Таким образом, нами было показано, что все четыре исследованных популяции обладают своим уникальным генетическим профилем и характеризуются достаточно высоким уровнем аллельного разнообразия.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 14-36-00039.

STUDY OF BIODIVERSITY OF REINDEER POPULATIONS INHABITING YAKUTIA USING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM ANALYSIS

Dotsev A.V., Kharzinova V.R., Okhlopkov I.M., Fedorov V.I., Wimmers K., Reyer H., Brem G., Zinovieva N.A.

All-Russia research institute of animal husbandry named after academy member L.K. Ernst, Moscow region, Dubrovitsy, Russia
142132, Moscow region, Podolsk district, Dubrovitsy – 60
e-mail: asnd@mail.ru

The degree of genetic diversity of wild and domestic reindeer populations using single nucleotide polymorphism (SNP) analysis was studied.

Key words: reindeer, SNP, biodiversity, population

The territory of the Republic Sakha (Yakutia) has traditionally been home to reindeer. Several tundra and taiga populations, the largest of which is the Leno-Olenek, represent wild reindeer in Yakutia. According to a 2013 aerial survey its numbers were estimated as 90-95 thousand individuals. Domestic reindeer herding in the Republic is represented by three breeds: Even, Evenk and Chukchi. For assessment of population's actual state and its further rational development, it is necessary to study population structure. Currently, with the advent of single nucleotide polymorphisms (SNP) analysis techniques it became possible to define precise genetic characteristics of populations. In this regard, our work was aimed at investigating genetic diversity of domesticated and wild reindeer inhabiting the territory of the Republic Sakha (Yakutia).

Reindeer tissue samples of the Even (EVN) (n = 14), Evenk (EVK) (n = 16), and Chukotka (CHU) (n = 16) breeds, as well as of Leno-Olenek population (WLD) (n = 15) were used as biological material. «Nexttec»

system (Germany) was used for DNA isolation. Genotyping was performed using medium density Bovine SNP50 BeadChip (Illumina). After quality control (MAF = 0.05), 312 remained polymorphic loci were selected for subsequent analyzes. In order to describe a population genetic structure only individuals assigned to the given population with probability (Q) of at least 90% were selected. One randomly chosen individual of each full-sibling pair was excluded from the dataset. Statistical analysis was performed using software: PLINK 1.07, ML-Relate, STRUCTURE 2.3.4, GENETIX 4.05, HP-Rare 1.1.

After removing individuals that do not fit our criteria for assessment of biodiversity the number of selected samples in groups were as follows: EVN - 8, EVK - 11, CHU - 8 and WLD - 12. Cluster analysis revealed a clear differentiation of the studied populations. At K = 2 CHU formed a separate cluster and at K = 3 WLD was differentiated. At K = 4, it was shown that all populations have unique genetic profile. Multidimensional scaling (MDS) was conducted for visualization of the studied groups' position in genetic space also showed that all populations form their own clusters. Analysis of pairwise FST genetic distances showed that the greatest distance was observed between CHU and WLD - 0.134, and the smallest between EVN and EVK - 0.061. It should also be noted that for EVN and EVK genetic distances with another domestic population CHU were higher (0.124 and 0.118, respectively) as compared to WLD (0.078 and 0.076). The highest level of unbiased expected heterozygosity was observed for CHU - 0.291 ± 0.011, and the lowest for EVN and WLD - 0.261 ± 0.011 and 0.261 ± 0.010. For EVK this index was - 0.279±0.010. Rarified allelic richness was higher in EVK and CHU - 1.808±0.021 and 1.795±0.023 than in EVN and WLD populations - 1.740±0.025 and 1.764±0.022.

Thus, our study has shown that all four studied populations have their own unique genetic profile and characterized by rather high level of allelic diversity.

The research was conducted under financial support of Russian Scientific Foundation (project № 14-36-00039).

УДК 636.082

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНТРОДУКЦИИ ДИКИХ ВИДОВ НА ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ НА ПРИМЕРЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА OVIS

Денискова Т. Е.[1], Багиров В.А.[1], Брем Г.[2], Доцев А.В.[1], Зиновьева Н. А.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», (ВИЖ имени Л.К. Эрнста), п. Дубровицы, Россия 142132, Московская область Подольский р-н, пос. Дубровицы, д. 60
[2]Институт животноводства и генетики, Ветеринарно-медицинский университет, г. Вена, Австрия A-1210 Vienna, Veterinaerplatz, 1.
e-mail: horarka@yandex.ru

С помощью 11 микросателлитных локусов нами была изучена интродукция архара на аллельное и генетическое разнообразие домашних овец на примере межвидовых гибридов F2-F3. Показано, что гибриды характеризуются более высоким уровнем гетерозиготности по сравнению с исходной материнской формой.

Ключевые слова: STR-маркеры; интродукция; межвидовые гибриды

Одной из негативных сторон интенсификации сельскохозяйственного производства является падение уровня гетерозиготности внутри основных используемых пород, а, следовательно, происходит снижение биоразнообразия. В будущем нарастание подобных тенденций может привести к вырождению животных вследствие инбридинга и ухудшение их продуктивных качеств. В качестве метода повышения генетической изменчивости сельскохозяйственных животных может быть использована гибридизация с дикими сородичами. Целью нашей работы стало изучение влияния интродукции диких видов на генетическое разнообразие домашних животных. В качестве материалов исследования нами были использованы образцы ткани межвидовых гибридов домашней овцы (O. aries) и архара (O. ammon), полученных в рамках выполнения проекта «Изучение, сохранение и рациональное использование биоразнообразия животных как основы получения здоровой, безопасной и высококачественной пищи» (РНФ № 14-36-00039). Выборка включала группы гибридов F2 (n=45) и F3(n=25), а также романовских овец (n=46) в качестве представителей материнской формы. Кроме того, нами были привлечены микросателлитные профили архара (родоначальник, отцовская дикая форма) и гибрида F1, полученные ранее, для изучения интродукции «диких» аллелей. Выделение ДНК из биологического

материала и проведение ПЦР-амплификации по 11 STR-локусов (BLT001B, CSRD247, FCB20, CSAP36, MAF65, McM147, OarCP49, D5S2, HSC, BMS2213 и INRA23) проводилось по общепринятым методикам. Разделение ПЦР-продуктов было осуществлено на генетическом анализаторе ABI3130xl (Applied Biosystems, Life Technologies, США). Статистические показатели были вычислены в программе GenAIEx 6.501 (5). Исследование STR-профилей по 11 локусам в поколениях гибридов (F2-F3) в сравнении с исходной породой романовских овец (ROM) позволило проследить наследование аллелей, полученных от дикого вида (ARG) в поколениях гибридов. Так, суммарная частота аллелей, полученных гибридом F1 от дикого вида составила 6,50 (архар передал половину своих аллелей по каждому из 11 локусов потомку). В популяции ROM один из 11 аллелей ARG не встречался, а частота остальных варьировала от 0,011 до 0,144 и в сумме составила 0,69 ($p<0,001$). В поколениях гибридов наблюдалось поступательное снижение суммарной частоты аллелей ARG до 3,91 в поколении F2 и до 1,85 в поколении F3. Это обуславливало снижение генетических различий с ROM: так, значение генетических дистанций Нея между родительскими формами (ARG и ROM) составило 1,59, в то время как значения данного показателя между гибридами F1, F2 и F3 по сравнению с ROM составили, соответственно, 0,81, 0,36 и 0,29. Аналогичная тенденция наблюдалась по показателю FST при попарном сравнении ARG, F1, F2 и F3 с ROM: 0,222, 0,174, 0,052, 0,030. Оценка эффективного числа аллелей на локус, как меры генетического разнообразия, показало постепенное повышение данного показателя у гибридов с течением поколений, что обусловлено закреплением аллелей диких видов. У гибридов F3 эффективное число аллелей на локус составило 6,00, что было выше по сравнению с романовскими овцами (5,37). Исходно архар, используемый в качестве отцовской формы, характеризовался более высокими значения наблюдаемой степени гетерозиготности по сравнению с романовскими овцами: 0,818 против 0,644, что обусловило поступательное снижение данного показателя в поколениях гибридов, получаемых возвратным скрещиванием с романовскими овцами. Вместе с тем, в поколении F3, являющимся базовым для разведения «в себе», отмечается более высокий уровень гетерозиготности по сравнению с ROM: 0,684 против 0,644. Таким образом, прилитие крови диких видом может стать способом повышения генетического разнообразия у домашних животных и создания генетической основы для создания новых селекционных форм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 14-36-00039.

UDC 636.082

STUDY OF EFFECT OF WILD SPECIES INTRODUCTION ON GENETIC DIVERSITY OF FARM ANIMALS BY AN EXAMPLE OF THE REPRESENTATIVES OF GENUS OVIS

Deniskova T. E[1], Bagirov V.A.[1], Brem G.[2], Dotsev A.V.[1], Zinovieva N. A[1]

[1]Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Research Institute of Animal Husbandry Named After Academician LK Ernst», Dubrovitzy sett., Russia
142132, Moscow region Podolsk district, Dubrovitzy sett. 60
[2]Institute of Animal Breeding and Genetics, VMU, Vienna, Austria.
A-1210 Vienna, Veterinaerplatz, 1.
e-mail: horarka@yandex.ru

Using 11 microsatellite loci, we studied the introduction of argali blood on allelic and genetic diversity of domestic sheep on example of interspecific hybrids F2-F3. It is shown that the hybrids are characterized by a higher level of heterozygosity in comparison with original maternal form.

Key words: STR-markers; introduction; interspecific hybrids

One of the negative aspects of agricultural production intensification is a reduction in heterozygosity level within the most popular farm breeds, and, consequently, biodiversity is decreasing. In the future, the growth of such trends can lead to animal's degeneration, caused by inbreeding, and deterioration of their productive qualities. The hybridization with wild relatives may be used as a method of increasing genetic variability in farm animals (1-4). In this regard, the aim of our work was to study the effect of wild species introduction on the genetic diversity of domestic animals. For our research, we used tissue samples of the interspecific hybrids between domestic sheep (O. aries) and argali (O. ammon), obtained as the part of the project «Study, conservation and sustainable use of

biodiversity of animals as a basis for obtaining a healthy, safe and high quality food» (RSF № 14-36-00039). The sample included the hybrids F2 (n = 45) and F3 (n = 25) and Romanov sheep (n = 46) as maternal form representatives. In addition, we used microsatellite profiles of argali (the founder, wild paternal form) and hybrid F1, obtained in our previous investigations, to study the introduction of «wild» alleles. An isolation of DNA from biological material and PCR amplification of 11 STR-loci (BLT001B, CSRD247, FCB20, CSAP36, MAF65, McM147, OarCP49, D5S2, HSC, BMS2213 and INRA23) were performed according to conventional techniques. Separation of the PCR products was done on genetic analyzer ABI3130xl (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Statistical indicators were calculated in the program GenAIEx 6.501 (5). Analysis of STR-profiles for 11 loci in hybrid generations (F2-F3) in comparison with original Romanov sheep (ROM) revealed that it is possible to trace an inheritance of alleles derived from wild species (ARG) in hybrids generations. Thus, total frequency of alleles, inherited by F1 hybrid from wild species, was 6.50 (argali passed on half of its alleles by each of 11 loci to the descendant). In the ROM population, one of the 11 ARG alleles was not found, and the frequency of the rest alleles ranged from 0.011 to 0.144 and composed totally 0,69 (p <0,001). We observed the progressive reduction of total frequency of the ARG alleles from 3.91 in the F2 generation to 1.85 in the F3 generation. This determined the reduction of genetic differences with ROM. Thus, the value of Nei genetic distances between parental forms (ARG and ROM) was 1.59, while the values of this indicator between hybrids F1, F2 and F3 in comparison with ROM were 0.81, 0.36 and 0.29, respectively. A similar trend was observed by pairwise FST values between ARG, F1, F2, F3 and ROM: 0,222, 0,174, 0,052, and 0,030, respectively. Estimation of the effective number of alleles per locus, as the measure of genetic diversity, showed a gradual increase of this indicator in the hybrids through the generations, what was caused by fixation of wild species alleles. The effective number of alleles per locus was 6.00 for F3 hybrids, which was higher in comparison with Romanov sheep (5.37). The argali, used as paternal form, was characterized by a high degree of observed heterozygosity in comparison with Romanov sheep: 0.818 vs. 0.644, which led to the progressive decline of this indicator through the generations of hybrids obtained by backcrossing with Romanov sheep. However, a high level of heterozygosity was detected in the F3 generation, which is the base for breeding «in itself,» in comparison with ROM: 0,684 against 0.644. Thus, the introduction of wild blood can be a way to increase the genetic diversity in domestic animals and to create a genetic basis for establishing new selection forms.

Study was performed under financial support of Russian scientific foundation, project № 14-36-00039.

УДК 636.5.082

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ СЕМЕНИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Волкова Н.А., Ветох Н.А., Жилинский М.А., Кленовицкий П.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы, МО, Россия
142132, МО, п. Дубровицы, д. 60
e-mail: baylar2@mail.ru

Низкая эффективность результатов криоконсервации генетического материала птиц является одной из нерешенных проблем современной биотехнологии. Результаты исследования показали, что в цикле замораживание-оттаивание происходит нарушение структуры мембран сперматозоидов.

Ключевые слова: криоконсервация, сперматозоид, птицы, мембрана сперматозоидов, подвижность сперматозоидов.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №16-16-04104.

Успехи селекции в области животноводства за последние годы во многом определяются использованием передовых методов биотехнологии, в том числе в области вспомогательной репродуктивной технологии. Вопросами криоконсервации семени и использования заморожено-оттаянного семени для искусственного осеменения занимаются более 50 лет, наиболее значительные успехи достигнуты в области молочного скотоводства. Применение вышеперечисленных технологий в птицеводстве носит органиченный характер. В связи с сокращением численности пород, в том числе локальных, в соответствии с ратификацией Международного соглашения о биоразнообразии в Рио-де-Жанейро в 1992 году, во многих странах создается криобанк генетического материала редких пород животных и птиц. Все перечисление факторы требуют разработки высокоэффективных технологий криоконсервации генетических материалов птиц. Сдерживающим фактором использования для искусственного

осеменения птиц заморожено-оттаянного семени птиц является значительное снижение биологической полноценности спермы в цикле замораживания и оттаивания.

Целью наших исследований являлось изучение влияния цикла замораживание-оттаивание на клеточные мембраны сперматозоидов петухов.

Исследования проводили в ФГБНУ Всероссийский НИИ животноводства им. академика Л.К. Эрнста. Сбор семени осуществляли 3 раза в неделю методом спинно-брюшинного массажа. Оценку подвижности сперматозоидов проводили с использованием CASA-технологию. Целостность мембран определяли методом суправитальной окраски.

Объем полученной спермопродукции в среднем составил 0,38±0,01 мл. Подвижность свежеполученных сперматозоидов составила 81,2±2,3%. При этом доля сперматозоидов с ненарушенной структурой мембраны достигала 85,7±3,6%. После цикла замораживания-оттаивания показатель подвижности сперматозоидов варьировал в зависимости от индивидуальных особенностей от 27 до 48% и составил в среднем 42,3±1,6%. Снижение данного показателя было обусловлено значительным нарушению структуры мембраны сперматозоидов: содержание сперматозоидов с нарушенной мембраной после оттаивания составило 58,3%.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что цикл замораживание-оттаивание семени петухов сопровождается повреждением целостности мембраны сперматозоидов.

UDC 636.5.082

CRYOPRESERVATION OF POULTRY SEMEN

Iolchiev B.S., Bagirov V.A., Volkova N.A., Vetokh A.N., Zhilinsky M.A., Klenovitsky P.M.

All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after academy member L.K.Ernst, Moscow region, settlement Dubrovitsy, Russia
142132, Moscow region, settlement Dubrovitsy, д. 60
e-mail: baylar2@mail.ru

Low efficiency of the results cryopreservation genetic material of birds is one of the unsolved problems of modern biotechnology. The study results showed that in freeze-thaw cycles is a violation of the sperm membrane structure.

Key words: cryopreservation, sperm, birds, the spermatozoa membrane, sperm motility

The research was conducted under financial support of Russian Scientific Foundation (project №16-16-04104)

Advances in the breeding in animal husbandry in recent years, are mainly determined by using advanced methods of biotechnology, including in the field of assisted reproductive technology. The issues of semen cryopreservation and use of frozen-thawed semen for artificial insemination are engaged more than 50 years, the most significant progress has been achieved in the field of dairy farming. The use of the above technologies in poultry farming is limited. In connection with the reduction of the breeds number, including local, in accordance with the ratification of international agreements on biodiversity in Rio de Janeiro in 1992, in many countries created cryobank of the genetic material rare species of animals and birds. All these factors require the development of highly efficient technologies cryopreservation genetic material of birds. The limiting factor for the use artificial insemination in poultry frozen-thawed semen of birds is a significant reduction in biological value of semen in a cycle of freezing and thawing.

The aim of our study was to investigate the effect of freeze-thaw cycle on the rooster spermatozoa cell membranes.

Research was carried out in All-Russia research institute of animal husbandry named after academy member L.K. Ernst. Collection of sperm was carried out 3 times per week by the method cerebro-peritoneal massage. Assessment of sperm motility was performed using CASA-technology. The integrity of the membranes was determined by supravital staining.

The volume obtained sperm on the average made 0,38 ± 0,01 ml. The mobility of freshly obtained spermatozoa was 81,2 ± 2,3%. The proportion of spermatozoa with intact membrane structure reached 85,7 ± 3,6%. After the freeze-thaw cycle indicator of sperm motility varied depending on the individual characteristics from 27 to 48% and was on average 42,3 ± 1,6%. The decline of this indicator was due to a significant disruption of the spermatozoa membrane struture: sperm count with impaired membrane after thawing was 58.3%.

Thus it can be concluded that the cycle of freeze-thaw rooster semen is accompanied by damage to the integrity of the spermatozoa membrane.

УДК 619:579.861.2:637.12+619:615.33

РАЗВИТИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ STAPHYLOCOCCUS AUREUS К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ.

Артемьева О.А., Никанова Д.А., Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л.К.Эрнста, Подольск, Россия
142132, Мсковская обл., г.о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60
e-mail:vijmikrob@mail.ru

Из молока высокопродуктивных клинически здоровых коров черно-пестрой голштинизированной породы выделены штаммы S. aureus. Проведена оценка результативности антибиотикотерапии. Изучено развитие резистентности выделенных штаммов к антибиотикам широкого спектра действия.

Ключевые слова: Staphylococcus aureus, мастит, резистентность к антибиотикам.

Развитие резистентности микроорганизмов к антибиотикам во многом определяет результативность ветеринарных мероприятий. Изучение антибиотикорезистентности, мониторинг стад и правильно разработанные схемы лечения — меры, которые помогут уменьшить риск распространения патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Мастит высокопродуктивных коров (основным возбудителем которого является Staphylococcus aureus) — одно из наиболее изученных заболеваний, однако эффективность борьбы с ним в молочном животноводстве остается низкой.

Целью нашей работы было изучение развития резистентности штаммов S. aureus, выделенных из молока клинически здоровых молочных коров центрального региона России.

Для исследования отбирали пробы молока индивидуально от каждой коровы черно-пестрой голштинизированной породы (n = 345, Московская обл., 2015 год; n = 1321, Калужская обл., 2016 год). В исследование были включены 194 штамма S.aureus. Чувствительность выделенных микроорганизмов к десяти антибактериальным препаратам (ЗАО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», Россия): пенициллину (PEN, 10 ED), оксациллину (OX, 10 мкг), гентамицину (GN, 10 мкг), эритромицину (ER, 15 мкг), линкомицину (LN, 15 мкг), рифампицину (RF, 5 мкг), ципрофлоксацину (CP, 5 мкг), ванкомицину (VA, 30 мк), фузидину (FZ, 10 мкг), новобиоцину (NB, 5 мкг) определяли диско-диффузионным методом.

Из 194 выделенных штаммов 142 (73,2%) проявляли резистентность к одному и более исследуемым антибиотикам. Наибольшая частота резистентности была отмечена для линкомицина (42,8%), новобиоцина (42,8%), фузидина (32,5%), бензилпенициллина (27,3%), наименьшая – для ванкомицина (2,6%). Устойчивость 20,6% выделенных изолятов S. aureus к оксациллину может свидетельствовать о развитии метициллинрезистентности. Следует отметить наличие антибиотикорезистентности к широко используемым в современной медицине препаратам нового поколения новобиоцину и ванкомицину. Наибольшей эффективностью из исследованных антибиотиков обладали оксациллин (73,7%), рифампицин (86,1%) и ванкомицин (97,4%). С целью оценки результативности антибиотикотерапии была сформирована выборка коров, у которых были детектированы штаммы S. aureus (n = 87). Животных разделили на четыре группы: I (n = 26) — лечение гентамицином; II (n = 22) — эритромицином; III (n = 12) — рифампицином; IV (n = 27) — пенициллином и амоксициллином. Вылеченными считали животных, у которых при повторном исследовании не обнаружили S. aureus. Наиболее эффективной оказалась схема лечения больных коров рифампицином (91,7%), наименее — гентамицином (53,8%). Выявлена тенденция к развитию полирезистентности: 55,6-61,5% полирезистентных штаммов после лечения против 33,3-43,8% до лечения.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, проект № 15-16-00020.

THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE STAPHYLOCOCCUS AUREUS TO NEXT GENERATION ANTIBIOTICS.

Artemyeva O. A., Nikanova D.A., Gladyr E. A., Zinovieva N.A.

L.K. Ernst Institute of Animal Husbandry, Podolsk, Russia
pos. Dubrovitsy, Podolsk Region, Moscow Province, 142132 Russia
e-mail:vijmikrob@mail.ru

The strains of S. aureus were isolated from milk of highly clinically healthy cows of Holstein Black-Motley Breed. The evaluation effectiveness of antibiotic therapy was conducted. The development of resistance isolated strains to broad-spectrum antibiotics was studied

Key words: Staphylococcus aureus, mastitis, antibiotic resistance.

The development of microbial resistance to antibiotics determines the effectiveness of the veterinary measures. The study and monitoring, well-designed treatment schemes - are those measures that help to reduce the risk of spread of pathogenic and conditional-pathogenic microorganisms. One of the problems in the dairy farming is mastitis of high producing cows, which is mainly caused by Staphylococcus aureus.

The aim of our study was to investigate the development of resistance of S. aureus strains, isolated from milk of clinically healthy dairy cows of the Central region of Russia.

To investigate the milk samples were collected from each individual cow of Holstein Black-Motley Breed (n = 345, Moscow Region, in 2015; n = 1321, Kaluga region, in 2016). The 194 S.aureus strains were included in the study. The sensitivity of the isolated microorganisms to ten antibiotics («Pharmacotherapy Research Center», Russia) including penicillin (PEN, 10, ED), oxacillin (OX, 10 µg), gentamicin (GN, 10 µg), erythromycin (ER, 15 µg), lincomycin (LN, 15 µg), rifampicin (RF, 5 µg), ciprofloxacin (CP, 5 µg), vancomycin (VA, 30 µg), fuzidinu (FZ, 10 µg) and novobiocin (NB, 5 µg) was determined by disk diffusion method. Out of 194 isolated strains 142 (73.2%) showed resistance to one or more antibiotics. The highest frequency of resistance was noted for lincomycin (42.8%), novobiocin (42.8%), fuzidinu (32.5%), penicillin (27.3%), the lowest - for vancomycin (2.6%). Resistance 20.6% of isolates S. aureus to oxacillin may indicate the development of methicillin-resistant. In general, the presence of antibiotic resistance to preparations of a next generation (novobiocin and vancomycin) which are widely used in modern medicine should be noted. Oxacillin, rifampicin and vancomycin had the highest efficiency among the tested antibiotics: 73.7%, 86.1% and 97.4%, respectively. In order to assess the effectiveness of antibiotic therapy we selected a group of cows in which S. aureus were detected (n = 87). The animals were divided into four groups: I (n = 26) — gentamicin treatment; II (n = 22) — erythromycin treatment; III (n = 12) — rifampicin treatment; IV (n = 27) — penicillin and amoxicillin treatment. The animals were considered as cured if S. aureus was not detected after the treatment. The most effective treatment regimen for the affected cows was observed for rifampicin (91.7%) and the least effective for gentamicin (53.8%) treatment. The tendency of developing multiple drug resistance was shown: 55.6-61.5% multidrug resistant strains after treatment comparing to 33.3-43.8% before treatment.

The study was supported by the Russian Science Foundation, the project № 15-16-00020.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 578.282

СТРАТЕГИЯ АДАПТАЦИИ СИСТЕМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА CRISPR/CAS9 ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЖИВОТНЫХ, УСТОЙЧИВЫХ К ВИРУСУ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Глазова О.В, Антонова Е.Н., Гапонова А.В., Зверева С.Д., Малоголовкин А.С., Волчков П.Ю.

Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный, Россия
141701 МО, г.Долгопрудный, Институтский пер., 9.
e-mail: ol.glazova@gmail.com

Разработана стратегия создания животных, устойчивых к вирусу африканской чумы свиней, на основе системы CRISPR/Cas9. Определены участки вирусного генома, наиболее перспективные для таргетирования нуклеазой. Выбрана стратегия оптимизации внутриклеточной локализации системы.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, АЧС, таргетирование вирусов, внутриклеточный иммунитет.

Вирус африканской чумы свиней (АЧС) является возбудителем острой геморрагической лихорадки и смертельным патогеном для домашних и диких кабанов. На сегодняшний день не существует

эффективного способа защиты против АЧС. Смертность среди животных от АЧС достигает 100%, и в среднем животное погибает в течение 7-9 дней, что приводит к уничтожению поголовья в короткие сроки. Одним из вариантов решения данной проблемы является создание резистентных к вирусу АЧС животных. Для выполнения этой задачи мы предлагаем принципиально новый подход: разработка технологии внутриклеточной защиты от инфекции вируса АЧС на основе системы адаптивного иммунитета бактерий CRISPR/Cas9 (1).

Система CRISPR/Cas9 состоит из двух компонентов – нуклеазы Cas9 (вносит двуцепочечные разрывы в ДНК) и направляющих её РНК-гидов. Для адаптации этой системы с целью множественного таргетирования АЧС необходимо определить такие локусы на генома вируса, которые будут наиболее консервативны среди всех его изолятов а также наиболее значимы для жизнедеятельности вируса (2). Проведя биоинформатический анализ имеющихся в доступных базах данных полногеномных сиквенсов вируса АЧС, мы подобрали 64 наиболее перспективных участка покрывающие 18 генов-мишеней.

Следующим ключевым моментом в разработке нашей системы является малоизученная и сложная биология жизненного цикла вируса АЧС (3). Он считается цитоплазматическим ДНК-вирусом, формирующим в цитоплазме вблизи ядра ограниченную мембранами репликативную фабрику (4). Однако в ряде статей была показана ядерная локализация ДНК вируса на ранних стадиях репликации (5,6).

Ввиду неоднозначности внутриклеточной локализации и не до конца изученному процессу репликации вируса необходимо оптимизировать местоположение в клетке комплекса Cas9 - РНК-гиды. Нами были определены следующие компартмены: ядро, цитоплазма, эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи.

Таким образом, итоговая система будет состоять из набора наиболее эффективных РНК-гидов и нуклеазы Cas9, имеющей оптимизированную внутриклеточную локализацию. Далее эта кассета будет помещена в локус ROSA26 генома свиньи, известный «safe harbor» локус, экспрессия трансгена из которого не влияет на функционирование генома и в целом на организм (7). У полученных таким образом трансгенных животных вирус АЧС будет разрушаться внутри клетки на самых ранних этапах заражения. Такие животные не будут проявлять клинические признаки заболевания и не будут оставаться носителями вируса в случае инфицирования.

Литература.
1. Zhang F., Wen Y., Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges// Hum. Mol. Genet. 2014.
2. Yang X Applications of CRISPR-Cas9 Mediated Genome Engineering //Military Medical Research 2.2015.
3. Dixon L.K., Chapman D.A.G., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics // Virus Research. Vol 173. Issue 1. 2013. P. 3–14
4. Salas M.L., Andrés G. African swine fever virus morphogenesis// Virus Res. 2013. Vol 173(1). P.29-41
5. Garciabeato, R., Salas, M.L., Vinuela, E., Salas, J., Role of the host-cell nucleus in the replication of African swine fever virus-DNA.//Virology.1992b.Vol.188 (2).P.637–649.
6. Rojo, G., Garcia-Beato, R., Vinuela, E., Salas, M.L., Salas, J. Replication of African swine fever virus DNA in infected cells//Virology 1999. Vol. 257 (2), P.524–536.
7. Li X, Yang Y, Bu L, Guo X, Tang C, Song J, Fan N, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Yi X, Quan L, Liu S, Yang Z, Ouyang H, Chen YE, Wang Z, Lai L Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing // Cell Res. 2014. Vol. 24(4):501-4.

African swine fever virus (ASFV) is the causative agent of acute hemorrhagic fever and pathogenic for domestic and wild pigs. To date there is no effective way to combat ASFV infection. The mortality rates in pigs reach 100%, and infected animals die usually within 7-9 days, causing death of the whole livestock within short time; quarantine measures further increase the damage caused by the outbreak. One of the solutions for this problem is production of domestic pigs resistant to ASFV infection. Our approach relies on using adaptive immunity system of bacteria known as CRISPR/Cas9 to develop intracellular defense mechanism against ASFV infection. This system consists of two components: nuclease Cas9 (that generates DNA double strand breaks) and guide RNA (gRNA) complementary to portions of viral genome.

To achieve efficient cutting of viral genome at multiple sites it is necessary to identified highly conserved of all viral isolates regardless of their serological properties and significant for viral lifecycle regions of the genome. Using bioinformatics tools, we identified 64 highly conserved regions that cover 18 target genes within ASFV genome.

The other significant point of our project is difficult and unclear biology of the ASFV. ASFV DNA replication occurs in perinuclear cytoplasmic factory areas, but an early stage of ASFV DNA replication has also been detected in the nucleus. Thus we need to optimize of the Cas9/gRNA complexes to localize in the direct vicinity of virus replication. We decided to localize our system at the different cell compartments such as cytoplasm, nucleus, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus.

Finally the system will be consist of the set the most effective RNA guides and the Cas9 nuclease optimized for intracellular localization. Then it will be integrated into "safe harbor" Rosa26 locus of the porcine genome. Into the cells of the transgenic animals created by this way the genome of the virus will be depredate at the early stages of infection. These animals will not show clinical signs of the disease and will not be carriers of the virus in the case of infection.

References:
1. Zhang F., Wen Y., Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges// Hum. Mol. Genet. 2014.
2. Yang X Applications of CRISPR-Cas9 Mediated Genome Engineering //Military Medical Research 2.2015.
3. Dixon L.K., Chapman D.A.G., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics // Virus Research. Vol 173. Issue 1. 2013. P. 3–14
4. Salas M.L., Andrés G. African swine fever virus morphogenesis// Virus Res. 2013. Vol 173(1). P.29-41
5. Garciabeato, R., Salas, M.L., Vinuela, E., Salas, J., Role of the host-cell nucleus in the replication of African swine fever virus-DNA.//Virology.1992b.Vol.188 (2).P.637–649.
6. Rojo, G., Garcia-Beato, R., Vinuela, E., Salas, M.L., Salas, J. Replication of African swine fever virus DNA in infected cells//Virology 1999. Vol. 257 (2), P.524–536.
7. Li X, Yang Y, Bu L, Guo X, Tang C, Song J, Fan N, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Yi X, Quan L, Liu S, Yang Z, Ouyang H, Chen YE, Wang Z, Lai L Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing // Cell Res. 2014. Vol. 24(4):501-4.

УДК 543.4

ПЕРЕРАБОТКА ОТХОДОВ ЖИВОТНОВОДСТВА И ПТИЦЕВОДСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА «МЕЛАФЕН»

Шаймарданова А.А., Халиуллина З.М.

ФГБОУ ВО «Казанский Аграрный Университет», Казань, Россия, 420011, г.Казань, ул.Ферма-2, д.53,
e-mail: shaim-alf@mail.ru

Приводятся результаты эксперимента по использованию препарата «Мелафен» для переработки отходов животноводства и птицеводства

Ключевые слова: навоз, переработка, отходы животноводства, отходы птицеводства, «мелафен».

Одной из основных проблем животноводства и птицеводства является утилизация отходов – навоза и помета птицы. Согласно федеральному классификатору отходов ФККО 2014 г. помет куриный свежий - код ФККО 11271 0133 , помет утиный, гусиный свежий - код ФККО 1127120133 , навоз свиней свежий -код ФККО 1125100133 являются отходами 3 класса, навоз КРС свежий – код ФККО 11211001334 - 4 класса опасности для окружающей среды. В то же время компостированный навоз служит высококачественным органическим удобрением, улучшающим структуру почв. Для компостирования, т.е. снижения класса опасности навоза как отхода, требуется не менее 6 месяцев. Наиболее перспективным для животноводческих ферм является переработка навозов и пометов с использованием биотехнологий, позволяющая дальнейшее использование их в хозяйствах в качестве удобрения.

Нами проводилось изучение ускорения процесса обезвреживания утиного помета и коровьего навоза с использованием водного раствора препарата «Мелафен» в концентрации $1{\cdot}10^{-6}$ г/кг. Препарат «Мелафен» разработан в ИОФХ им. А.Е Арбузова КазНЦ РАН и представляет собой соль бис(оксиметил)фосфиновой кислоты. Водный раствор этой соли в сверхнизких концентрациях $1{\cdot}10^{-8}$- $1{\cdot}10^{-10}$ проявляет высокую рост-регулирующую активность.

Эксперимент проводился с пробами весом 5кг, в диапазоне температур 20÷10°С, при размещении проб на открытом воздухе, и продолжался в течение 2 месяцев. В качестве показателя течения процесса обезвреживания навозов и пометов, было выбрано содержание аммонийного азота (NH4+), который определялся фотоколориметрическим методом по Ромашкевичу еженедельно перед очередной обработкой препаратом «Мелафен».

Изменение содержания аммонийного азота за 2 месяца составило: в пробах коровьего навоза с 5,9 г/кг до 4,4 г/кг сухого вещества в контрольном образце и до 3,7 г/кг сухого вещества в образце, обработанном «Мелафеном»;

в пробах утиного помета с 5,9 г/кг до 4,7 г/кг сухого вещества в контрольном образце и до 3,7 г/кг сухого вещества в образце, обработанном «Мелафеном».

По окончании эксперимента был проведен анализ определения класса опасности для образцов коровьего навоза. Анализ проводился в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06 Методика определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний (Daphnia magma Straus)»

Оба протестированных образца характеризуются острой токсичностью по отношению к дафниям (Daphnia magma Straus). Образец без обработки мелафеном проявил больший; образец после обработки мелафеном - меньший уровень токсичности. Обе пробы, т.е. отходы без и после обработки мелафеном, относятся к 4 классу опасности.

Таким образом, нами показано, что применение препарата «Мелафен» влияет на скорость компостирования навозов, снижает токсичность отходов, что делает возможным его применение для утилизации отходов животноводства.

Литература.
Мирошникова, В. В. Современные технологические процессы утилизации навоза крупного рогатого скота / В. В. Мирошникова, М.А. Мироошников // Научный журнал Российского НИИ проблем мелиорации, No 2(14), 2014 г-вып.2.-С.150-165

PROCESSING OF LIVESTOCK AND POULTERY MANURE WITH «MELAPHEN»

A.A.Shaimardanova, Z.M.Khaliullina

Kazan State Agrarian University, Kazan, Russia, Russia, 420011, Kazan, Ferma-2 sr, d.53,
e-mail: shaim-alf@mail.ru

Provides for the use of «Melaphen» drug experiment results for the recycling of livestock and poultry

Key words: *manure, processing, livestock waste, poultry waste, «melafen».*

One of the main problems is livestock and poultry breeding is manure management. According to the Federal Classificatory Catalogue of Wastes FKKO 2014, fresh chicken manure FKKO code 11271 0133, fresh duck and goose manure FKKO code 1127120133, fresh pig manure FKKO code 1125100133 are 3rd hazard class wastes, fresh cattle manure FKKO code 11211001334 is 4th class wastes. At the same time, composted manure is a high-quality organic fertilizer that helps improve soil structure. Composting, i.e. reducing the hazard class of manure as waste, takes a minimum of 6 months. For livestock farms, the most promising is biotechnology-based manure processing that allows for further use of manure as fertilizer.

We have studied acceleration of duck and cow manure disposal using aqueous solution of Melaphen at a concentration of $1 \cdot 10^{-6}$ g/kg. Melaphen has been developed by IOPC A.E. Arbuzov of Kazan Scientific Center of RAS and is a salt of bis(hydroxymethyl)phosphinic acid. An aqueous solution of this salt in extremely low concentrations of $1 \cdot 10^{-8}$- $1 \cdot 10^{-10}$ shows high growth-regulating activity.

The experiment was conducted with samples weighing 5 kg, within the temperature range of 20 ÷ 10 °C, with samples placed outdoors, and continued for two months. As an indicator of the progress of manure neutralization, ammonium nitrogen content was chosen (NH4 +), which was weekly determined by Romashkevich photocolorimetry method before the subsequent Melaphen treatment.

The change in ammonium nitrogen content for 2 months was: in cow manure samples from 5.9 g/kg to 4.4 g/kg of dry matter in the test sample and to 3.7 g/kg of dry matter in Melaphene treated sample;

in duck manure samples from 5.9 g/kg to 4.7 g/kg of dry matter in the test sample and to 3.7 g/kg of dry matter in Melaphene treated sample.

Upon completion of the experiment, the analysis of hazard class determination was held for cow manure samples. The analysis was conducted in accordance with the PND F T (Federative Environmental Regulatory Document) 14.1:2:4.12-06 Methods for determining the toxicity of drinking, fresh natural, and waste water, aqueous extract from soils, sewage sludge, and Daphnia (Daphnia magma Straus) mortality waste.

Both tested samples are characterized by acute toxicity for daphnia (Daphnia magma Straus). The non-melaphen treated sample showed a greater and the melaphen treated sample a lower level of toxicity. Both samples, i.e. non-melaphen treated and melaphen treated wastes, are of the 4th hazard class.

Thus, we have shown that the use of Melaphen affects manure composting rate, reduces the toxicity of waste, which makes it suitable for farm animal wastes disposal.

References:
Miroshnikov VV Modern technological processes waste cattle manure / VV Miroshnikov, MA Mirooshnikov // Scientific Research Institute of the Russian land reclamation issues magazine, No 2 (14), 2014-vyp.2.-S.150-165

УДК 636.52/.58:57.089.36

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК САМЦОВ: СТРАТЕГИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННОЙ ПТИЦЫ

Волкова Н.А., Зиновьева Н.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы, МО, Россия
142132, МО, п. Дубровицы, д. 60
e-mail: natavolkova@inbox.ru

Изучена результативность введения рекомбинантной ДНК в клетки сперматогенного эпителия семенников петухов в условиях in vitro и in vivo. Показана результативность использования трансформированных спермиев для получения трансгенных эмбрионов.

Ключевые слова: сперматогонии, генетическая модификация, трансгенная птица

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №16-16-10059.

Использование половых клеток самцов в качестве векторов для направленного переноса генов является одним из альтернативных путей создания генетически модифицированной птицы, позволяющих повысить эффективность трансгенеза по сравнению с традиционными методами получения трансгенных особей. С целью разработки и последующего внедрения данной технологии нами был проведен ряд экспериментов по оценке возможности доставки экзогенной ДНК в половые клетки самцов с использованием различных методических подходов. Объектом манипуляций являлись стволовые клетки семенников – сперматогонии. Введение генных конструкций осуществляли in vivo и in vitro. В первом случае - введение генных конструкций (вирусный препарат) осуществляли непосредственно в семенник взрослых самцов, во втором – проводили трансформацию сперматогоний в культуре методом электропорации с последующей их трансплантацией в семенники петухов-реципиентов, обработанных предварительно бусульфаном для выключения собственного сперматогенеза. На основании гистологических исследований гистоструктуры семенников было установлено, что оптимальным сроком для проведения манипуляций со сперматогенными клетками является период до 3 месяцев, когда клетки сперматогенного эпителия характеризуются высокой пролиферативной активностью и представлены, в основном, сперматогониями. В этой связи введение вирусного препарата в семенники петухов осуществляли в возрасте 2,5 месяцев, для получения культуры сперматогоний использовали семенники петухов в возрасте до 1 месяца.

Результативность переноса рекомбинантной ДНК в половые клетки петухов была показана в экспериментах как in vitro, так и in vivo. В обоих случаях методами ПЦР и иммуногистохимии наличие рекомбинантного гена было установлено в зрелых половых клетках – спермиях, а также эмбрионах, полученных от кур, осеменных трансформированным семенем. Полученные данные свидетельствует о перспективности использования стволовых клеток семенников – сперматогоний - в качестве клеток-мишеней для доставки рекомбинантной ДНК с целью получения трансгенной птицы.

UDC 636.52/.58:57.089.36

GENETIC MODIFICATION OF MALE GERM CELLS: STRATEGY AND PROSPECTS FOR PRODUCING OF TRANSGENIC BIRDS

Volkova N.A., Zinovieva N.A.

All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after academy member L.K.Ernst, Moscow region, settlement Dubrovitsy, Russia
142132, Moscow region, settlement Dubrovitsy, д. 60
e-mail: natavolkova@inbox.ru

The effectiveness of recombinant DNA introduction into the testes seminiferous epithelium in vitro and in vivo was studied. The effectiveness of the transformed spermatozoa use for producing of transgenic embryos was shown.

Key words: spermatogonia, genetic modification, transgenic bird

The research was conducted under financial support of Russian Scientific Foundation (project №16-16-10059)

One of alternative ways to create a genetically modified bird that improves transgenesis efficiency as compared to conventional methods for producing transgenic animals is the use of male gametes as directional vectors for gene transfer. In order to develop and subsequently implement this technology we conducted a number of experiments on the assessment of possibility of exogenous DNA delivery into germ cells of males using various methodological approaches. We used stem cells of the testes – spermatogonia as the objects for manipulation. The introduction of gene constructs was performed in vivo and in vitro. In the first case - the introduction of gene constructs (viral preparation) was carried out directly into the testes of adult males, in the second - the transformation of spermatogonia was performed by electroporation in culture with subsequent transplantation into the testes of the recipient treated with busulfan for shutdown of its own spermatogenesis. Based on studies of testes histological structure, it was found that the optimal period for manipulation with spermatogonia cells is a period of up to 3 months of age, when spermatogenic epithelium cells are characterized by high proliferative activity and are presented mostly by spermatogonia. In this regard, the introduction of the virus preparation into the testes of males was carried out at the age of 2.5 months while for obtaining of spermatogonial cultures, the testes of males under the age of one month were used.

The effectiveness of recombinant DNA transferring into germ cells was shown in experiments both in vitro and in vivo. In both cases, the presence of the recombinant gene was detected by PCR and immunohistochemistry methods in the mature germ cells - sperm and in embryos obtained from chicken inseminated by transformed sperm. Our study has shown the availability of testes stem cells – spermatogonia, as target cells for the delivery of recombinant DNA to produce transgenic birds.

УДК 578.232.2

РАЗРАБОТКА СТРАТЕГИЙ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИХ ПРОНИКНОВЕНИЮ ВИРУСА ГРИППА В КЛЕТКИ

Антонова Е.Н., Волчков П.Ю., Глазова О.В., Волкова Н.А.

Московский Физико-Технический Институт (Государственный Университет)
141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9, Россия
e-mail: enryabkova@gmail.com

На клеточных моделях было протестировано несколько стратегий, препятствующих проникновению вируса гриппа птиц. По результатам было показано, что наилучшую противовирусную защиту обеспечивает экспрессия нейраминидазы на поверхности клеточной мембраны.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц; нейраминидаза; гемагглютинин; сиаловые остатки; гидроксилаза; сиалил-трансфераза.

В качестве защиты от проникновения вирусов проверялось несколько стратегий, основной из которых является экспрессия на поверхности клеток нейраминидазы, удаляющий сиаловые остатки, узнаваемые гемагглютинином вируса. Альтернативные стратегии основаны на нокаутировании ферментов, ответственных за сиалирование, а также на модификации остатков сиаловых кислот, маскируя тем самым эпитопы связывания вируса. Стратегии проверялись по анализу уровня сиалирования или модификации поверхностных гликопротеинов, связыванию вирусного гемагглютинина с поверхность клеток, а также репликации вируса в клетках.

По основной стратегии были получены лентивирусные генетические конструкции для экспрессии вирусной, человеческой и бактериальных нейраминидаз с различной субстрат-специфичностью на поверхности клеточной мембраны;

По альтернативной стратегии, связанной с нокаутированием ферментов, ответственных за сиалирование, были получены куриные фибробласты с нокаутированным с помощью CRISPR/Cas9 геном сиалил трансферазы ST3GAL6;

По альтернативной стратегии, связанной с экспрессией ферментов, ответственных за модификацию сиаловых остатков на мембране, получена лентивирусная конструкция, кодирующая CMAH гидроксилазу;

Оценен уровень сиалирования на поверхности клеток, экспрессирующих различные нейраминидазы, а также на поверхности клеток, нокаутных по сиалил-трансферазе ST3GAL6; оценен уровень гидроксилирования сиаловых остатков (Neu5GC) на поверхности клеток, экспрессирующих гидроксилазу;

Оценено связывание гемагглютинина вируса гриппа птиц с поверхностью клеток, а также проанализирован уровень репликации вируса птичьего гриппа в инфицированных вирусом клетках по каждой из стратегий.

Полученные результаты будут использованы в дальнейшем для создания генетически модифицированных сельскохозяйственных птиц, устойчивых к вирусу птичьего гриппа

Литература.
1. Belser J.A., Lu X., Szretter K.J., Jin X., Aschenbrenner L.M., Lee A., Hawley S., Kim D.H., Malakhov M.P., Yu M., Fang F., Katz J.M. DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection//J Infect Dis. 2007.Vol.196. №10. P.1493–1499.
2. Ito T. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses//Microbiol Immunol. 2000.Vol.44. №6. P. 423-430.
3. Malakhov M.P., Aschenbrenner L.M., Smee D.F., Wandersee M.K., Sidwell R.W., Gubareva L.V., Mishin V.P., Hayden F.G., Kim D.H., Ing A., Campbell E.R., Yu M., and Fang F. Sialidase Fusion Protein as a Novel Broad-Spectrum Inhibitor of Influenza Virus Infection//Apr. Antimicrob Agents Chemother. 2006.Vol. 50. №4. P. 1470–1479.
4. Monteerarat Y., Suptawiwat O., Boonarkart C., Uiprasertkul M., Auewaraku P., Viprakasit V. Inhibition of H5N1 highly pathogenic influenza virus by suppressing a specific sialyltransferase//Archives of Virology. 2010.Vol.155. №6. P. 889-893
5. Stray S.J., Cummings R.D. Influenza virus infection of desialylated cells//Air GM Glycobiology.2000.Vol. 10. №7. P. 649-658.
6. Takahashi T., Takano M., Kurebayashi Y., Masuda M., Kawagishi S., Takaguchi M., Yamanaka T., Minami A., Otsubo T., Ikeda K., Suzuki T. N-glycolylneuraminic acid on human epithelial cells prevents entry of influenza A viruses that possess N-glycolylneuraminic acid binding ability//J.Virol. 2014.Vol.88. №15. P.8445-8456.
7. Wu T.Z., Huang L.M. Avian influenza//Chang Gung Med J. 2005.Vol. 28. №11. P.753-757.

DEVELOPMENT OF STRATEGIES THAT PREVENT PENETRATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS IN CELLS

Antonova E.N., Volchkov P.Y., Glazova O.V., Volkova N.A.

Moscow Institute of Physics and Technology (State University),
141700, Moscow Region., Dolgoprudny, Institutskii per., D. 9, Russia
e-mail: enryabkova@gmail.com

In cellular models several strategies that prevent the penetration of the avian influenza virus were tested. According to the results, it has been shown that neuraminidase expression provides the best anti-viral protection on the membrane surface of the cell.

Key words: avian influenza virus; neuraminidase; hemagglutinin; sialic residues; hydroxylase; sialyltransferase.

Several antiviral strategies have been tested, the main of which was the expression of neuraminidase on the surface of cells. Neuraminidase removes sialic residues which are recognisable by viral hemagglutinin, Alternative strategies were based on the knockout of enzymes responsible for sialylation, and modifications to the sialic acid residues, thereby masking the epitopes of the virus binding. Strategies were verified by analysis of sialylation level or level of surface sialic acids modification, viral hemagglutinin binding to the cell surface and finally the level of viral replication in cells.

According to the basic strategy we have been made lentiviral genetic constructs for expression of viral, bacterial and human neuraminidases on the cell membrane surface with different substrate-specificity;

According to the alternative strategy, related to knockout of the enzymes responsible for sialylation, we made chicken fibroblasts with knockout of sialyltransferase gene ST3GAL6 using CRISPR / Cas9;

According to the alternative strategy associated with the expression of enzymes responsible for the modification of the sialic residues on the membrane, we made lentiviral construct encoding CMAH hydroxylase;

Sialylation level of the cell surface expressing different neuraminidases as well as the sialylation level of surface of ST3GAL6 knockout cells was assessed; the level of hydroxylation of sialic residues (Neu5GC) on the surface of cells expressing the hydroxylase was estimated;

The level of attachment of avian influenza hemagglutinin virus to the cell and the level of replication of the avian influenza virus in infected cells surface were assessed for each strategy.

References:
1. Belser J.A., Lu X., Szretter K.J., Jin X., Aschenbrenner L.M., Lee A., Hawley S., Kim D.H., Malakhov M.P., Yu M., Fang F., Katz J.M. DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection//J Infect Dis. 2007.Vol.196. №10. P.1493–1499.

2. Ito T. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses//Microbiol Immunol. 2000.Vol.44. №6. P. 423-430.
3. Malakhov M.P., Aschenbrenner L.M., Smee D.F., Wandersee M.K., Sidwell R.W., Gubareva L.V., Mishin V.P., Hayden F.G., Kim D.H., Ing A., Campbell E.R., Yu M., and Fang F. Sialidase Fusion Protein as a Novel Broad-Spectrum Inhibitor of Influenza Virus Infection//Apr. Antimicrob Agents Chemother. 2006.Vol. 50. №4. P. 1470–1479.
4. Monteerarat Y., Suptawiwat O., Boonarkart C., Uiprasertkul M., Auewaraku P., Viprakasit V. Inhibition of H5N1 highly pathogenic influenza virus by suppressing a specific sialyltransferase//Archives of Virology. 2010.Vol.155. №6. P. 889-893
5. Stray S.J., Cummings R.D. Influenza virus infection of desialylated cells//Air GM Glycobiology.2000.Vol. 10. №7. P. 649-658.
6. Takahashi T., Takano M., Kurebayashi Y., Masuda M., Kawagishi S., Takaguchi M., Yamanaka T., Minami A., Otsubo T., Ikeda K., Suzuki T. N-glycolylneuraminic acid on human epithelial cells prevents entry of influenza A viruses that possess N-glycolylneuraminic acid binding ability//J.Virol. 2014.Vol.88. №15. P.8445-8456.
7. Wu T.Z., Huang L.M. Avian influenza//Chang Gung Med J. 2005.Vol. 28. №11. P.753-757.

УДК 619:615.9:612

УГЛЕРОДНЫЕ ЭНТЕРОСОРБЕНТЫ ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ И ИММУНОКОРРЕКЦИИ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Пьянова Л.Г.[1,3], Герунова Л.К.[2], Седанова А.В.[1], Лихолобов В.А.[1,3], Лавренов А.В.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем переработки углеводородов Сибирского отделения Российской академии наук, Омск, Россия
644040, г.Омск-40, ул.Нефтезаводская, 54
e-mail: medugli@ihcp.ru; medugli@rambler.ru
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение Высшего профессионального образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»
644122, г. Омск, ул. Октябрьская, 92
[3]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный технический университет» (ОмГТУ), г.Омск, Россия
e-mail: gerliud@mail.ru; vsed@mail.ru

Получены новые композиционные углеродные материалы ветеринарного назначения модифицированием энтеросорбента углеродного Зоокарб биологически активными веществами (бетулин, аргинин). Изучены их функциональные свойства (физико-химические и фармакотоксикологичесике).

Ключевые слова: углеродные энтеросорбенты, модифицирование, ветеринария, коррекция иммунотоксических эффектов

Приоритетным в животноводстве является повышение сохранности и продуктивности животных. Экономический ущерб от желудочно-кишечных заболеваний различной этиологии складывается из летальности, отставания в росте, повышения затрат на корм, увеличения процента выбраковки, снижения поствакцинального иммунитета и продуктивности, рождения слабого потомства.

В настоящее время поиск новых эффективных энтеросорбентов для профилактики и лечения заболеваний, связанных с накоплением в организме токсичных веществ, является актуальной задачей. Перспективными являются препараты, обладающие сорбционными и иммунокорригирующими свойствами.

Применение энтеросорбентов – наиболее эффективный метод профилактики и лечения микотоксикозов животных. Энтеросорбция, как и другие способы лечения, непрерывно совершенствуется. На развитие этого направления влияют новые технологии при создании энтеросорбентов, методы метаболической коррекции и детоксикации, экологическая ситуация, особенности кормления разных видов животных.

Требования, предъявляемые к качеству энтеросорбентов для животных, аналогичны критериям для энтеросорбентов медицинского назначения.

Широкое применение находят энтеросорбенты на основе кремнезема, углерода, лигнина, хитина и его производных и минеральные энтеросорбенты (бентониты, цеолиты, вермикулиты и др.).

Наиболее известные энтеросорбенты отечественного производства в ветеринарной практике: Зоокарб (г. Омск); Цамакс (Московская обл., г. Железнодорожный-5); Полифепан (г. Санкт-Петербург); уголь

активированный (г. Екатеринбург); Энтеросгель (г. Саратов); Полисорб ВП (г. Челябинск) и др.

Следует отметить, что на ветеринарном фармацевтическом рынке отсутствуют энтеросорбенты пролонгированного и биоспецифического действия. Это связано со сложностью их производства и высокой стоимостью.

В ИППУ СО РАН ведутся разработки по созданию новых лекарственных препаратов для ветеринарии. В докладе представлены результаты исследований по получению, изучению свойств, применению углеродного энтеросорбента Зоокарб и новых ветеринарных препаратов, полученных на его основе.

UDK 619:615.9:612

CARBON ENTEROSORBENTS FOR DETOXIFICATION AND IMMUNOCORRECTION OF THE ANIMAL ORGANISM IN PATHOLOGICAL STATES

P'yanova L.G.[1,3], Gerunova L.K.[2], Sedanova A.V.[1], Likholobov V.A.[1,3], Lavrenov A.V.[1]

[1]Institute of Hydrocarbons Processing, SB RAS, Omsk, Russia
st. Neftezavodskaya 54, Omsk, 644040
e-mail: medugli@ihcp.ru; medugli@rambler.ru
[2]Omsk State Agrarian University of P.A. Stolypin, Omsk, Russia, st. October 92,
644122, Omsk
e-mail: gerliud@mail.ru; vsed@mail.ru
[3]Omsk State Technical University, Omsk, Russia
644050, Mira pr. 11, Omsk

Advanced composite carbon materials for veterinary medicine were obtained by modification of the carbon enterosorbent Zoocarb with biologically active substances (betulin and arginine). Their functional (physicochemical and pharmacotoxicological) properties were studied.

Key words: carbon enterosorbents, modification, veterinary medicine, correction of immunotoxic effects

Increasing the safety and productivity of animals is of top priority for livestock farming. The economic damage from gastrointestinal diseases of different etiology includes lethality, growth retardation, increased feed cost and culling percent, decreased postvaccinal immunity and yield, and weak breed.

The development of new efficient enterosorbents for the prevention and treatment of disorders associated with accumulation of toxic substances in the organism is a topical task. Promising are the preparations with sorption and immunocorrecting properties.

The application of enterosorbents is the most efficient method for the prevention and treatment of mycotoxicoses in animals. Similar to other treatment methods, enterosorption is being continuously improved. The development of this approach is affected by new technologies of enterosorbent synthesis, methods of metabolic correction and detoxification, environmental situation, and feeding features of different types of animals.

Requirements to the quality of enterosorbents for animals are similar to those for medical enterosorbents.

Extensive use is made of enterosorbents containing silica, carbon, lignin, chitin and its derivatives as well as mineral enterosorbents (bentonites, zeolites, vermiculites).

The best known domestic enterosorbents used in veterinary practice are: Zoocarb (Omsk), Tsamax (Zheleznodorozhnyi-5, Moscow region), Polyphepan (St.-Petersburg), activated carbon (Yekaterinburg), Enterosgel (Saratov), Polysorb VP (Chelyabinsk) and others.

The prolonged-action and biospecific enterosorbents are absent on the veterinary pharmaceutical market. This is caused by their high cost and production difficulties.

Institute of Hydrocarbons Processing SB RAS is involved in the development of new preparations for veterinary medicine. The production, investigation and application of the carbon enterosorbent Zoocarb and advanced veterinary preparations on its basis are reported in the lecture.

УДК 636:619

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЦЕМЕНТНЫХ СПЕЙСЕРОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЖИВОТНЫХ С ОСТЕОМИЕЛИТОМ ВЕРТЛУЖНОЙ ВПАДИНЫ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Чернигов Ю.В., Чернигова С.В., Чернигов С.Ю.

Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Омск, Россия
644102, Омск, Проспект Королёва, дом 26; 644008, г. Омск, Институтская площадь, дом 1
ychernigov@mail.ru

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что рентгенологическая и морфологическая картина изменений костных структур вертлужной впадины свидетельствует о выраженной репаративной регенерации последних в условиях подавления гнойной инфекции при применении артикулирующих спейсеров.

Ключевые слова: остеомиелит, вертлужная впадина, артикулирующий спейсер, репаративная регенерация.

На лабораторных животных проведено экспериментальное изучение степени и сроков восстановления утраченных вследствие полученного остеомиелитического процесса костных структур вертлужной впадины. В основной группе оперативное лечение заключалось в резекции проксимального отдела бедренной кости и установке артикулирующего спейсера, в группе сравнения – в резекционной артропластике.

Рентгенологическая картина костных структур вертлужной впадины к 14-ым суткам после получения модели острого гнойного коксита и остеомиелитического процесса характеризовалась значительной деструкцией костных структур в виде утраты архитектоники костных балок головки бедренной кости, выраженного остеолизиса крыши и дна вертлужной впадины с развитием деструктивного подвывиха бедра. К 60-ым суткам отмечались выраженные регенерационные процессы в области вертлужной впадины и проксимального отдела бедренной кости. Причем индуктором формообразовательных процессов явился сам спейсер, по форме которого восстанавливались не только дно, но и формировалась крыша вертлужной впадины. К 4-му месяцу регенераторные процессы в основном завершались и костные структуры вертлужной впадины в дальнейшем не изменялись. В контрольной группе животных деструктивные процессы после резекционной артропластики также останавливались, однако подобной динамики регенераторных процессов отмечено не было.

При гистологическом исследовании было установлено, что к 30-м суткам очаги некроза частично замещались формирующимися полями волокнистой, местами рубцующейся соединительной ткани с явлениями атрофии, некроза и апоптоза клеточных элементов. В вертлужной впадине наряду с массивными разрастаниями соединительной ткани происходило частичное формирование хрящевой выстилки суставной поверхности. В препаратах обращало на себя внимание выраженное формирование костной ткани компактного и губчатого строения, в которой выявлялось нарушение гистиоархитектоники капиллярного русла, в связи с чем, часть капилляров была расширена и имела утолщенные стенки за счет склерозирования. К 120-м суткам после установки спейсера практически полностью завершаются процессы ремоделирования костной ткани с восстановлением утраченных костных структур вертлужной впадины, соответствующей форме головки спейсера.

Таким образом, полученные рентгенологические и морфологические результаты свидетельствуют о выраженной репаративной регенерации костных структур вертлужной впадины под воздействием установленного спейсера в сроки до 16 недель.

Патент РФ № 138352. 11.02.2014г.

Литература.

Чернигов Ю.В., Чернигов С.Ю., Чернигова. С.В., Дзюба. Г.Г. Однокомпонентный цементный антибактериальный спейсер тазобедренного сустава // Патент России № 138352. 2014. Бюл. № 7.

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL SUBSTANTIATION OF CEMENT SPACER APPLICATION IN THE TREATMENT OF ANIMALS AFFECTED WITH ACETABULAR OSTEOMYELITIS (EXPERIMENTAL STUDY)

Tchernigov Y.V., Tchernigova S.V., Tchernigov S.Y.

Omsk State Agrarian University named after P.A.Stolypin, the Sibirsky Research Institute of Agriculture, Omsk, Russia 644008, Institutskaya square, 1 Omsk; 644102, Korolev avenue, 26, Omsk,sv.chernigova@omgau.org

Experimental findings show that radiological and morphological pattern of changes in acetabular osseous structures indicates an evident reparative regeneration of the latter in terms of purulent infection suppression in applying articulating spacers.

Key words: osteomyelitis, acetabulum, articulating spacer, reparative regeneration.

An experimental study of recovery rate and terms of acetabular osseous structures resulted damaged due to osteomyelitis has been conducted in laboratory animals. In the main group the surgical treatment involved resection of the proximal femur followed by installation of articulating spacer and in the comparison group – resective arthroplasty.

By the 14th day the radiographic pattern of acetabular osseous structures has shown an acute purulent coxitis along with osteomyelitis and was characterized by considerable destruction of osseous structures through loss of bone trabecula of the femoral head architectonics, and massive acetabular roof osteolysis accompanied with destructive hip subluxation. By the 60th day the apparent regenerative processes in the area of the acetabulum and the proximal femur have been found, with a spacer being an inductor of form-building process which shaped either the floor and the roof of the acetabulum.

By the 4th month regenerative processes have been mostly completed without furthermost changes in acetabular osseous structures. In the control group destructive processes also stayed after resective arthroplasty, but such regenerative dynamics wasn't noted.

Histologically, it was found that by the 30th day necrosis foci were partially replaced by reformed zones of fibrous connective tissue with signs of atrophy, necrosis and cellular apoptosis. In the acetabulum, along with the massive growth of connective tissue, a partial formation of cartilage lining on the joint surface was taking place.

Histological samples presented well-pronounced formation of dense and spongy osseous tissue, with disorder in capillary bed histioarchitectonics resulting in partial capillary dilatation with thickened walls due to sclerosis. By the 120 th day after the spacer installation remodeling and recovery processes in acetabular osseous structures have been almost entirely completed.

Thus, the radiographic and morphological results indicate the evident reparative regeneration of acetabular osseous structures by means of installed spacer within the term up to 16 weeks.

RF Patent № 138352. 11.02.2014г.

References:
One-component antibacterial cement hip spacer\\ Patents of Russia№ 138352. 2014. Vol. № 7.

УДК 636:619

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НИТИНОЛА ПРИ ТРАНСПЕДИКУЛЯРНОМ ОСТЕОСИНТЕЗЕ ПОЗВОНОЧНИКА

Чернигова С.В., Чернигов Ю.В., Чернигов С.Ю.

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Омск, Россия
644008, г. Омск, Институтская площадь, дом 1; 644102, Омск, Проспект Королёва, дом 26
sv.chernigova@omgau.org

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что динамическая транспедикулярная фиксация (нитинолом) по своим характеристикам позволяет более физиологично распределить динамическую нагрузку, сохраняет объём движений и снижает нагрузку на опорные элементы.

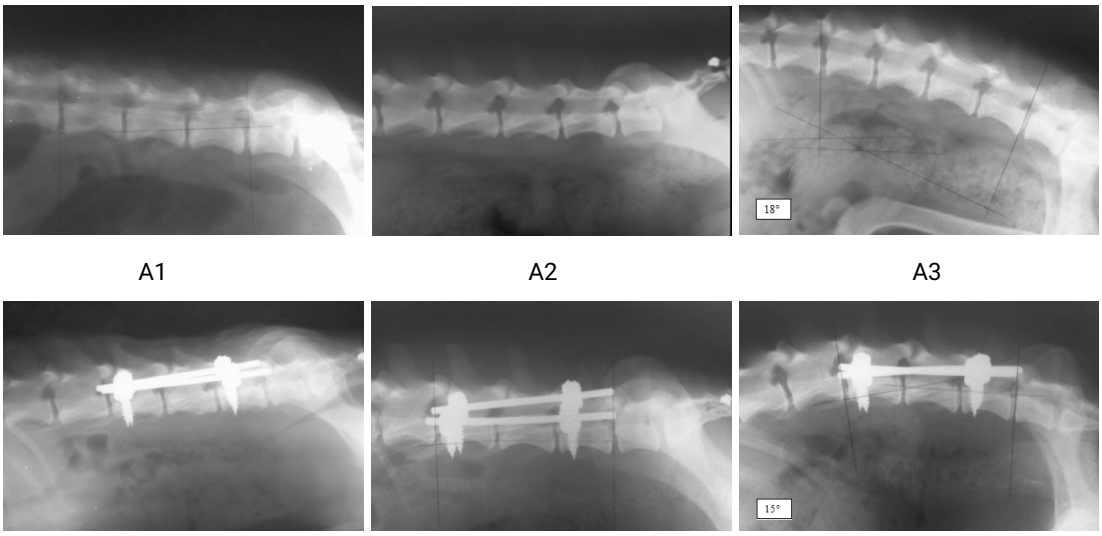
Ключевые слова: позвоночно-двигательный сегмент (ПДС), нитинол, динамическая фиксация, ригидная фиксация.

Целью исследования являлось обоснование эффективности применения нитинола при транспедикулярном остеосинтезе позвоночника на основе рентгенологического сопоставления динамических свойств позвоночно-двигательного сегмента с различными способами задней фиксации в эксперименте.

Экспериментальное исследование проведено на лабораторных животных, которые были разделены на 2 группы. Животным I группы (n-5) проводилась транспедикулярная фиксация позвоночника с использованием ригидных стержней. Животным II группы (n-5) выполнялась транспедикулярная фиксация позвоночника с использованием динамических стержней из нитинола.

Объем движений в исследуемом сегменте до операции при функциональном исследовании в обеих группах составлял 18±1,2 градусов. В группе I на 24 месяце ригидной фиксацией ПДС после оперативного вмешательства объем движений составил 0±0,03 градуса. При анализе динамики рентгенограмм оперированного ПДС при ригидной фиксации объем движений отсутствовал. В группе II с динамической (нитинольной) фиксацией у всех животных присутствовали движения в ПДС и были в среднем 15±1,3 градусов, что составило 78,9% от исходного.

Таким образом, динамическая транспедикулярная фиксация (нитинолом) по своим характеристикам позволяет более физиологично распределить динамическую нагрузку, сохраняет объём движений и снижает нагрузку на опорные элементы.



A1 A2 A3

B1 B2 B3

Рис. Рентгенограммы поясничного отдела позвоночника собаки (группа II):

А – до оперативного вмешательства; В – после оперативного лечения (24 месяца);

А1,В1 – среднефизиологическое положение; А2,В2 – функциональное положение разгибание; А3,В3 – функциональное положение сгибание

Патент РФ № 158351. 20.07.2016

Литература.

Чернигова С.В., Чернигов Ю.В., Чернигов С.Ю., Дочилова Е.С. Устройство для чрескостного остеосинтеза позвоночника // Патент России № 158351. 2016. Бюл. № 20.

EFFICIENCY OF NITINOL APPLICATION FOR SPINAL TRANSPEDICULAR OSTEOSYNTHESIS

Tchernigova S.V., Tchernigov Y.V., Tchernigov S.Y.

Omsk State Agrarian University named after P.A.Stolypin, the Sibirsky Research Institute of Agriculture, Omsk, Russia
644008, Institutskaya square, 1 Omsk; 644102, Korolev avenue, 26, Omsk,
sv.chernigova@omgau.org

As a result of experimental studies it was found that dynamic transpedicular fixation (with nitinol) in its properties ensures with more physiological distribution of dynamic load, maintains the range of motion and reduces the visceroskeletal pressure as well.

Key words: spinal motion segment (SMS), nitinol, dynamic fixation, rigid fixation.

The objective of the research was to study the efficacy of nitinol for pedicle spinal osteosynthesis by means of radiological comparison of the spinal motor segment dynamic properties with different ways of back fixing in experiment.

The experimental study was carried out in laboratory animals, which were divided into 2 groups. Animals of group I (n-5) were performed spinal transpedicular fixation using rigid rods. The animals of group II (n-5) were performed transpedicular fixation of the spine column with dynamic rods made of nitinol.

At function study range of motion in the examined segment before the operation in both groups was 18 ± 1,2 °. In group I after 24 -month rigid fixation of the SMS post the operation range of motion was 0 ± 0,03 degrees. By X-ray pattern analysis of the dynamics in the operated SMS, there was observed failure of range of motion at rigid fixation. In group II with the dynamic (nitinol) fixation all animals reveal locomotor activity in the SMS on average 15 ± 1,3 °, which amounted to 78.9% of the original.

Thus, the dynamic nitinol transpedicular fixation in its properties ensures with more physiological distribution of dynamic load, maintains the range of motion and reduces the visceroskeletal pressure as well.

Pictures. Lumbar spine roentgenograms in the dog (GroupI):

A - before the operation; B – postoperative treatment (24 months)

A1, B1- physiological rest position; A2,B2- extensional position; A3,B3- flexional position

RF patent № 158351. 20.07.2016

References:

Tchernigova S.V., Tchernigov Y.V., Tchernigov S.Y., Dotchilova E.S. Spinal transosseal osteosynthesis device\\ Patents of RussiaN° 158351. 2016. Vol. № 20.

.....

УДК 636.064.6:577.2

ДИНАМИКА РОСТА ТЕЛОК С РАЗНЫМИ КОМБИНАЦИЯМИ ГЕНОТИПОВ CSN3 И DGAT1

Шайдуллин Р.Р.

ФГБОУ ВО «Казанский государственный аграрный университет», г. Казань, Россия
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 65, e-mail: tppi-kgau@bk.ru

Проведено изучение влияния комплексных генотипов локуса каппа-казеина (CSN3) и диацилглицерол О-ацилтрансферазы (DGAT1) на живую массу телок от рождения до возраста 15 месяцев. Установлено, что телки с генотипом CSN3AB/DGAT1AK и CSN3AA/DGAT1AK имеют более высокую живую массу во все возрастные периоды.

Ключевые слова: генотип, CSN3, DGAT1, телки, живая масса

Одним из основных и объективных методов, которые судят о росте животного, является изменение живой массы в различные возрастные периоды. В свою очередь интенсивность роста телок влияет на будущую молочную продуктивность.

По результатам тестирования телок методом ДНК-диагностики были сформированы опытные группы с генетическими вариантами локуса каппа-казеина (CSN3) и диацилглицерол О-ацилтрансферазы (DGAT1): CSN3AA/DGAT1AA, CSN3AA/DGAT1AK, CSN3AA/DGAT1KK, CSN3AB/DGAT1AA, CSN3AB/DGAT1AK, CSN3AB/DGAT1KK, CSN3BB/DGAT1AA, CSN3BB/DGAT1AK. У опытных групп молодняка была изучена динамика живой массы в возрасте: при рождении, 3, 6, 9, 12, 15 месяцев в зависимости от комплексного генотипа CSN3/DGAT1.

Установлено, что телки с комбинированным генотипом CSN3AB/DGAT1AK по живой массе в 3 месяца достоверно превышают массу сверстниц с генотипом CSN3AA/DGAT1AA на 3,1 кг (P<0,01), CSN3AB/DGAT1AA - на 3,0 кг (P<0,05), а молодняк с генотипом CSN3AA/DGAT1AK имеют превосходство над животными CSN3AA/DGAT1AA на 3,0 кг (P<0,001), CSN3AB/DGAT1AA - на 3,1 кг (P<0,05). Аналогичное преимущество телок с генотипом CSN3AB/DGAT1AK и CSN3AA/DGAT1AK над весовыми показателями сверстниц выявлена соответственно в 6 месяцев CSN3AA/DGAT1AA на 6,4 кг (P<0,001), CSN3AA/DGAT1KK - на 6,7 кг (P<0,05) и над CSN3AA/DGAT1AA - на 4,9 кг (P<0,05); в 12 месяцев над CSN3AA/DGAT1AA - на 20,8 кг (P<0,001) и - на 10,2 кг (P<0,05); .в 15 месяцев над CSN3AA/DGAT1AA - на 15,1 кг (P<0,001), CSN3AB/DGAT1KK - на 9,6 кг (P<0,05) и CSN3AA/DGAT1AA - на 14 кг (P<0,001), CSN3AB/DGAT1KK - на 8,5 кг (P<0,05).

Таким образом, телки с генотипом CSN3AB/DGAT1AK и CSN3AA/DGAT1AK характеризовались более высокой живой массой во все возрастные периоды.

.....

UDC 636.064.6:577.2

DYNAMICS OF HEIFERS GROWTH WITH DIFFERENT GENOTYPES COMBINATIONS OF CSN3 AND DGAT1

Shaydullin R.R.

Kazan State Agrarian University, Kazan, Russia
420015, Kazan, st. Karl Marx, 65, e-mail: tppi-kgau@bk.ru

The study of the influence of combined locus genotypes of kappa-casein (CSN3) and diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT1) on live weight of heifers from birth to age of 15 months was carried out. It was found, that heifers with CSN3AB / DGAT1AK and CSN3AA / DGAT1AK genotype have a higher body weight in all age periods.
Key words: genotype, CSN3, DGAT1, heifers, live weight

One of the main and objective method, which shows the growth of the animal, is the change in body weight at different ages. In turn, the rate of heifers growth affects the future milk production.

According to the results of heifers testing by DNA diagnostics method, we formed the experienced groups of genetic variants of locus of the kappa-casein (CSN3) and diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT1): CSN3AA / DGAT1AA, CSN3AA / DGAT1AK, CSN3AA / DGAT1KK, CSN3AB / DGAT1AA, CSN3AB / DGAT1AK , CSN3AB / DGAT1KK, CSN3BB / DGAT1AA, CSN3BB / DGAT1AK. The dynamics of live weight by age was studied of experienced young cattle: at birth of 3, 6, 9, 12, 15 months, depending on the combined genotype CSN3 / DGAT1.

It was found, that heifers with a combined genotype CSN3AB / DGAT1AK on live weight at 3 months was significantly greater in mass, than the same age with genotype CSN3AA / DGAT1AA to 3,1 kg (P<0,01), CSN3AB / DGAT1AA - to 3,0 kg (P<0,05), and youngsters with genotype CSN3AA / DGAT1AK have superiority over animals of CSN3AA / DGAT1AA to 3,0 kg (P<0,001), CSN3AB / DGAT1AA - to 3,1 kg (P<0,05). A similar advantage of heifers with CSN3AB / DGAT1AK and CSN3AA/DGAT1AK genotypes over weight index was identified, respectively, at 6 months CSN3AA / DGAT1AA to 6,4 kg (P<0,001), CSN3AA / DGAT1KK – to 6,7 kg (P<0,05) and over CSN3AA / DGAT1AA - to 4,9 kg (P<0,05); 12 months over CSN3AA / DGAT1AA – to 20,8 kg (P<0,001) and – to 10,2 kg (P<0,05); 15 months over CSN3AA / DGAT1AA – to 15,1 kg (P<0,001), CSN3AB / DGAT1KK – to 9,6 kg (P<0,05) and CSN3AA / DGAT1AA – to 14 kg (P<0,001) CSN3AB / DGAT1KK – 8,5 kg (P<0,05).

Thus, heifers with CSN3AB / DGAT1AK and CSN3AA / DGAT1AK genotypes were characterized by higher body weight in all age periods.

.....

УДК 575.2+577.21+636.2.034

ВСТРЕЧАЕМОСТЬ КОМПЛЕКСНЫХ ГЕНОТИПОВ МАРКЕРОВ ПРОДУКТИВНОСТИ CSN3 И DGAT1 У ЧЕРНО-ПЕСТРЫЙ ПОРОДЫ СКОТА

Шайдуллин Р.Р. [1], Фаизов Т.Х. [2], Шарафутдинов Г.С. [1], Сибагатуллин Ф.С. [1], Москвичева А.Б. [1]

[1] ФГБОУ ВО «Казанский государственный аграрный университет», г. Казань, Россия. 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 65
e-mail: tppi-kgau@bk.ru
[2] ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Россия

Проведена оценка частоты встречаемости комплексных генотипов CSN3 и DGAT1 у телок, первотелок и высокопродуктивных коров черно-пестрой породы с использованием ДНК-диагностики. Установлено, что в стаде черно-пестрого скота наиболее распространенными вариантами являются генотипы CSN3AA / DGAT1AA, CSN3AA / DGAT1AK, CSN3AB / DGAT1AK.

Ключевые слова: генотип, CSN3, DGAT1, частота встречаемости

Изучение генотипической структуры молочного стада является важнейшим условием для поддержания её устойчивости и хозяйственной ценности.

Были изучены комплексные генотипы черно-пестрого скота одновременно по двум генам продуктивности – каппа-казеина (CSN3) и диацилглицерол О-ацилтрансферазы (DGAT1) и рассчитаны их частоты

встречаемости у телок, первотелок и высокопродуктивных коров стада.

У телок и коров-первотелок всего выявлено 8 комплексных генотипов. Наиболее распространенными у данных групп животных были следующие генотипы: CSN3AA / DGAT1AA – 31,1 и 16,2%, CSN3AA / DGAT1AK – 29,6 и 43,7%, CSN3AB / DGAT1AA – 12,3 и 16,9%, CSN3AB / DGAT1AK – 15,6 и 13,4% соответственно. Остальные 4 генотипа встречались менее чем в 6% случаев.

В стаде высокопродуктивных коров обнаружено 9 комплексных генотипов. При этом наибольшая встречаемость у комбинации генов - CSN3AA / DGAT1AA (37,0%), CSN3AB / DGAT1AK (31,2%), CSN3AA / DGAT1AK (15,9%).

Таким образом, в молочном стаде хозяйства наиболее распространенными вариантами являются генотипы CSN3AA / DGAT1AA, CSN3AA / DGAT1AK, CSN3AB / DGAT1AK. Редкими в стаде черно-пестрого скота, оказались комбинации генотипов CSN3BB / DGAT1AA и CSN3BB / DGAT1KK.

UDC 575.2+577.21+636.2.034

OCCURRENCE OF COMBINED GENOTYPES OF CSN3 AND DGAT1 PRODUCTIVITY MARKERS OF BLACK-MOTLEY BREEDS OF CATTLE

Shaydullin R.R. [1], Faizov T.Kh. [2], Sharafutdinov G.S. [1], Sibagatullin F.S.[1], Moskvicheva A.B. [1]

[1] Kazan State Agrarian University, Kazan, Russia. 420015, Kazan, 65 st. K. Marks
e-mail: tppi-kgau@bk.ru
[2] Federal center of toxicological, radiological and biological safety, Kazan, Russia

The occurrence frequency of combined genotypes of CSN3 and DGAT1 in heifers, young cows and high-productive cows of black-motley breed using DNA diagnostics was estimated. It was found, that CSN3AA / DGAT1AA, CSN3AA / DGAT1AK, CSN3AB / DGAT1AK genotypes are widespread in a herd of black and white cattle.

Key words: genotype, CSN3, DGAT1, the frequency of occurrence

The study of genotypic structure of dairy herd is essential to maintain its stability and economic value.

The combined genotypes of black-motley herd were simultaneously studied for two genes of productivity - the kappa-casein (CSN3) and diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT1) and calculated its occurrence frequency in heifers, young cows and high-productive cows herd.

8 combined genotypes were revealed in heifers and young-cows. The most common among these groups of animals were the following genotypes: CSN3AA / DGAT1AA – 31,1 and 16,2%, CSN3AA / DGAT1AK – 29,6 and 43,7%, CSN3AB / DGAT1AA – 12,3 and 16,9%, CSN3AB / DGAT1AK – 15,6 and 13.4% respectively. The remaining 4 genotype occurred less than 6% of cases.

9 combined genotypes were found in a herd of high-productive cows. The highest incidence in combinations are of the following genes - CSN3AA / DGAT1AA (37,0%), CSN3AB / DGAT1AK (31,2%), CSN3AA / DGAT1AK (15,9%).

Thus, CSN3AA / DGAT1AA, CSN3AA / DGAT1AK, CSN3AB / DGAT1AK genotypes are most common in the dairy herd management. The combinations of CSN3VV / DGAT1AA and CSN3BB / DGAT1KK genotypes are rare in a herd of black and white cattle.

УДК 636.2+636.082.

СКРИНИГ НОСИТЕЛЬСТВА МУТАЦИИ В ГЕНЕ FXI В СУБПОПУЛЯЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

Морковкина Н.А., Ковалюк Н.В., Мачульская Е.В., Шахназарова Ю.Ю., Иванченко А.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства», Краснодар, Россия
350055, г. Краснодар, пгт. Знаменский, ул. Первомайская 4
e-mail: NATALIY3103@yandex.ru

Произведён подбор условий ПЦР для скрининга носительства синдрома дефицита XI фактора. Генотипировано 28 голов быков – производителей, широко использующихся в системе искусственного осеменения Краснодарского края, на носительство данной генетической аномалии.

Ключевые слова: дефицит XI фактора, полимеразная цепная реакция, частота встречаемости.

В настоящее время выявлено 505 различных генетических особенностей крупного рогатого скота (как аномалий, так и SNP и прочих полиморфизмов, не оказывающих значительного влияния на здоровье животных (http://omia.angis.org.au/home/).

Дефицит XI фактора (FXID) свертывания крови крупного рогатого скота является аутосомальным рецессивным наследственным генетическим дефектом. Данная генетическая аномалия является следствием вставки нуклеотидной последовательности в составе экзона 12 гена FXI длиной 76 пар оснований. В результате данной инсерции появляется STOP codon (TAA).

Цель работы – подобрать оптимальные условия постановки ПЦР при скрининге генетической аномалии FXID, выявить частоту встречаемости данной аномалии в группе быков - производителей.

Исследования были проведены на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ СКНИИЖ. Объектом исследования являлись образцы спермы 28 быков.

Для выделения ДНК из образцов использовали наборы реагентов Diatom™ DNA Prep 100 (ООО «Лаборатория Изоген» г. Москва). Для контроля прохождения реакции и оценки качества и концентрации ПЦР – продуктов проводили электрофорез в 2% агарозном геле.

При скрининге интересующего нас участка экзона 12 гена FXI для выбора оптимальных условий реакции использовали различные условия амплификации. Наилучший результат по выходу специфического продукта дала полимеразная цепная реакция со следующими условиями амплификации:

94˚C - 4 мин.; (94˚C - 5 сек, 65˚C - 5 сек., 72˚C - 5 сек.)- 30 циклов; 72˚C - 5 мин.

Для амплификации использовали праймеры FXID 1 и FXID 2 [1]. При этом у носителя мутантного аллеля помимо фрагмента длинною 244 пн, наблюдалось наличие специфического фрагмента длинной 320 п.н. (дорожка 11). Результаты скрининга представлены на электрофореграмме (рис.1).

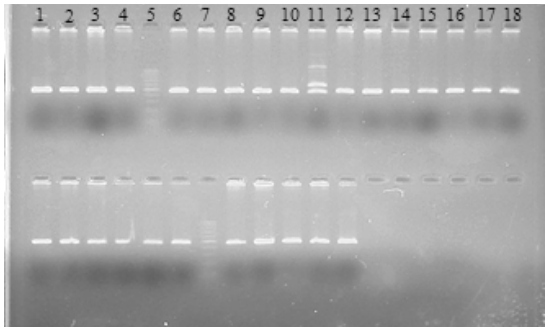


Рис.1 Электрофореграмма результатов скрининга 28 быков на наличие генетической аномалии FXID.

В результате исследований было выявлено носительство FXID у одного из быков, который широко используется в системе искусственного осеменения. Частота встречаемости мутантного аллеля таким образом, составила 0.018. Учитывая, то, для коров, гомозиготных и гетерозиготных носителей генетического дефекта XI фактора свертывания крови характерны низкие показатели воспроизводительной функции, часто встречаются трудные отелы и рождение нежизнеспособных телят [2] необходимо ограничить использование этого производителя.

Литература.
1.Hasan Meydan, Mehmet A Yildiz, Jørgen S Agerholm Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey// Meydan et al. Acta Veterinaria Scandinavica 2010, 52:56
2.Meydan H, Yildiz M.A, Özdil F, Gedik Y., Özbeyaz C. Identification of factor XI deficiency inHolsteincattle in Turkey. Acta Vet Scand. 2009, Jan 22;51:5

CARRIER SCREENING FOR FXI GENE MUTATION IN A SUBPOPULATION OF CATTLE IN KRASNODAR REGION

Morkovkina N.A., Kovalyuk N.V., Machulskaya E.V., Shakhnazarova Y.Y., Ivanchenko A.A.

Federal State Scientific Institution «North-Caucasian Scientific Research Institute of Livestock Breeding», Krasnodar, Russia 350055, Krasnodar, Znamensky, Pervomayskaya St., 4
e-mail: NATALIY3103@yandex.ru

There were selected the most optimal PCR conditions for the carrier screening for factor XI deficiency syndrome, genotyped 28 sires, widely used in the artificial insemination in Krasnodar region, for research the carrier state of the genetic abnormality.

Key words: factor XI deficiency, polymerase chain reaction, the frequency of occurrence.

Currently there are identified 505 different genetic features of the cattle (as anomalies, SNP and other polymorphisms that haven't a significant impact on animal health) (http://omia.angis.org.au/home/).

Factor-XI deficiency (FXID) is inherited as autosomal lethal recessive disorder of the caatle. A 76 base pair segment insertion into exon 12 in Factor-XI gene causes FXID in cattle. As a result of this insertion occurs STOP codon (TAA).

Purpose of this research - to find the optimal conditions for PCR amplification at screening of genetic abnormality - FXID, to identify the frequency of occurrence of the anomaly in the group of sires.

Studies have been done on the basis of the Laboratory of Biotechnology Federal State Scientific Institution «North-Caucasian Scientific Research Institute of Livestock Breeding». The object of the study were 28 samples of bulls semen.

Diatom™ DNA Prep 100 (OOO «Laboratory Isogene» Moscow) reagents sets were used to isolate DNA from the samples. To control the reaction, and evaluate the quality and concentration of the PCR – products, they were electrophoresed on 2% agarose gel.

At the screening of the 12 exon of the FXI gene, there were used different amplification conditions for the selection of optimal reaction conditions. The best result, if to take into consideration the output of a specific product, gave the polymerase chain reaction with the following amplification conditions:

94˚C - 4 min.; (94˚C - 5 sec, 65˚C - 5 sec., 72˚C - 5 sec.)- 30 cycles; 72˚C - 5 min.

Primers FXID 1 and FXID 2 were used for amplification [1]. Carrier of the mutant allele in addition to the fragment of 244 bp had a specific fragment of 320 bp (Lane 11). Screening results are shown in the electrophoregram (Fig.1).

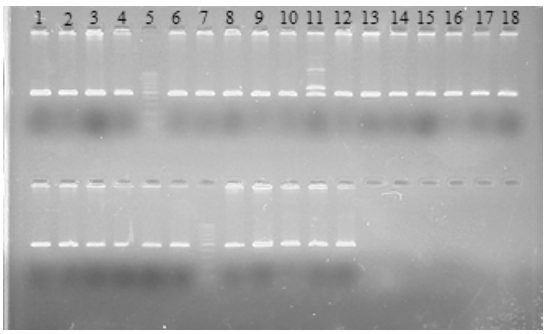


Fig.1 Electrophoregram screening results of 28 bulls for the presence of genetic abnormalities FXID.

As a result of research it have been identified that one of the bulls is a carrier of FXID, and this bull is widely used in the system of artificial insemination. Thus the frequency of a mutant allele was 0.018. Considering that, the cows that are homozygous and heterozygous carriers of the genetic defect of coagulation factor XI is characterized by low levels of reproductive function, and have difficult calving and the birth of non-viable calves [2] it is necessary to restrict the usage of this sire.

References:

1.Hasan Meydan, Mehmet A Yildiz, Jørgen S Agerholm Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey// Meydan et al. Acta Veterinaria Scandinavica 2010, 52:56

2.Meydan H, Yildiz M.A, Özdil F, Gedik Y., Özbeyaz C. Identification of factor XI deficiency inHolsteincattle in Turkey. Acta Vet Scand. 2009, Jan 22;51:5

.....

УДК: 636.4.082.2

ДИНАМИКА АЛЛЕЛОФОНДА СВИНЕЙ SUS SCROFA В ЗАМКНУТОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АНТРОПОГЕННОГО ФАКТОРА

Харзинова В.Р., Зиновьева Н.А.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста» (ВИЖ им. Л.К. Эрнста), п. Дубровицы, Россия, 142132, Московская область, Подольский р-н, пос. Дубровицы, д. 60
e-mail: veronika0784@mail.ru

На основе анализа микросателлитов, изучена динамика аллелофонда пяти поколений хряков, под воздействием антропогенного фактора. Выявлено постепенное снижение генетического разнообразия и возрастание инбридинга свиней в замкнутой популяции в течение нескольких поколений.

Ключевые слова: свинья, микросателлиты, аллелофонд.

Антропогенные факторы играют доминирующую роль в динамике аллелофондов популяций сельскохозяйственных животных. Отбор животных для последующего разведения проводится, главным образом, по показателям продуктивности и состоянию здоровья без учета уровня генетического разнообразия. В этой связи, длительное разведение животных в замкнутых популяциях может привести к снижению генетического разнообразия и, как следствие, к инбредной депрессии. Целью настоящей работы является изучение динамики аллелофонда популяции свиней, разводимой в замкнутой системе в течение пяти поколений, и находящейся под воздействием отбора по показателям продуктивности. Исследования проводили на хряках (P0: n=26, F1: n=93, F2: n=108, F3: n=185, F4: n=105). В качестве ДНК-маркеров использовали 10 локусов микросателлитов (S0155, S0355, S0386, SW72, SW951, S0101, SW240, SW857, S0228, и SW936). Проведенные исследования показали некоторое повышение генетического разнообразия, оцененного по среднему числу аллелей на локус (Na), в поколении F1 по сравнению с P0 (с 5,8±0,4 до 7,5±0,6), что, по всей видимости, обусловлено гетерогенностью свиноматок поколения P0. При этом, следует отметить, что повышение уровня разнообразия достигалось, главным образом, за счет редких аллелей, на что указывает практически отсутствие различий в среднем числе эффективных аллелей (Ne) между поколениями F1 и P0 (3,4±0,2 и 3,6±0,2, соответственно). В поколениях F2-F4 наблюдалось снижение генетического разнообразия: Na=6,5±0,4, 6,9±0,6, 5,7±0,4 и Ne=3,3±0,2, 3,3±0,2, 3,2±0,2, соответственно. Используя в качестве критерия оценки разнообразия показатель уровня наблюдаемой гетерозиготности (Ho), было установлено поступательное снижение Ho в поколениях F2-F4, 0,684±0,025, 0,640±0,029 и 0,632±0,045 по сравнению с P0 (0,724±0,045). Анализ показателя Fis в поколениях показывает, что замкнутое разведение свиней под воздействием антропогенного фактора, приводит к постепенному возрастанию инбридинга, на что указывает тенденция повышения Fis с -0,056 до -0,022 в поколениях P0-F2 (избыток гетерозигот) до +5,9 и +6,1% в поколениях F3 и F4 (дефицит гетерозигот). Таким образом, разведение свиней в замкнутой популяции в течение нескольких поколений под воздействием сильного давления отбора по ограниченному числу признаков способствует снижению генетического разнообразия и возрастанию дефицита гетерозигот, что может привести к возникновению инбредной депрессии.

Работа выполнена в рамках выполнения фундаментальных научных исследований (ГЗ 14; 0600-2016-0005).

UDC: 636.4.082.2

THE DYNAMICS OF THE ALLELE POOL OF PIGS IN A CLOSED POPULATION, UNDER THE INFLUENCE OF THE ANTHROPOGENIC FACTOR.

Kharzinova V.R., Zinovieva N.A.

Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Research Institute of Animal Husbandry Named After Academician LK Ernst», Dubrovitzy sett., Russia 142132, Moscow region Podolsk district, Dubrovitzy sett. 60.
e-mail: veronika0784@mail.ru

Our study was based on microsatellite analysis and investigated the dynamics of the allele pool of five generations of male pigs under the influence of anthropogenic factors. This research revealed a gradual decrease of genetic diversity and an increase of inbreeding in closed populations throughout several generations.

Key words: pig, microsatellite, allele pool.

The anthropogenic factors play a dominant role in the dynamics of the allele pool of farm animal populations. The animal selection for further breeding is mostly carried out through indicators of productivity and health condition without taking into account the level of the genetic diversity. In this regard, the long-term animal breeding in closed populations can lead to a reduction of genetic diversity and, as a consequence, to inbreeding depression. The aim of this work was the study of the allele pool dynamics of pigs populations bred within a closed system for five generations with a selection system based on productivity indicators. The studies were carried out on male pigs (P0: n = 26, F1: n = 93, F2: n = 108, F3: n = 185, F4: n = 105) and 10 microsatellite loci were used as DNA markers (S0155, S0355, S0386, SW72,

SW951, S0101, SW240, SW857, S0228, and SW936). We observed a certain increase of genetic diversity, estimated on the average number of alleles per locus (Na) within the F1 generation in comparison with the P0 generation (from 5.8 ± 0.4 to 7.5 ± 0.6), apparently caused by sows heterogeneity within the P0 generation. Meanwhile, it should be noted that the increasing level of diversity was mostly achieved by rare alleles, which practically indicated no difference in the average number of effective alleles (Ne) between the F1 and the P0 generation (3.4 ± 0.2 and 3.6 ± 0.2) respectively. A decrease of the genetic diversity: Na = 6.5 ± 0.4, 6.9 ± 0.6, 5.7 ± 0.4 and Ne = 3.3 ± 0.2, 3.3 ± 0.2, 3.2 ± 0.2, was observed within the F2-F4 generations. The index of the observed level of heterozygosity (Ho) was used as criterion for diversity estimation. We observed a gradual decrease of Ho in F2-F4 generations (0.684 ± 0.025, 0.640 ± 0.029 and 0.632 ± 0.045), in comparison with P0 (0.724 ± 0.045). The analysis of the Fis index in these generations shows that the closed breeding of pigs under the influence of anthropogenic factors leads to a gradual increase of inbreeding, which is indicated by the increase tendency of Fis from -0.056 to -0.022 in P0-F2 generations (excess of heterozygotes) to + 5.9 and + 6.1% in the F3 and F4 generations (deficit of heterozygotes). Thus, the breeding of pigs in this closed population during several generations under the influence of strong pressure of selection for a limited number of traits contributes to the decrease of genetic diversity and increase of heterozygote deficit, which might cause inbreeding depression.

This work is carried out in the framework of the fundamental research (14: 0600-2016-0005).

УДК 619:636.4: 636.085.16

СИНЕРГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО КОМПЛЕКСА В СВИНОВОДСТВЕ

Парфёнов Г.В., Семёнов С.Н., Аристов А.В., Слащилина Т.В., Мармурова О.М.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Воронеж, Россия, 394087, г. Воронеж, ул. Мичурина, д. 1
e-mail: ramon_ss@mail.ru

С целью стимуляции жизнедеятельности нормальной микрофлоры кишечника у свиней, предложено использование живой споровой культуры Bacillus licheniformis и Bacillus subtilis в сочетании с источником бетаина – Гепатрон 85%. Показана стимулирующая роль биологически активного комплекса в детоксикационной способности печени.

Ключевые слова: свиноводство, биологически активный комплекс, микрофлора кишечника, гепатопротектор

Для активизации обменных процессов и формирования желательных продуктивных характеристик у свиней широко применяются разнообразные биологически активные вещества [1, 2]. На наш взгляд, основным лимитирующим фактором продуктивного здоровья свиней, в период откорма, являются желудочно-кишечные инфекций, вызванные патогенной и условно-патогенной микрофлорой. Это, в свою очередь, отрицательно сказывается на состоянии обменных процессов, и как следствие, на детоксикационную способность печени.

Для решения данной проблемы, в период откорма, нами предложен способ использования биологически активного комплекса БиоПлюс (400гр/тонну) и Гепатрон 85% (100гр/тонну). Данное сочетание обеспечивает быстрое восстановление нормальной микробиологической экосистемы ЖКТ, поддерживает водный и ионный баланс клеток организма уменьшает потребность в энергии рациона за счет нормализации работы печени и кишечного эпителия.

Предложенная комбинация обеспечивает синергическое действие, способствуя росту концентрации общего белка крови на 7,2% , снижению уровня мочевины на 10,5% и холестерина на 4,7%. достоверному (P≤0,001) уменьшению уровня АлАТ и АсАТ на 19,4% и 8,6% соответственно. Сочетанное применение БиоПлюс и Гепатрон 85% совместимо с антибиотикотерапией и применением кокцидиостатиков.

Таким образа разработанная нами схема применения источников живой споровой культуры Bacillus licheniformis и Bacillus subtilis в сочетании с бетаином поддерживает водный и ионный баланс клеток организма уменьшает потребность в энергии рациона за счет нормализации работы печени и кишечного эпителия.

Литература.
1. Слащилина, Т.В. Биолого-физиологических статус свиноматок при использовании МРКД-1 / Т.В. Слащилина // Ярославль: Вестник АПК Верхневолжья. – 2015. – № 3. – С. 47 – 50.
2. Слащилина Т.В. Метаболический статус свиноматок в период супоросности при использовании стевии в качестве компонента рациона / Т.В. Слащилина, С.Н. Семёнов, Г.В. Парфёнов // Вестник ВГАУ. – Воронеж. – 2016. - № 2. – С. 93 – 101.

UDC 619:636.4: 636.085.16

THE SYNERGISTIC EFFECT OF A NEW BIOACTIVE MIX IN HOG INDUSTRY

G.V. Parfenov, S.N. Semenov, A.V. Aristov, T.V. Slashchilina, O.M. Marmurova

Federal Government-funded Educational Facility in Voronezh Oblast Voronezh State University of Agriculture named after Emperor Peter I; 1, Michurin St., Voronezh 394087, Russia
e-mail: ramon_ss@mail.ru

In order to maintain vitality of the indigenous intestinal microflora in pigs, the use of living spore culture Bacilluslicheniformis and Bacillussubtilis combined with the betaine source, Hepatron 85%, has been proposed. The stimulating effect of the bioactive mix on the detoxication capacity of liver has been shown.

Key words: hog industry, bioactive supplement, intestinal microflora, hepatoprotector

Various bioactive supplements are widely used for promoting the metabolic processes and developing the necessary productive features in pigs [1, 2]. In our opinion, the key limitation in pigs' productive health during feeding is the gastro-intestinal infections caused by pathogenic microflora and opportunistic pathogenic microflora. In its turn, this adversely affects the metabolic processes and thus the detoxication capacity of liver.

In order to resolve this issue, we proposed the use of bioactive mix BioPlus (400 gr/ton) and Hepatron 85% (100 gr/ton) during the feeding period. This combination provides rapid revitalization of the indigenous intestinal microbiological ecosystem, maintains water balance and ion balance of the body cells, and reduces the dietary energy demand due to normalized functioning of liver and intestinal epithelium.

The proposed combination provides a synergistic effect to propel 7.2% concentration growth of total blood protein, 10.5% reduction of urea level, 4.7% reduction of cholesterol, reliable ($P \leq 0.001$) reduction of the serum glutamic pyruvic transaminase level and serum glutamic oxaloacetic transaminase level by 19.4% and 8.6%, respectively. The combined use of BioPlus and Hepatron 85% is fully compatible with antibiotics treatment and the utilization of coccidiostatics.

Therefore, the proposed scheme of using living spore culture Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis combined with betaine maintains water balance and ion balance of the body cells and reduces the dietary energy demand due to normalized functioning of liver and intestinal epithelium.

References:
1. T.V. Slashchlina. Biological and Physiological Status of Sows in Using Multicomponent Plant Supplement 1 (MRKD-1) / T.V. Slashchlina // Yaroslavl: The Upper Volga Agribusiness Bulletin. – 2015. – No. 3. – Pp. 47 – 50.
2. T.V. Slashchlina. Metabolic Status of Sows during Pregnancy against Using Stevia as a Dietary Component / T.V. Slashchlina, S.N. Semenov, G.V. Parfenov // Voronezh State University of Agriculture Bulletin. – Voronezh. – 2016. – No. 2. – Pp. 93 – 101.

УДК 619:636.2.082

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭНЕРГОПРОТЕКТОРОВ ДЛЯ СОХРАННОСТИ ТЕЛЯТ С СИНДРОМОМ ГИПОТРОФИЯ.

Саврасов Д. А., Паршин П. А.

ФГБОУ ВО Воронежский Государственный Аграрный Университет им. императора Петра I, Воронеж, Россия, Россия, 394087, г.Воронеж, ул. Мичурина, 1
e-mail: dmitrij-savrasov@yandex.ru

Разработана комплексная схема лечения новорожденных телят с синдромом гипотрофия на основе энергопротективных лекарственных средств.

Ключевые слова: телята, лечение, карнитин, таурин, гематология, гипотрофия

Материалом для исследования послужили телята с синдромом гипотрофия голштино-фризской породы с рождения и до 21 суток жизни.

Для восстановления физиологического статуса новорожденных телят-гипотрофиков, нами была раз-

работана и апробирована комплексная схема лечения, которая включает в себя применение препаратов:10% раствора карнитина хлорида для анаболического воздействие на организм животного в дозе 100 мг/кг и энергопротектора таурина в дозе 100 мг/кг.

В результате апробации схемы терапии нами было установлено, что количество эритроцитов и содержание гемоглобина у телят увеличилось соответственно к 20 дню исследований на 33,7% и 49,3%. Содержание общего белка крови увеличилось на 96,9% достигая нормы. Количество глюкозы у животных после назначения лечения увеличилось в 2,2 раза, достигая физиологических показаний к концу лечения. Результаты биохимических данных позволяют отметить, что у телят с синдромом гипотрофия активность АсАТ и АлАТ постепенно нарастает под влиянием схемы терапии в 1,6 раза, через десять дней опыта, к этому времени они достигают оптимальных границ. Общие липиды к 10 дню исследований увеличились на 7,8%, а к 21 дню показатель у телят-гипотрофиков уменьшился на 4,1% достигая физиологических границ. Показатель холестерина и триглицеридов увеличились к 10 дню в 2,6 раза и 73,8% соответственно, не опускаясь до границ нормы, на 20 сутки жизни больных телят изучаемые показатели снизились на 27,5% и 32,8%. При лечении гипотрофии у телят на десятые сутки жизни, наблюдали более высокие показатели лизоцимной активности сыворотки крови 0,59±0,08 мкг/мл. У телят- гипотрофиков регистрировали более высокую фагоцитарную активность лейкоцитов – 98,7±0,85%. К концу исследований количество Т-лимфоцитов у телят составляло: 28,17±1,57%,. Популяция В-лимфоцитов у них была на уровне 6,01±0,72%. Количество иммуноглобулинов класса G в этот период у телят составило 16,21±1,90 мг/мл, Ig A - 0,41±0,03 мг/мл. У телят на 20 сутки жизни уровень Т- лимфоцитов составил – 27,21±2,95%, В-клеток - 6,92±1,97%. В этом возрасте у телят-гипотрофиков количество иммуноглобулинов класса Ig G составило 7,95±1,32 мкг/мл.

Таким образа разработанная нами комплексная схема лечения позволяет нормализовать основные обменные и энергетические процессы в организме новорожденных телят с синдромом гипотрофия, что ведет к укреплению иммунной системы и оптимизации дальнейшего роста, развития и сохранности животных.

Литература.
1. Саврасов Д. А. Этиология и клинико-морфологическая характеристика гипотрофии телят/ Д. А. Саврасов, П. А. Паршин // Ветеринарная патология - 2012. - Вып.2. - С.21 - 25.
2. Саврасов Д. А. Профилактика и терапия гипотрофии телят/ Д. А. Саврасов, П. А. Паршин // Вестник Воронежского государственного агарного университета. - 2012. – Вып. 1(32). - С. 85 - 90.
3. Шахов А. Г. Особенности защитных систем у телят с синдромом гипотрофия и их роль в развитии неонатальной патологии/ А. Г. Шахов, Д. В. Федосов, Л. Ю. Сашнина и др. // Ветеринарный врач. 2013. № 2. С. 27 - 30.

UDC 619:636.2.082

ENERGY PROTECTOR EFFECTIVENESS FOR THE VITALITY OF OLIGOTROPHY SYNDROME CALVES.

D. A. Savrasov, D. A. Parshin

Federal Government-funded Educational Facility in Voronezh Oblast Voronezh State University of Agriculture named after Emperor Peter I; 1, Michurin St., Voronezh 394087, Russia
e-mail: dmitrij-savrasov@yandex.ru

A comprehensive therapy method of newborn oligotrophy syndrome calves has been developed on the basis of energy protection medications.
Key words: calves, therapy, carnitine, taurine, haematology, oligotrophy

The study material was Holstein-Friesian oligotrophy calves from birth to the 21st day of life.

In order to restore the physiological status of the newborn oligotrophy calves, we have developed and tested a comprehensive therapy method which includes the use of: 10% solution of carnitine chloride for the anabolic effect on the animal body (100 mg/kg), and taurine, an energy protector (100 mg/kg).

Testing showed that the erythrocytes and hemoglobin grew by 33.7% and 49.3%, respectively, by the 20th study day. The total blood protein increased by 96.9% to reach the norm. After therapy, glucose raised 2.2 times to reach the physiological standards by the end of therapy. The biochemical data make it possible to mention that, due to therapy, the serum glutamic pyruvic transaminase and serum glutamic oxaloacetic transaminase activity gradually increases 1.6 times within ten days of the study to reach the optimum indices by that time. Total lipids grew by 7.8% by the 10th study day; and the index reduced by 4.1% by the 21st day, to reach the physiological boundaries. The cholesterol and tryglycerol indices increased 2.6 times and 73.8%, respectively, by the 10th day without dropping

to the regular boundaries; and the said indices reduced by 27.5% and 32.8% by the 20th day of life. During oligotrophy therapy, somewhat higher blood serum lysozyme activity 0.59±0.08 μg/ml was observed on the 10th day of life. Also, a higher phagocytic activity of white blood cells was observed, 98.7±0.85%. By the end of test, the number of T-lymphocytes was 28.17±1.57%. The B-lymphocyte population was in the order of 6.01±0.72%. At that time, the IgG concentration constituted 16.21±1.90 mg/ml, Ig A – 0.41±0.03 mg/ml. On the 20th day of life, T-lymphocytes constituted 27.21±2.95%, and B-cells – 6.92±1.97%. At that age, the IgG concentration constituted 7.95±1.32 μg/ml.

Therefore, our comprehensive therapy method enables the normalization of the key metabolic and energy processes in newborn oligotrophy syndrome calves, which leads to strengthening of the immune system and optimization of further growth, development and vitality of cattle.

References:
1. D. A. Savrasov. Etiology and Clinicopathologic Characteristics of Calf Oligotrophy / D. A. Savrasov, P. A. Parshin // Veterinary Pathology - 2012. – Issue 2. - Pp. 21 - 25.
2. D. A Savrasov. Calf Oligotrpohy Prevention and Therapy / D. A. Savrasov, P. A. Parshin // Voronezh State University of Agriculture Bulletin. - 2012. – Issue 1(32). - Pp. 85 - 90.
3. A. G. Shakhov. The Nature of Protective Systems in Oligotrophy Syndrome Calves and Their Role in the Development of Neonatal Pathologies / A. G. Shakhov, D. V. Fedosov, L. Yu. Sashnina et al. // Veterinary Physician. 2013. No. 2. Pp. 27 -30.

УДК 636.52/.58:57.089.36

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ КУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

Волкова Л.А., Ветох А.Н., Фомин И.К., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы, МО, Россия
142132, МО, п. Дубровицы, д. 60
e-mail: ludavolkova@inbox.ru

Изучена эффективность введения экзогенной ДНК в эмбриональные клетки кур с использованием лентивирусной векторной системы второго поколения. Показана высокая эффективность трансформации эмбрионов кур и получения трансгенных кур.

Ключевые слова: лентивирусные векторы, трансфекция, трансгенные куры.

Векторные системы, полученные на основе интегративных вирусов, таких как ленти- и ретровирусы являются эффективным инструментом для введения и выражения генов. В этой связи в рамках изучения условий введения трансгенов в эмбриональные клетки кур нами была изучена эффективность введения лентивирусных векторов в эмбриональные клетки кур в условиях in vivo. В работе была использована модифицированная лентивирусная векторная система второго поколения, в состав которой входили три различные плазмиды. Полученный лентивирусный вектор содержал ген eGFP под контролем гибридного энхансер-промотора CAG, содержащего энхансер ранних генов цитомегаловируса человека и промотор β-актина птиц. В ходе экспериментов путем изменения соотношения компонентов векторной системы были получены вирусные препараты с титром более 107 КОЕ/мл с последующим ультрацентрифугированием до 5 х 108 КОЕ/мл. Введение вирусного препарата в эмбрионы кур на 24 часу инкубации обусловило инфицирование от 30 до 80% эмбриональных клеток. Показана высокая эффективность получения трансгенных кур: эффективность трансгенеза (процент трансгенных особей от общего числа проколотых эмбрионов) составила 36%. Экспрессия репортерного белка eGFP была установлена, преимущественно, в клетках печени, кишечника, яйцевода, сердце, мышечной ткани, а также в половых клетках.

UDC 636.52/.58:57.089.36

THE EFFICIENCY OF EXOGENOUS DNA INTRODUCTION INTO CHICKEN EMBRYOS USING LENTIVIRAL VECTOR SYSTEM

Volkova L.A., Vetokh A.N., Fomin I.K., Volkova N.A., Zinovieva N.A.

All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after academy member L.K.Ernst, Moscow region, settlement Dubrovitsy, Russia
142132, Moscow region, settlement Dubrovitsy, д. 60
e-mail: ludavolkova@inbox.ru

Efficacy of introducing exogenous DNA into embryonic chicken cells using second-generation lentiviral vector system was studied. The high efficiency of the chicken embryos transformation and transgenic chicken production was shown.

Key words: lentiviral vectors, transfection, transgenic chickens.

Vector systems based on integrative viruses such as lenti- and retroviruses are an effective tool for introduction and expression of genes. In this regard, under the study of conditions for transgene introduction into embryonic chicken cells we investigated the efficiency of lentiviral vectors introduction into the embryonic chicken cells in vivo. A modified second-generation lentiviral vector system, which included three different plasmids was used. Obtained lentiviral vector contained eGFP gene under control of the hybrid enhancer-promoter CAG, containing the enhancer for early genes of human cytomegalovirus and avian β-actin promoter. By changing the proportion of vector system components, virus preparations with a titre of more than 107 CFU/ml were obtained, with following ultracentrifugation to 5 x 108 CFU/ml. Introduction of the viral preparation into chicken embryos by 24 hours of incubation resulted in infection of 30 to 80% of fetal cells. The high efficiency of producing transgenic chickens was shown: transgenesis efficiency (percentage of transgenic animals to the total number of embryos) was 36%. Expression of EGFP reporter protein was detected mainly in the liver cells, intestinal, oviduct, heart, muscle tissue, as well as in germ cells.

УДК 636.5.082

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИМОРДИАЛЬНЫХ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК УТОК

Томгорова Е.К., Волкова Н.А., Багиров В.А., Зиновьева Н.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы, МО, Россия
142132, МО, п. Дубровицы, д. 60
e-mail: tomgorova@rambler.ru

Выделены и охарактеризованы примордиальные зародышевые клетки уток. Определены факторы, влияющие на эффективность выделения данного типа клеток из эмбрионов.

Ключевые слова: примордиальные зародышевые клетки, утки, криобанк

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №16-16-04104.

Одной из приоритетных задач современных агропромышленных технологий, направленных на сохранение, поддержание и восстановление генофонда ценных пород и линий сельскохозяйственной птицы является создание криобанков биологического материала. Особенности биологии развития сельскохозяйственной птицы открывают широкие возможности по использованию в селекционных программах по сохранению и восстановлению генофонда популяций не только зрелых половых клеток (спермиев), но и их предшественников – зародышевых половых клеток. В этой связи нами были выделены и охарактеризованы примордиальные зародышевые клетки уток. Было установлено, что эффективность выделения ПЗК из эмбрионов уток зависит от способа дезагрегации ткани, метода очистки от других типов клеток, стадии развития эмбриона и типа фидерного слоя, используемого для культивирования клеток. Установлено, что эффективным методом дезагрегации эмбрионов уток с целью выделения эмбриональных клеток, в том числе ПЗК, является их ферментативная обработка с использованием 0,05% трипсина. Оптимальным возрастным периодом для получения культуры эмбриональных клеток, максимально обогащенной ПЗК, является возраст эмбрионов от 6 до 7 дней. Разделение клеток разных типов с учетом их различной способности к адгезии позволяет получать культуру ПЗК, максимально очищенную от других типов клеток. При

этом, единичные эмбриональные фибробласты, оставшиеся в клеточной суспензии ПЗК после отделения других типов клеток, при последующем культивировании служат в качестве фидерного слоя, на который прикрепляются ПЗК. Использование собственных фибробластов в качестве фидерного слоя оказалось наиболее результативным по сравнению с использованием других типов фидерных слоев: формирование колоний ПЗК наблюдалось, преимущественно, на 4 сутки культивирования.

UDC 636.5.082

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF DUCKS PRIMORDIAL GERM CELLS

Tomgorova E.K., Volkova N.A., Bagirov V.A., Zinovieva N.A.

All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after academy member L.K.Ernst, Moscow region, settlement Dubrovitsy, Russia
142132, Moscow region, settlement Dubrovitsy, д. 60
e-mail: tomgorova@rambler.ru

Duck primordial germ cells were isolated and characterized. The factors that affect the separation efficiency of this type cells from embryos were determined.

Key words: primordial germ cells, ducks, cryobank

The research was conducted under financial support of Russian Scientific Foundation (project №16-16-04104)

One of priority tasks the modern agroindustrial technologies, which aim at the preservation, maintenance and restoration the gene pool valuable species and lines of poultry is to create cryobanks biological material. Features of poultry biology offer great opportunities for the use in breeding programs for conservation and restoration of the gene pool populations not only of mature reproductive cells (spermatozoa), but also their predecessors - the embryonic germ cells. In this regard we have isolated and characterized primordial germ cells of ducks. It was found that the separation efficiency of PGCs from duck embryo depends on the methods of disaggregation tissue and purification from other cell types, stages of development of the embryo and the type of feeder layer used for culturing the cells. it was determined that an effective method of disaggregation duck embryos in order to isolate embryonic cells including PGCs is their enzymatic treatment with 0.05% trypsin. The optimal age period for the culture of embryonic cells, the most enriched PGCs, is the age of the embryos from 6 to 7 days. Separation of different cell types based on their different capacity to adhere allows to obtain culture PGCs which is maximally purified from other cell types. Moreover, isolated embryonic fibroblasts that were left in the cell suspension PGCs after separation of the other types cultured cells in the subsequent serve as a feeder layer on which PGCs are attached. Using own fibroblasts as feeder layer was the most resultative compared with other types of feeder layers: the PGCs colony formation was observed mainly by 4 days of cultivation.

УДК 636.52/.58:57.089.36

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БУСУЛЬФАНА ДЛЯ ВЫКЛЮЧЕНИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У ПЕТУХОВ

Ветох А.Н., Волкова Н.А., Котова Т.О., Белоглазов Д.В., Зиновьева Н.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы, МО, Россия
142132, МО, п. Дубровицы, д. 60
e-mail: anastezuya@mail.ru

Разработаны и оптимизированы методические приемы по выключению сперматогенеза у петухов. Определена оптимальная концентрация бусульфана для элиминации сперматогенных клеток.

Ключевые слова: петухи, сперматогенез, сперматогенные клетки, сперматогонии, бусульфан

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №16-16-10059.

Получение трансгенных и химерных особей посредством трансплантации в семенники самцов-реципиентов донорских сперматогогенных клеток, в частности, сперматогоний рассматривается как одно из перспективных направлений в биотехнологии. При этом ключевым моментом, определяющим эффективность данной технологии, является элиминация собственных половых клеток у самцов-реципиентов с целью повышения доли донорских сперматогенных клеток в семенных канальцах семенников. В этой связи нами были разработаны и оптимизированы методические подходы по выключению сперматогенеза у петухов. Для элиминации сперматогенных клеток использовали раствор бусульфана в концентрации от 40 мг до 100 мг/ кг живой массы.

На основании гистологических исследований семенных канальцев семенников было установлено, что оптимальной для выключения сперматогенеза у петухов является концентрация бусульфана от 60 мг/кг до 80 мг/кг живой массы. Показано достоверное снижение количества сперматогенных клеток в семенных канальцах до 95 раз по сравнению с контролем до незначительной популяции сперматогенных клеток, представленной, в основном, клетками Сертоли (95%), что свидетельствуют о высокой результативности использования бусульфана для элиминации сперматогенных клеток в семенниках петухов.

UDC 636.52/.58:57.089.36

EFFICIENCY OF USE BUSULFAN FOR SHUTDOWN SPERMATOGENESIS IN ROOSTERS

Vetokh A.N., Volkova N.A., Kotova T.O., Beloglazov D.V., Zinovieva N.A.

All-Russian Research Institute of Animal Husbandry named after academy member L.K.Ernst, Moscow region, settlement Dubrovitsy, Russia
142132, Moscow region, settlement Dubrovitsy, д. 60
e-mail: anastezuya@mail.ru

Methodological techniques for shutdown spermatogenesis in roosters have been developed and optimized. the optimal concentration of busulfan for the elimination of spermatogenic cells was determined.

Key words: roosters, spermatogenesis, spermatogenic cells, spermatogonia, busulfan

The research was conducted under financial support of Russian Scientific Foundation (project №16-16-10059)

Production of transgenic and chimeric animals by transplanting donor spermatogonia cells into the testes of male recipient is regarded as one of the promising directions in biotechnology. At the same time the key point in determining the effectiveness of this technology is the elimination in male recipient their own reproductive cells in order to increase the proportion of donor spermatogenic cells in the seminiferous tubules of the testes. In this regard, we have developed and optimized methodological approaches to shutdown spermatogenesis in roosters. Busulfan solution at a concentration from 40 mg to 100 mg per kg of live weight was used to eliminate spermatogenic cells.

The optimal for the shutdown spermatogenesis in roosters is busulfan concentration from 60 mg / kg to 80 mg / kg of live weight. It was determined on the basis of histological studies the seminiferous tubules of testes. A significant reduction in the number to an insignificant population of spermatogenic cells in the seminiferous tubules up to 95 times was shown in comparison with the control. And it was represented mainly by the Sertoli cells (95%), which indicate a high performance use busulfan for the elimination of spermatogenic cells in the testis roosters.

УДК 575.2: 636.4

GWAS АНАЛИЗ ВРОЖДЁННЫХ ПОРОКОВ РАЗВИТИЯ У СВИНЕЙ КРУПНОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ.

Траспов А.А.[1], Костюнина О.В.[1], Свеженцева Н.А.[2], Сизарева Е.И.[2], Зиновьева Н.А.[1]

[1] Всероссийский НИИ животноводства имени Л. К. Эрнста, Подольск, Россия;
[2] ООО «Знаменский СГЦ», ул. Московская, 31, г. Орёл, Орловская обл., 302030, Российская Федерация
Аннотация: Проведено полногеномное GWAS исследование 24 учитываемых нежелательных признаков у 48 хряков крупной белой породы и их потомков с использованием ДНК-чипов средней плотности Illumina 60K Porcine BeadChips.

Ключевые слова: SNP, свиньи, геномная селекция, GWAS, пороки.

Введение. Полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) являются мощным инструментом для генетического анализа у человека и других видов [1]. С 2009 г. биочипы средней плотности, содержащие 60K однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) [2], позволили проводить высокоскоростную GWAS диагностику с хозяйственно-полезными признаками свиней [3].

Материал и методы. Материалом для исследований являлись образцы хряков крупной белой породы (n=48). Был произведён расчёт частот встречаемости 24 нежелательных признаков у потомков хряков. Для генотипирования был использован чип – Illumina Porcine Beadchip 60K (San Diego, USA). По результатам контроля качества, проведенном с использованием программного пакета Plink 1.9, для анализа было отобрано 40036 полиморфных SNP. GWAS анализ был проведён в программном пакете GEMMA [6]. Для подтверждения достоверного влияния SNP и определения значимых регионов в геноме животных были использованы тесты Бонферрони (BFR-P<1,24×10^{-6}), и FDR, с пороговым значением P<0,01 [4]. Визуализацию данных осуществляли в пакете qqman с помощью языка программирования R [5].

Результаты. По результатам GWAS анализа было просканировано 24 нежелательных признака. Согласно критерию FDR с пороговым значением P<0,01,

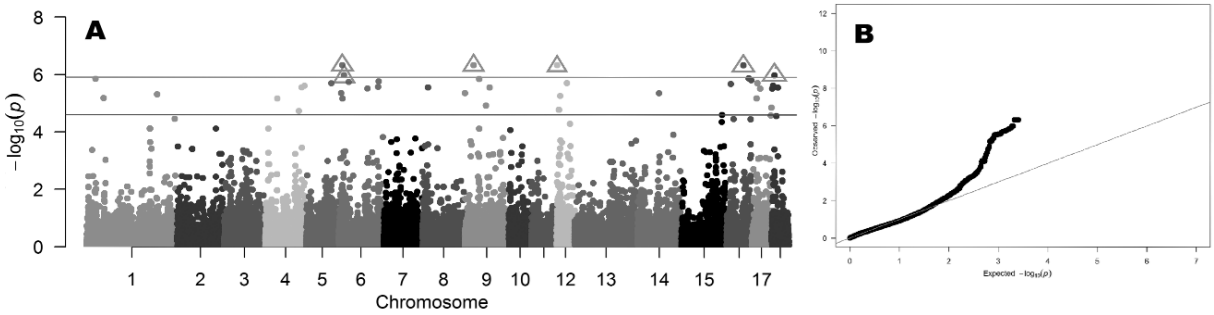


Рисунок 1. Результаты GWAS (A) и соответствующие вероятности распределения достоверностей P (q-q графики – B) по ST. Красные и синие линии - порог Бонферрони и Fdr, соответственно. Треугольники маркируют соответствующие гены, прошедшие валидацию по BFR (P < 0.05).

Из 24 изучаемых признака был отобран один – односторонний крипторхизм (ST), ассоциированный с определенными участками генома. Всего было идентифицировано 30 SNP, прошедших тест FDR, из которых 6 прошли тест BFR (ALGA0119683 - 4.74×$10^{-7,}$ ALGA0034772 - 1.04×10^{-6}, ASGA0042354 - 4.74×10^{-7}, ASGA0052524 - 4.74×10-7, MARC0060696-4.74×10-7, ALGA0111489 - 1.04×10-6).

Литература.

1. Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., et al., Five years of GWAS discovery, Am. J. Hum. Genet., 2012, vol. 90, pp. 7–24.

2.Ramos, A.M., Crooijimans, R.P., Affara, N.A., et al., Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology, PLoS One , 2009, vol. 4, no. 8. e6524.6521.

3. Grindflek, E., Lien, S., Hamland, H., et al., Large scale genomewide association and LDLA mapping study identifies QTLs for boar taint and related sex steroids, BMC Genomics, 2011, vol. 12, p. 362.

4. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society, Series B, 1995, 57: 289-300.

5. Turner S.D. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and Manhattan plots. bioRxiv, 2014. Preprint first posted online May 14, 2014 (doi: 10.1101/005165).

6. Zhou X, Stephens M. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. Nat Genet. 2012;44(7): 821–24. doi: 10.1038/ng.2310 [PMC free article] [PubMed]

UDC 575.2: 636.4

GWAS ANALYSIS OF CONGENITAL MALFORMATIONS IN PIGS OF LARGE WHITE BREED.

Traspov A.A.[1], Kostyunina O.V.[1], Svegentseva N.A.[2], Sizareva E.I.[2], Zinovieva N.A.[1]

[1]All-Russian Research Institute of animal breedidng named after L.K. Ernst, Podolsk, Russia.
[2]OOO «Znamensky SGC», st. Moscow, 31, Orel, Orel region, 302030, Russia

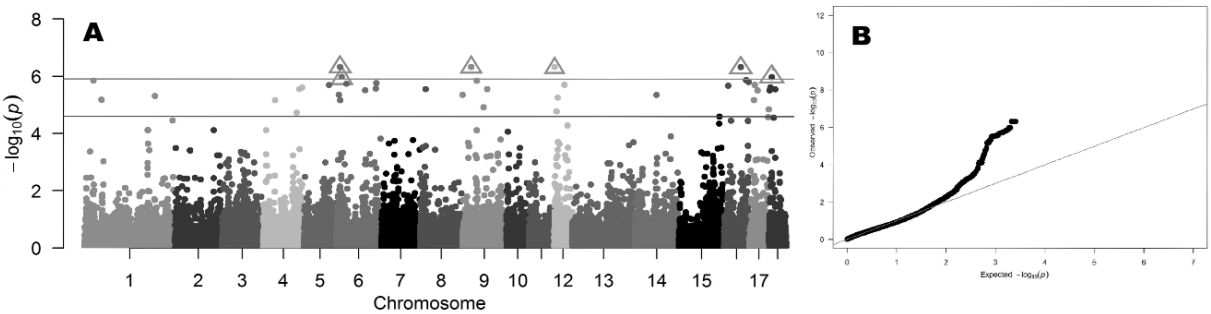
Abstract. The full genome GWAS study Large White pigs by 24 signs of malformations with the use of DNA chips medium density Illumina 60K Porcine Beadchips.

Key words: SNP, pigs, genomic selection, the GWAS, malformations.

Introduction. Genome-wide association studies (GWAS) is a powerful tool for genetic analysis in humans and other species [1]. Since 2009, high-density microarrays containing 60K nucleotide polymorphisms (SNP) [2] made it possible to carry out high-speed GWAS diagnostics with economically important traits of pigs [3].

Material and methods. The tissue samples of 48 boars of large white breed were used for analysis. We conducted the calculations of frequencies of 24 undesirable traits in progeny of boars. Illumina Porcine Beadchip 60K (San Diego, USA) was used for genotyping. After the quality control conducted by Plink 1.9 software package, 40036 polymorphic SNP were selected for further analysis. GWAS analysis was performed by GEMMA software package [6]. To confirm the significant impact of SNP and identify significant regions in the animal genome the Bonferroni (BFR-P <1.24 × 10-6), and FDR tests were used, with the threshold value of P < 0,01 [4]. Data visualization was performed using the qqman package under R programming language [5].

Results. As a result, 24 undesirable traits were scanned by GWAS analysis. According to the FDR criterion with a threshold equal P < 0,01, only one single trait - unilateral cryptorchidism (ST) was associated with certain genome regions. It total, 30 SNPs were identified which passed through FDR test, from which 6 SNPs passed through BFR test (ALGA0119683 - 4.74 × 10^{-7}, ALGA0034772 - 1.04 × 10^{-6}, ASGA0042354 - 4.74 × 10^{-7}, ASGA0052524 - 4.74 × 10^{-7}, MARC0060696 -4.74 × 10^{-7}, ALGA0111489 (Fig. 1).



Picture 1. GWAS results (A, B) and the reliabilities corresponding to the probability distribution P (q-q graphics - B) ST. The red and blue lines - Bonferroni and Fdr, thresholds respectively. The triangles mark the corresponding genes, validated by BFR threshold (P <0.05).

References:
1. Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., et al., Five years of GWAS discovery, Am. J. Hum. Genet., 2012, vol. 90, pp. 7–24.
2.Ramos, A.M., Crooijimans, R.P., Affara, N.A., et al., Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology, PLoS One , 2009, vol. 4, no. 8. e6524.6521.
3. Grindflek, E., Lien, S., Hamland, H., et al., Large scale genomewide association and LDLA mapping study identifies QTLs for boar taint and related sex steroids, BMC Genomics, 2011, vol. 12, p. 362.
4. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society, Series B, 1995, 57: 289-300.
5. Turner S.D. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and Manhattan plots. bioRxiv, 2014. Preprint first posted online May 14, 2014 (doi: 10.1101/005165).
6. Zhou X, Stephens M. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. Nat Genet. 2012;44(7): 821–24. doi: 10.1038/ng.2310 [PMC free article] [PubMed]

УДК 606:636.087.7

КОМПЛЕКСНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ПОЛУЧЕНИЕМ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОРМОВЫХ ПРОДУКТОВ

Гаврилов С.В., Мингазова Л.А., Хусаинов И.А., Крякунова Е.В., Канарская З.А., Канарский А.В.

Казанский национальный исследовательский технологический университет
Казань, Россия
420015, Республика Татарстан, г. Казань, ул.К.Маркса, 68
e-mail: zleisan1@mail.ru

Кормовой продукт из целлолигнина торфа способен адсорбировать микотоксин Т-2. Отъемно-доливной метод культивирования позволяет увеличить выход кормового лактата кальция. Иммобилизация на целлолигнине декстрансахаразы увеличивает выход кормового декстрана.

Ключевые слова: кормовые продукты, целлолигнин, декстран, молочная кислота, лактат кальция

Применение методов биотехнологии для получения кормов и кормовых добавок позволяет существенно повысить качество этих продуктов, получать кормовые продукты с новыми потребительскими свойствами, способствующими повышению экономической эффективности животноводства. При этом производство кормовых продуктов биотехнологическими способами должно основываться на комплексной переработке растительного сырья.

Цель настоящей работы - получение полифункциональных кормовых продуктов биотехнологическими методами из лигноцеллюлозного сырья.

Разработана технология получения кормового продукта из целлолигнина торфа путем его биоконверсии мицелиальными грибами Trichoderma reesei M18. Инактивированные мицелиальные грибы Trichoderma reesei M18 в сочетании с лигнином обладают выраженной адсорбирующей способностью к Т-2 микотоксину. Полученный продукт может быть рекомендован к применению в животноводстве и птицеводстве в качестве адсорбента для профилактики Т-2 микотоксикоза.

Показана возможность получения кормового лактата кальция культивированием гриба Rhizopus oryzae и бактерии Streptococcus thermophilus на питательных средах из гидролизатов целлолигнина и крахмала зерноотходов. Установлено, что культивирование отъемно-доливным методом позволяет увеличить выход молочной кислоты и лактата кальция на 20% по сравнению периодическим методом культивирования.

Экспериментально показана возможность получения кормового декстрана, выполняющего роль пребиотической добавки, культивированием бактерий Leuconostok mesenteroides на питательных средах, полученных из сахаросодержащих травянистых культур (кукуруза, сорго, райграс). Установлено, что применение фермента декстрансахаразы, иммобилизованного на целлолигнине, позволяет значительно снизить удельный расход фермента, сократить продолжительность ферментации и повысить выход декстрана.

UDK 606:636.087.7

COMPLEX BIOTECHNOLOGICAL PROCESSING OF VEGETABLE RAW MATERIAL WITH OBTAINING OF POLYFUNCTIONAL FEED PRODUCTS

Gavrilov S.V., Mingazova L.A., Husainov I.A., Kryakunova E.V., Kanarskaya Z.A., Kanarskii A.V.

Kazan National Research Technological University
Kazan, Russia
420015, Republic of Tatarstan, Kazan, 68 Karl Marx street
e-mail: zleisan1@mail.ru

A fodder product from peat cellolignin can adsorb T-2 mycotoxin. Cultivation in sequencing batch reactor allows increase the yield of fodder calcium lactate. Iimmobilization of dextransucrase on cellolignin increases the yield of dextran.

Key words: fodder product, cellolignin, dextran, lactic acid, calcium lactate

The using of biotechnological methods to produce fodder and fodder additives can significantly improve the quality of these products and allows to receive feed products with new consumer properties, which help to enhance the economic efficiency of animal husbandry. The production of feed products by biotechnological methods should be based on complex processing of vegetable raw materials.

The purpose of this work is obtaining of polyfunctional feed products from lignocellulosic feedstock by biotechnological methods.

The technology of obtaining a fodder product from peat cellolignin by means of its bioconversion by micellar fungi Trichoderma reesei M18 was developed. Inactivated micellar fungus Trichoderma reesei M18 in combination with the lignin has a pronounced ability for adsorbing T-2 mycotoxin. The resulting product can be recommended for application in animal husbandry and aviculture as an adsorbent for the prevention of T-2 mycotoxicosis.

The possibility to obtain fodder calcium lactate by cultivating Rhizopus oryzae fungi and Streptococcus thermophilus bacteria on nutrient media containing cellolignin hydrolysates and grain waste starch was shown. It was found that the cultivation in sequencing batch reactor allows 20% increase the yield of lactic acid and calcium lactate in comparison with periodic culturing method.

The possibility to obtain fodder dextran as the prebiotic supplement by cultivating Leuconostok mesenteroides bacteria on nutrient media from sugar-containing herbaceous crops (maize, sorghum, ryegrass) was experimentally proved. It was established that the application of immobilized on cellolignin dextransucrase enzyme can significantly reduce the specific consumption of the enzyme and the fermentation duration as well as can improve the yield of dextran.

УДК 575.174: 575.858: 599.735.52

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА CYTB МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК СНЕЖНОГО БАРАНА ЯКУТИИ

Гладырь Е.А.[1], Грицышин В.А. [1], Охлопков И.М.[1,2], Брем Г.[1,3], Зиновьева Н.А.[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», г. Подольск, п. Дубровицы (Россия), 142132, Московская область, г. Подольск, п. Дубровицы, д. 60,
e-mail: elenagladyr@mail.ru
[2] Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск 677890
[3] Институт животноводства и генетики ветеринарно-медицинского университета, Вена, А -1210 Австрия

С целью оценки биоразнообразии и популяционной структуры O. nivicola, изучен полиморфизм полного гена CytB географических популяций снежного барана Якутии.

Ключевые слова: снежный баран, ген CytB, биоразнообразие, полиморфизм

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №14-36-00039).

Снежный баран (Ovis nivicola Eschscholtz, 1829), или толсторог - эндемик России и входит в состав фаунистических комплексов огромных по территории горных систем Северной Азии (Багиров В.А. и др., 2016).

Полиморфизм гена CytB географических популяций снежного барана Якутии, представленных в исследовании 80 животными, населяющими 7 горных хребтов (MOM - Момский, SAR – Сарычева, CHE - Черского, SKH - Сунтар-Хаята, VER – Верхоянский, ORU - Орулган, TIK - Хараулахский), был оценен по полной последовательности гена CytB длиной 1140 п.о., изучено распределение гаплотипов CytB между горными хребтами, выполнено сравнение гаплотипического (H) и нуклеотидного (π) разнообразия.

У азиатского снежного барана Якутии при анализе полиморфизма гена CytB было выявлено 18 гаплотипов, один из которых (ON2) был идентичен базовой последовательности (Accession No. AJ867262.1). Максимальное число гаплотипов – пять, показано для животных двух хребтов – ORU и SKH, представленных 24 и 10 особями, соответственно. Наиболее распространенный среди изученных популяций O. nivicola Якутии гаплотип ON17 идентифицирован у 18 (22,5%) особей, населяющих три хребта - VER, ORU и TIK. В гене CytB снежного барана Якутии выявлено 30 мутационных событий и 28 замен нуклеотидов, при этом идентифицированные полиморфизмы были представлены транзициями или трансверсиями, с соотношением R=21,34 (тест Hasegawa-Kishino-Yano модель (+I)), мутаций типа Indels обнаружено не было. Количество нуклеотидных замен в гаплотипах, описанных нами впервые, варьировало от 2-х (ON6) до 8-и (ON3, ON10, ON14, ON15), и в большинстве своем они локализовались в третьей позиции кодона (80,0%) что объясняется наибольшей вариабельностью из-за вырожденности кода (Zardoya et al. 1996). Анализ нуклеотидной эволюции CytB с использованием модели Tamura-Nei в изученной нами выборке снежного барана характеризовался следующим нуклеотидным составом: A=31,61%, T/U=26,16%, C=29,44%, G=12,79%, что подтверждает тенденцию аминокислотного состава мтДНК плацентарных, основанную преимущественно на увеличении частот оснований A+T (Банникова А.А., 2004).

Минимальные попарные значения Fst между популяциями показали две довольно близкие пары популяций: ORU/TIK и SAR/ SKH, 0,28302 и 0,14487, соответственно.

Анализ материнского биоразнообразия, проведенный на шести популяциях снежного барана – MOM, SAR, SKH, VER, ORU, TIK, выявил достаточно высокое гаплотипическое разнообразие (H) и сравнительно низкую нуклеотидную изменчивость (π), что, вероятно согласуются с предположением о прохождении популяцией снежных баранов Якутии исторического демографического "бутылочного горлышка", при этом высочайшие значения H и максимальные π показали популяции O. nivicola хребтов SAR и SKH, 0,9000 и 0,0026; 0,8444 и 0,0045, соответственно, а минимальные - популяция TIK (0,5128 и 0,0007). Показатели популяций VER и ORU показали средние значения, 0,5931 и 0,0015; 0,6123 и 0,0017, соответственно, что указывает на прохождения в недалеком прошлом через фазу значительного снижения численности либо проявления эффекта основателя.

Молекулярно-филогенетический анализа подтвердил разделение снежных баранов на азиатский (O. nivicola) и американский (O. canadensis, NC 015889.1) виды, что согласуется с ранее полученными результатами (Кузнецова М.В. и др. 2005, Данилкин А.А., 2005). Анализ структуры медианной сети гаплотипов снежных баранов Якутии указывает на разделение центральных клад гаплотипов (ON17, ON11, ON12) по биогеографическому принципу.

Литература.
1. Багиров В.А., Охлопков И.М., Зиновьева Н.А. Снежный баран Якутии: генетическое разнообразие и пути сохранения генофонда // Издательство ВИЖ им. Л.К. Эрнста, МО. -2016. – 270 с.
2. Zardoya R., Arouheif E., Meyer E. Evolution and orthology of hedgehog genes// Trends in genetics. V. 12. I.12. 1996. P.496–497.
3. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журнал общей биологии. – 2004. - том 65. - № 4. - с. 278-305.
4. Кузнецова М. В., Шемякин О.А., Медведев Д. Г., Данилкин А.А. Филогенетическая реконструкция эволюции снежных баранов: анализ мтДНК // Копытные в зоопарках и питомниках: Межвед. сб. науч. и науч.-метод. тр. / Московский зоопарк. – 2005. - с. 75-79.
5. Данилкин А.А. Млекопитающие России и сопредельных регионов. Полорогие. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 550 с.

UDK 575.174: 575.858: 599.735.52

RESEARCH OF POLYMORPHISM OF MITOCHONDRIAL DNA CYTB YAKUTIA SNOW SHEEP

Gladyr E.A.,[1] Gritsyshin V.A., [1] Okhlopkov I. M.,[1,2] Brem G.[1,3] and Zinovieva N.A. [1]

[1] Ernst All- Russia Research Institute for Animal Husbandry, Dubrovitsy settlement, 142132 Moscow oblast, Russia
e-mail: elenagladyr@mail.ru
[2] Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 677890 Russia
[3] Institute of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine, Vienna, A -1210 Austria

Supported by Russian Science Foundation (project 14-36-00039)

The snow sheep (Ovis nivicola Eschscholtz, 1829) or bighorn sheep is endemic to Russia and is part of the huge faunal assemblages within the mountain systems of Northern Asia (Bagirov V.A., et al., 2016).

The CytB gene polymorphism in geographical populations of Yakutia snow sheep presented in the study by 80 animals inhabiting seven mountain ranges (MOM - Momsky, SAR – Sarychev, CHE - Chersky, SKH - Suntar-Hayat, VER – Verkhoyansky, ORU - Orulgan, TIK - Kharaulakh), was evaluated on the complete CytB gene sequences with a length of 1140 bp. The distribution of CytB haplotypes among mountain ranges was studied and haplotypes (H) and nucleotide (π) diversity was evaluated.

The analysis of the polymorphism of the CytB gene in Asian snow sheep of Yakutia revealed 18 haplotypes, one of which (ON2) was identical to the base sequence (Accession No. AJ867262.1). The maximal number of haplotypes - five are shown for animals of two ranges – ORU and SKH, which were presented by 24 and 10 individuals, respectively. The most common among the studied populations of O. nivicola of Yakutia haplotype ON17 was detected in 18 individuals (22.5%) inhabiting three ranges - VER, ORU and TIK. We revealed in the CytB gene of Yakutia snow sheep 30 mutational events and 28 substitutions of nucleotides, wherein the identified polymorphisms were represented by transitions or transversions, with the ratio R=21.34 (Hasegawa-Kishino-Yano test model (+I)). The Indels mutations were not found. The number of nucleotide substitutions in the haplotypes, which were described for the first time ranged from 2 (ON6) to 8 (ON3, ON10, ON14, ON15), and most of them were localized in the third position of the codon (80.0%) due to the greatest variability due to the degeneracy of the code (Zardoya et al. 1996). Analysis of CytB nucleotide evolution using the model of Tamura-Nei in the studied bighorn sheep was characterized by the following nucleotide composition: A=31.61%, T/U=26.16%, C=of 29.44%, G=12.79%, which confirms the trend of amino acid

composition of placental mtDNA, based primarily on the increase of the frequencies of the bases A+T (Bannikova A. A., 2004). Minimal pairwise Fst values between populations showed two rather similar pairs of populations: ORU/TIK and SAR/ SKH – 0.28302 and 0.14487, respectively.

Analysis of maternal biodiversity, carried out on six populations of bighorn sheep – MOM, SAR, SKH, VER, ORU, TIK, revealed a considerably high haplotypic diversity (H) and relatively low nucleotide variability (π), which presumably are consistent with the assumption of passage of populations of Yakutia snow sheep of historical demographic bottleneck. The higher N and π values were shown for SAR and SKH populations of O. nivicola - 0.9000 and 0.0026; 0.8444 and 0.0045, respectively, and the lowest – for TIK population (0.5128 and 0.0007). The average values were found in VER and ORU populations – 0.5931 and 0.0015; 0.6123 and 0.0017, respectively, indicating the passage in the recent past through a phase of significant reduction in the number or manifestations of a founder effect.

Molecular phylogenetic analysis confirmed the separation of Asian snow sheep (O. nivicola) and American (O. canadensis, NC 015889.1), which is in accordance with previously obtained results (Kuznetsov M.V. et al. 2005, Danilkin A.A., 2005). Analysis of the structure of the median network of haplotypes of Yakutia snow sheep indicates the separation of the Central clades of haplotypes (ON17, ON11, and ON12) by the biogeographical principle.

Key words: snow sheep, gene CytB, biodiversity, polymorphism

References:
1. Bagirov V.A., Okhlopkov I.M., Zinovieva N.A. The snow sheep of Yakutia: genetic diversity and conservation of gene pool // Publisher L.K. Ernst Institute for Animal Husbandry, Moscow region. – 2016, 270 p.
2. Zardoya R., Arouheif E., Meyer E. Evolution and orthology of hedgehog genes// Trends in genetics. V. 12. I. 12. 1996. P. 496–497.
3. Bannikova A.A. Molecular markers and modern phylogenetics of mammals // Journal of General biology. – 2004. – V. 65. - No. 4. - pp. 278-305.
4. Kuznetsova M.V., Shemyakin O.A., Medvedev D.G., Danilkin, A.A. Phylogenetic reconstruction of the evolution of bighorn sheep: analysis of the mtDNA // Ungulates in zoos and nurseries: Mezwed. SB. nauch. and nauch.-method. Tr. / Moscow zoo. – 2005. - pp. 75-79.
5. Danilkin A.A. Mammals of Russia and adjacent regions. Bovids // Moscow: Partnership of scientific publications KMK, 2005. - 550 p.

УДК: 636.018: 636.4: 575.162

ДИАГНОСТИКА МУТАЦИИ В ГЕНЕ SLC2A2, АССОЦИИРОВАННОЙ С ГАПЛОТИПОМ ФЕРТИЛЬНОСТИ FH2 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Гладырь Е.А.[1], Волкова В.В.[1], Сермягин А.А. [1], Денискова Т.Е. [1], Коновалова Е.Н. [1], Филипченко А.А. [1], Терновская О.А.[2], Зиновьева Н.А. [1]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста», г. Подольск, п. Дубровицы (Россия), 142132, Московская область, г. Подольск, п. Дубровицы, д. 60, e-mail: elenagladyr@mail.ru
[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, 127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

Создана тест-система анализа полиморфизма гена SLC2A2 (rs379675307), ассоциированного с гаплотипом фертильности симментальского скота FH2. Частота встречаемости скрытых носителей FH2 детектирована на уровне 2,78%.

Ключевые слова: Крупный рогатый скот, SLC2A2, гаплотип FH2, симментальская порода, полиморфизм

Работа выполнена при поддержке ФАНО, тема 19.2.

Использование ограниченного числа производителей в культурных породах крупного рогатого скота, снижение эффективного размера популяций приводит к росту гомозиготности и фенотипическому проявлению рецессивных генетических дефектов, так называемых LoF-мутаций (Jansen et al., 2013; Daetwyler et al., 2014;Романенкова, 2015, 2016; Зиновьева Н.А., 2015, 2016). В настоящее время у симментальского скота идентифицирован ряд наследственных дефектов, имеющих статус «гаплотипов» - FH1, FH2, FH3, FH4, FH5. Идентификация геномного региона на BTA1 и мутации, приводящей к возникновению карликовости, «симментальского гаплотипа 2, FH2» (2010), показали идентичность проявления с синдром Фанкони-Биккеля (FBS), который является наследственным заболеванием, аутосомно-рецессивного типа наследования, идентифицированным у

человека и ряда других животных. У скота симментальской породы FBS проявляется посредством мутации в гене SLC2A2 (rs379675307), кодирующим GLUT2 (Pausch H. Et al., 2015), отвечающим за глюкозный транспорт и встречается в австрийской популяции симментальской породы в среднем с частотой 4%. Созданная тест-система предусматривает ПЦР амплификацию фрагмента гена SLC2A2, содержащего исследуемую мутацию, с последующим гидролизом образующихся фрагментов эндонуклеазой AgsI. Исследование 108 животных 7 племорганизаций, в том числе 60 коров и 48 быков-производителей выявило наличие 3 скрытых носителя FH2 среди быков, что соответствует частотам встречаемости, соответственно, 0 и 6,25%, и в среднем по популяции 2,78%. Кроме того, данная каузальная мутация, описанная как FH2 гаплотип может встречаться в гомозиготном состоянии, и достаточно свободно распространяться в гетерозиготном виде посредством искусственного осеменения коров спермой быков-носителей. Считаем целесообразным использовать созданную тест-система для массового скрининга племенного симментальского скота в Российской Федерации с целью контроля за распространением скрытых носителей и предотвращением появления гомозиготных носителей FH2.

Литература.
1. Jansen S, Aigner B, Pausch H, Wysocki M, Eck S, Benet-Pagès A, Graf E, Wieland T, Strom TM, Meitinger T, Fries R. Assessment of the genomic variation in a cattle population by re-sequencing of key animals at low to medium coverage. BMC Genomics, 2013, 14: 446.
2. Daetwyler H.D., Capitan A., Pausch H., Stothard P., van Binsbergen R., Brøndum R.F., Liao X., Djari A., Rodriguez S.C., Grohs C., Esquerré D., bouchez O., Rossignol M.-N., Klopp C., Richa D., Fritz S., Eggen A., Bowman P.J., Coote D., Chamberlain A.J., Anderson C., Van Tassell C.P., Hulsegge I., Goddard M.E., Guldbrandtsen B., Lund M.S., Veerkamp R.F., Boichard D.A., Fries R., Hayes B.J. Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. Nature Genet., 2014, 46: 858–865.
3. Романенкова О.В., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Разработка тест-системы для диагностики гаплотипа фертильности крупного рогатого скота HH3, ассоциированного с ранней эмбриональной смертностью // Достижения науки и техники АПК. — 2015. — №11. — С. 91—94.
4. Романенкова О.В., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Скрининг российской популяции крупного рогатого скота на наличие мутации в APAF1, ассоциированной с гаплотипом фертильности HH1// Достижения науки и техники АПК. — 2016. — Т. 30. — №2. — С. 94—97.
5. Зиновьева Н.А., Стрекозов Н.И., Ескин Г.В., Турбина И.С., Янчуков И.Н., Ермилов А.Н. Моногенные наследственные дефекты и их роль в воспроизводстве // Животноводство России. — 2015. — №6. — С. 30—32.
6. Зиновьева Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского скота //
Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 4. С. 423-435.
7. Pausch H., Schwarzenbacher H., Burgstaller J.,Flisikowski K., Wurmser C., Jansen S., Jung S., Schnieke A., Wittek T., Fries КЮ Homozygous haplotype deficiency reveals deleterious mutations compromising reproductive and rearing success in cattle// BMC Genomics (2015) 16:312

UDK 636.018: 636.4: 575.162

DIAGNOSTICS OF MUTATIONS IN SLC2A2 GENE ASSOCIATED WITH FH2 HAPLOTYPE OF FERTILITY IN CATTLE

Gladyr E.A.,[1] Volkova V.V.[1], Sermyagin A.A.[1], Deniskova T.E.[1], Konovalova E.N.[1], Filipchenko A.A.[1], Ternovskaya O.A.[2], Zinovieva N.A. [1]

[1] Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Research Institute of Animal Husbandry Named After Academician LK Ernst», Podolsk, Dubrovitzy sett. (Russia), 142132, Moscow region, Podolsk, Dubrovitzy sett., 60
e-mail: elenagladyr@mail.ru
[2] Federal State Budget Education Organization « Russian State Agrarian University - Timiryazev Agricultural Academy», 127550 Moscow, Timiryazevskaya st., 49

We created a system for testing polymorphism in the SLC2A2 gene (rs379675307), associated with FH2 haplotype of fertility in Simmental cattle. The frequency of latent FH2- carriers was 2.78%.

Key words: cattle, SLC2A2, FH2 haplotype, Simmental breed, polymorphism

Using a limited number of sires in popular cattle breeds and reducing the effective population size lead to an increase in homozygosity and phenotypic manifestation of recessive genetic defects, or so-called LoF-mutations (Jansen et al., 2013; Daetwyler et al., 2014; Romanenkova, 2015, 2016; Zinovieva N.A., 2015, 2016). Nowadays several genetic defects, with the status of «haplotypes» - FH1, FH2, FH3, FH4, FH5, were detected in Simmental

cattle. Identification of the genomic region on BTA1 and mutation, leading to dwarfism, «Simmental haplotype 2, FH2» (2010), showed identical manifestation with Fanconi-Bickel Syndrome (FBS), which is a hereditary disease with autosomal recessive inheritance type, found in humans and several other animals. In Simmental cattle FBS manifested by mutations in the SLC2A2 gene (rs379675307), encoding GLUT2 (Pausch H. Et al., 2015), which is responsible for glucose transport, and is found in Austrian Simmental population with an average rate of 4%. The developed analytic system is based on PCR amplification the SLC2A2 gene fragment, containing the studied mutation, with following hydrolysis of the resulting fragments by the AgsI endonuclease. An assessment of 108 animals from 7 nucleus breeding organizations, including 60 cows and 48 bulls, revealed 3 hidden FH2-carriers among the bulls, which corresponds to the frequencies, respectively, 0 and 6.25% with the average population value of 2.78%. In addition, the causal mutation, described as FH2 haplotype, may occur in the homozygous state, and may quite freely distribute in the heterozygous state by means of artificial insemination of cows with sperm of bulls -carriers. We consider it is appropriate to use created system for the mass screening of pedigree Simmental cattle in the Russian Federation to control the spread and to prevent occurrence of homozygous FH2- carriers.

References:
1. Jansen S, Aigner B, Pausch H, Wysocki M, Eck S, Benet-Pagès A, Graf E, Wieland T, Strom TM, Meitinger T, Fries R. Assessment of the genomic variation in a cattle population by re-sequencing of key animals at low to medium coverage. BMC Genomics, 2013, 14: 446.
2. Daetwyler H.D., Capitan A., Pausch H., Stothard P., van Binsbergen R., Brøndum R.F., Liao X., Djari A., Rodriguez S.C., Grohs C., Esquerré D., bouchez O., Rossignol M.-N., Klopp C., Richa D., Fritz S., Eggen A., Bowman P.J., Coote D., Chamberlain A.J., Anderson C., Van Tassell C.P., Hulsegge I., Goddard M.E., Guldbrandtsen B., Lund M.S., Veerkamp R.F., Boichard D.A., Fries R., Hayes B.J. Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. Nature Genet., 2014, 46: 858–865.
3. Romanenkova O.V., Gladyr E.A., Kostyunina O.V., Zinovieva N.A. Development of test system for the diagnosis of the HH3 fertility haplotype associated with early embryonic mortality in cattle // Achievements of Science and Technology of AIC. — 2015. — №11. — C. 91—94.
4. Romanenkova O.V., Gladyr E.A., Kostyunina O.V., Zinovieva N.A. Screening Russian cattle population to detect mutation in the APAF1, associated with the HH1 fertility haplotype // Achievements of Science and Technology of AIC. — 2016. — T. 30. — №2. — C. 94—97.
5. Zinovieva N.A., Strekozov N.I., Eskin G.V., Turbina I.S., Yanchukov I.N., Ermilov A.N. Monogenic hereditary defects and their role in reproduction // Livestock of Russia. — 2015. — №6. — C. 30—32.
6. Zinovieva N.A. Fertility haplotypes of Holstein cattle //
Agricultural biology. 2016. T. 51. № 4. C. 423-435.
7. Pausch H., Schwarzenbacher H., Burgstaller J.,Flisikowski K., Wurmser C., Jansen S., Jung S., Schnieke A., Wittek T., Fries KЮ Homozygous haplotype deficiency reveals deleterious mutations compromising reproductive and rearing success in cattle// BMC Genomics. 2015. 16:312.

УДК 636.22/.28.084.1+636.22/.28.087.69

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИЧИНОК МУХИ ЧЕРНАЯ ЛЬВИНКА HERMETIA ILLUCENS, В РОЛИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ КРУПНОРОГАТОГО СКОТА

Антонов А.М, Пастухова Н.О.

Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск, Россия
163009, Архангельск, Наб. Северной Двины, д. 17.
e-mail: a.antonov@nafru.ru

В лабораторных условиях на базе малого инновационного предприятия были выращены личинки мухи черная львинка, которые использовались как кормовая добавка к суточному рациону телят. В результате эксперимента на достоверном уровне значимости были получены данные подтверждающие положительный эффект сушеной личинки как эффективной кормовой добавки.

Ключевые слова: черная львинка; Hermetia illucens; кормовая добавка, прирост по массе, сельское хозяйство.

Биотехнологии в последнее время приобретают большие масштабы, как перспективные направления науки, изучающие возможности использования живых организмов, систем или продуктов их жизнедеятельности для решения технологических и сельскохозяйственных задач. В качестве объекта исследования выступает американский вид мухи – Чёрная львинка (Hermetia illucens) Исследуемый вид полностью

может удовлетворить все потребности, предъявленные к кормам и кормовым добавкам, для животных и птицы. Личинки мухи отличаются высокой питательностью и накоплением в организме комплекса микро- и макроэлементов, процентное содержание которых зависит от диеты питания.

Цель исследований. Изучить эффективность использования сушеной личинки мухи черная львинка в кормление недельных телят.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили на базе сельскохозяйственного предприятия ОАО «Важское» Архангельская область. Объектом исследования служили 39 голов телят недельного возраста.

Для определения эффективности влияния сушеных личинок мухи в чистом виде, животные были разделены на 2 группы: опытную (23 головы) и контрольную (16 голов). Суточная норма внесения сушеной измельченной личинки, как кормовой добавки составляла 7 гр/сут.

Результаты исследований. Эффективность влияния личинки мухи Черная львинка в качестве кормовой добавки на физическое состояние телят, проводили путем расчёта статистических показателей массы и прироста по массе каждого отдельно взвешенного животного по завершении периода кормления и при завершении самого опыта (таблица 1) .

Таблица 1 Статистические показатели массы и прироста по массе КРС

Вид кормовой добавки/ Статистические показатели	Прирост по массе за период кормления, кг М2-М1	Прирост по массе за период опыта М3-М1	Прирост в день на 1 голову за период кормления, кг	Прирост в день на 1 голову за период опыта, кг
Личинка	32,78±1,78	78,65±2,74	0,89±0,05	0,76±0,03
Контроль	31,00±1,60	73,10±5,60	0,72±0,04	0,91±0,07

Согласно анализу среднестатистических данных следует, что прирост по массе телят при использовании личинок мухи вырос на 2% по сравнению с группой контроля. В связи с разной продолжительности периодов опыта и кормления целесообразно использовать показатель эффективности влияния личинки по приросту массы на один день опыта (в килограммах) на каждую голову КРС. Анализируя данные на период эксперимента можно отметить, что телята в опытной группе за сутки в среднем прибавляли 0,89±0,05 кг, а в контрольной группе - 0,72±0,04 кг. Достоверность различий значений доказана t=13.03, личинка прекрасно показала себя в роли кормовой добавки. Во второй части опыта Вскармливание КРС личинкой завершилось, в результате прирост по массе животных резко упал - 0,76±0,03 кг, в отличие от группы контроля- 0,91±0,07 кг. Различия полученных данных достоверны.

Выводы. Использование сушеной личинки мухи Черная львинка, в роли кормовой добавки способствует увеличению прироста телят и дает дополнительный прирост на одну голову КРС, в среднем на 170 грамм в сутки по сравнению с контролем. В результате дополнительный ежемесячный прирост по массе животных составляет 5кг и более, при использовании 210 грамма сушеных личинок на голову.

USE OF BLACK SOLDIER FLY (HERMETIA ILLUCENS) LARVAE AS A FOOD ADDITIVE FOR CATTLE

Antonov A.M., Pastukhova N.O.

Northern Arctic Federal University named after M.V.Lomonosov, Arkhangelsk, Russia
163002, Arkhangelsk, Severnaya Dvina Emb. 17
e-mail: a.antonov@nafru.ru

Having been grown on the base of small-scale innovative enterprise in a laboratory environment, black soldier fly's larvae were used as food additive to daily ration of calves. Experiment resulted in obtaining data of reliable significance level and that data proved a favourable effect from dried larvae as efficient food additive.

Key words: black soldier fly; Hermetia illucens; food additive; volume increment; agriculture.

Recently, biotechnologies have spread out to a big scale as the perspective science trends researching opportunities to use life forms, systems, their waste products to solve technological and agriculture problems. Black soldier fly (Hermetia illucens) was used as a research subject. The researched species can satisfy all the requirements lodged to forage and food additive, for livestock and poultry. Fly's larvae are remarkable for its high nutritiousness and accumulation of micro- and macroelements, whose percentage depends on feeding diet, in an organism.

Research objective: to study efficiency of dried black soldier fly's larvae in week-old calves's food.

Materials and methods of the study. Researches were conducted on the basis of agriculture enterprise OJSC "Vazhskoe", Arkhangelsk region. Research subjects were 39 calves of 1 week-old.

To determine unalloyed dried fly's larvae influence efficiency calves were divided into two groups: test group (23 heads) and check group (16 heads). Daily rate of dried grinded larvae as food additive was 7 g per day.

Experiment results. efficiency of Black soldier fly's larvae influence (as food additive) on calves physical conditions was measured by calculating statistical indicators of volume and volume increment for every separately weighed animal after feeding period and experiment were finished. (Table 1)

Table 1 Statistical indicators of volume and volume increment by mass of cattle

Food additive type/ Statistical indicators	volume increment by mass during feeding period, kg M2-M1	volume increment by mass during the experiment period, kg M3-M1	Daily increment per 1 head during feeding period, kg	Daily increment per 1 head during the experiment period, kg
larvae	32.78±1.78	78.65±2.74	0.89±0.05	0.76±0.03
check	31.00±1.60	73.10±5.60	0.72±0.04	0.91±0.07

According to analysis of average statistical data, after fly's larvae was used, calves volume increment by mass increased by 2% in comparison with check group. Since the experiment period and feeding period were different in duration it was reasonable to use larvae's influence efficiency index by mass per one experiment day (in kilograms) per every head of cattle. Analysing data for the experiment period it can be noticed that calves in test group put on 0.89±0.05 kg and in check group this value was 0.72±0.04 kg on average per day. Reliability of values differences was proved as t=13.03, larvae proved its worth in capacity of food additive. During the second part of the experiment feeding the cattle with larvae was finished so as a result animal volume increment by mass dropped by 0.76±0.03 kg, as for check group this value was 0.91±0.07 kg. Differences of data obtained are reliable.

Conclusions. Use of black soldier fly's larvae in capacity of food additive leads to volume increment of calves and provides additional increment per one head of cattle at the rate about 170 g on average per day In comparison with check group. As a result, extra month increment by animal mass is 5 kg and more while using 210 g of dried larvae per a head.

СЕКЦИЯ

БИОТЕХНОЛОГИЯ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

SECTION

BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURAL PRODUCTION

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК: 631.523, ББК: 41/42

АМИЛОИДЫ И ПРИОНЫ: ЗНАЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

А.А.Нижников[1], К.С.Антонец[2]

[1]ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Российская Федерация, 199608, Санкт-Петербург, Подбельского ш., 3, ant.nizhnikov@gmail.com, 89214435039
[2]ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Российская Федерация, 199608, Санкт-Петербург, Подбельского ш., 3, kirantonez@gmail.com, 89214204297

Амилоидами называют белковые фибриллы, обладающие кросс-бета структурой. На протяжении длительного времени амилоиды считались патогенами, вызывающими ряд неизлечимых заболеваний, вместе с тем, в последнее время был накоплен большой массив данных, показывающих, что амилоиды могут выполнять различные биологические функции. Наиболее крупной и значимой группой организмов, у которых до настоящего времени не были идентифицированы амилоиды, являются растения. Проведенные нами исследования показывают, что запасные белки растений содержат значительное количество амилоидогенных участков, что свидетельствует в пользу в пользу возможного участия амилоидогенеза в молекулярных механизмах хранения белка в семенах.

Ключевые слова: Амилоид, запасной белок, кросс-бета структура, растения, амилоидогенный участок

Амилоидами называют белковые фибриллы, обладающие особой пространственной структурой, называемой «кросс-бета», которая возникает вследствие того, что мономеры в составе фибрилл формируют межмолекулярные бета слои, расположенные перпендикулярно оси фибриллы и стабилизированные многочисленными водородными связями. Такая структура придает амилоидам уникальную стабильность и устойчивость к действию повышенных температур, детергентов и денатурирующих агентов, протеаз. Некоторые амилоиды на протяжении длительных периодов времени могут находиться во внешней среде [1], не меняя свои свойства, а некоторые, называемые прионами, обладают инфекционностью [2]. На протяжении длительного времени амилоиды считались патогенами, вызывающими ряд неизлечимых заболеваний, называемых амилоидозами, у человека и животных. Вместе с тем, в последнее время был накоплен большой массив данных, показывающих, что амилоиды могут выполнять различные биологические функции. Такие амилоиды, получившие название функциональных, обнаружены у различных организмов, от прокариот до человека. Спектр их функций включает в себя формирование биопленок и запасание токсинов у прокариот, повышение устойчивости к действию различных химических агентов у грибов, а также регуляцию долговременной памяти, программированного некроза, полимеризации меланина,

биоминерализации зубной эмали и запасания гормонов у животных [3]. Исследования в области инфекционных и неинфекционных патологических амилоидов животных, а также амилоидов, контролирующих формирование биопленок у микроорганизмов, обладают высокой значимостью для сельского хозяйства и биотехнологии.

Наиболее крупной и значимой группой организмов, у которых амилоидные свойства invivo и без сверхпродукции не были показаны ни для одного белка, являются растения. Биоинформатический анализ, проведенный нами в протеомах ряда видов модельных и хозяйственно значимых растений, показал, что наиболее сильное накопление участков, склонных к формированию амилоидов, у растений происходит в запасных белках. Это свидетельствует в пользу того, что хранение белка в семенах растений может происходить в форме амилоидов. Одной из актуальных задач современной биотехнологии является повышение доли незаменимых аминокислот в запасных белках. Вместе с тем, именно незаменимые аминокислоты, а, прежде всего, содержащие ароматические (фенилаланин, триптофан) и алифатические (изолейцин, лейцин, валин) радикалы обладают наиболее высоким амилоидогенным потенциалом [4]. Таким образом, повышение доли незаменимых аминокислот в запасных белках может вызывать формирование амилоидов (амилоидогенез), что, в свою очередь, может влиять на пищевое качество белков.

1. Запасные белки растений содержат значительное количество участков, склонных к амилоидогенезу. 2. Увеличение доли незаменимых аминокислот может провоцировать амилоидогенез у соответствующих белков.

Литература. 1. Wiggins R.C. Prion stability and infectivity in the environment. // Neurochem. Res. 2009. V. 34(1). P. 158-68. 2. Prusiner S.B. Biology and Genetics of Prions Causing Neurodegeneration. // Annual Review of Genetics. 2013. V. 47. P. 601-623. 3. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G. Amyloids: from Pathogenesis to Function. // Biochemistry (Mosc.), 2015. V. 80(9). P. 1127-44. 4. Ahmed A.B., Kajava A.V. Breaking the amyloidogenicity code: methods to predict amyloids from amino acid sequence. // FEBS Lett. 2013. V. 587(8). P. 1089-95.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке грантов Президента РФ МК-3240.2017.4, РФФИ 16-34-60153 и Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга.

AMYLOIDS AND PRIONS: SIGNIFICANCE AND PROSPECTS FOR AGRICULTURE

A.Nizhnikov[1], K.Antonets[2]

[1]All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Russian Federation, 196608, St. Petersburg, Podbelskogo sh., 3
[2]All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Russian Federation, 196608, St. Petersburg, Podbelskogo sh., 3

Amyloids are protein fibrils that have cross-beta structure. For a long time amyloids were considered as pathogens, causing a number of incurable diseases; at the same time, large number of recent studies demonstrated that amyloids may have different biological functions. The largest and most important group of organisms, in which amyloids are still no identified, is plants. Our studies show that plant storage proteins contain numerous amyloidogenic regions therefore amyloidogenesis may be involved in the molecular mechanisms of protein storage in seeds.

Key words: Amyloid, storage protein, cross-beta structure, plants, amyloidogenic region

Amyloids are protein fibrils that share common spatial structure called «cross beta», which occurs due to formation of intermolecular beta sheets located perpendicularly to the axis of the fibril and stabilized by numerous hydrogen bonds. This structure makes amyloids to have unique stability and resistance to high temperatures, detergents, and denaturants or proteases. Some amyloids are able to persist in external environment for a long time [1] without changing their properties, and some of them, called prions, are infectious [2]. From the very beginning, amyloids have been mainly considered pathogens causing a number of incurable diseases in humans and animals - amyloidoses. However, large number of recent studies demonstrated that amyloids may have different biological functions. Such amyloids, known as functional, have been found in various organisms, from prokaryotes to humans. The spectrum of their functions includes biofilm formation and storage of toxins in prokaryotes, increasing of resistance to various chemical agents in fungi, as well as the regulation of long-term memory, programmed necrosis, melanin polymerization, enamel biomineralization, and storing hormones in animals [3]. The studies in the field of pathological amyloids in animals, as well as amyloids controlling biofilm formation in microorganisms, are of high importance to agriculture and biotechnology.

The largest and most important group of organisms, in which no proteins have been shown to have amyloid properties in vivo and without overexpression, are plants. We carried out a bioinformatic analysis in the proteomes of different model and economically significant plant species. The results of this analysis showed seed storage proteins demonstrate statistically significant accumulation of amyloidogenic regions. This suggests that protein storage mechanisms in plant seeds may involve amyloid formation. One of the urgent goals of contemporary biotechnology is to increase the portion of essential amino acids in seed storage proteins. However, essential amino acids, and especially containing aromatic (phenylalanine, tryptophan) as well as aliphatic (isoleucine, leucine, valine) radicals have the highest amyloidogenic potential [4]. Thus, an increase in the portion of essential amino acids in storage proteins may cause the formation of amyloids affecting the food quality.

1. Plant storage proteins contain a significant number of amyloid-prone regions. 2. An increase in the proportion of essential amino acids can provoke amyloidogenesis of the corresponding proteins.

References: 1. Wiggins R.C. Prion stability and infectivity in the environment. // Neurochem. Res. 2009. V. 34(1). P. 158-68. 2. Prusiner S.B. Biology and Genetics of Prions Causing Neurodegeneration. // Annual Review of Genetics. 2013. V. 47. P. 601-623. 3. Nizhnikov A.A., Antonets K.S., Inge-Vechtomov S.G. Amyloids: from Pathogenesis to Function. // Biochemistry (Mosc.), 2015. V. 80(9). P. 1127-44. 4. Ahmed A.B., Kajava A.V. Breaking the amyloidogenicity code: methods to predict amyloids from amino acid sequence. // FEBS Lett. 2013. V. 587(8). P. 1089-95.

Grant: This work was supported by grants of the President of the Russian Federation MK-3240.2017.4, RFBR 16-34-60153, and the Committee on Science and Higher Education, Government of St. Petersburg.

УДК 579.64+581.1

РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ IN VITRO: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ К АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯМ

Матора Л.Ю., Ткаченко О.В.*, Евсеева Н.В., Бурыгин Г.Л., Щеголев С.Ю.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия; *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», Саратов, Россия*
410049, Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13.
e-mail: shegolev_s@ibppm.ru

Обсуждаются результаты работ по созданию искусственных растительно-микробных ассоциаций in vitro как средства получения высококачественного посадочного материала культурных растений, сохранения редких видов растений и т.п.

Ключевые слова: клональное микроразмножение растений, почвенные бактерии, Azospirillum, инокуляция in vitro, приживаемость ex vitro

Среди разнообразных типов растительно-микробных взаимодействий, активно используемых в агробиотехнологиях, хорошую перспективу для развития ряда современных технологий растениеводства имеют ассоциации микроорганизмов с растениями, искусственно создаваемые in vitro. Речь идет об усовершенствовании методов клонального микроразмножения как средства получения высококачественного посадочного материала культурных растений, сохранения редких видов растений, представляющих интерес как источник ценных биологически активных соединений, и т.п. При этом используется инокуляция микрорастений на стадии культуры in vitro бактериями категории PGPR (стимулирующие рост растений ризобактерии) [1]. К этой категории относится разнообразие видов почвенных бактерий, участвующих во взаимовыгодных ассоциативных взимоотношениях с растениями, стимулирующих их развитие, защиту от патогенов и т.д. В том числе свободноживущие бактерии рода Azospirillum [2], чьи коллекционные штаммы использованы нами для оценки эффектов инокуляции при клональном микроразмножении растений картофеля (Solanum tuberosum L.) [3] и смолевки меловой (Silene cretacea Fisch. ex Spreng) [4] – редкого вида, занесенного в Красную книгу Российской Федерации, источника фитоэкдистероидов, обладающих целым рядом полезных физиологических активностей. Полученные результаты показали [3], что бактеризация in vitro мериклонов картофеля приводила к улучшению физиологических и ростовых показателей выращиваемых растений, увеличению в полтора раза их приживаемости в открытом грунте и, в конечном итоге, к прибавке урожая мини-клубней на 50% и выше. В случае смолевки меловой был установлен факт успешной колонизации азоспириллами мериклонов данных

растений in vitro, а также значительное усиление адаптации бактеризованных растений-регенерантов в условиях ex vitro – увеличение приживаемости с 20 до 90% [4]. Данный способ клонального микроразмножения можно использовать для массового получения посадочного материала S. cretacea с целью восстановления численности популяций, а также в селекционно-производственной практике при введении этого исчезающего вида в культуру. Нами оцениваются возможности использования в создаваемых растительно-микробных ассоциациях in vitro кроме коллекционных культур бактерий также природных изолятов непосредственно из ризосферы растений. С этой целью в случае картофеля был выделен активный бактериальный штамм, и на основании совокупности молекулярно-генетических и физиолого-биохимических тестов установлена его принадлежность к виду Ochrobactrum lupini.

Литература.
1. Parray J.A. Kamili A.N., Reshi Z.A., Qadri R.A., Sumira J. Interaction of rhizobacterial strains for growh improvement of Crocus sativus L. under tissue culture conditions // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2015. – Vol. 121, No. 2. – P. 325-334.
2. Pereg L., de-Bashan L.E., Bashan Y. Assessment of affinity and specificity of Azospirillum for plants // Plant Soil. – 2016. – Vol. 399, No. 1-2. – P. 389-414.
3. Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Lobachev Yu.V., Shchyogolev S.Yu. Improved potato microclonal reproduction with the plant growth-promoting rhizobacteria Azospirillum // Agron. Sustain. Dev. – 2015. – Vol. 35, No. 3. – 1167-1174.
4. Крицкая Т.А., Евсеева Н.В., Бурыгин Г.Л., Кашин А.С., Щеголев С.Ю. Использование Azospirillum brasilense Sp245 для повышения эффективности клонального микроразмножения смолевки меловой (Silene cretacea Fisch. ex Spreng.) // Биотехнология. – 2016 (в печати).

UDC 579.64+581.1

PLANT–MICROBIAL INTERACTIONS IN VITRO: FROM BASIC RESEARCH TO AGROBIOTECHNOLOGIES

L.Yu. Matora, O.V. Tkachenko*, N.V. Evseeva, G.L. Burygin, S.Yu. Shchyogolev

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia; *Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov, Russia*
13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049
e-mail: shegolev_s@ibppm.ru

This communication discusses the results of studies to develop artificial plant–microbe associations in vitro as a means to produce high-quality planting material of cultivated plants, preserve rare plant species, etc.

Key words: plant microclonal propagation, soil bacteria, Azospirillum, inoculation in vitro, survivability ex vitro

Among the diverse types of plant–microbe interactions used actively in agrobiotechnologies, plant–microbe associations created artificially in vitro have shown good promise in the development of a number of state-of-the-art plant breeding technologies. The case in point is the improvement of microclonal propagation methods as a means to produce high-quality planting material of cultivated plants, preserve rare plant species that are of interest as a source of valuable biologically active compounds, etc. This improvement is achieved by use of inoculation of in vitro growing micropropagated plants with plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) [1]. This group of bacteria includes diverse soil species that are involved in the mutually beneficial associative relationships with plants, promoting plant development, defense against pathogens, etc. Specifically, it includes the free-living bacteria of the genus Azospirillum [2], and collection strains of Azospirillum were used by us to evaluate the effects of inoculation during the microclonal propagation of potato (Solanum tuberosum L.) [3] and cretaceous catchfly (Silene cretacea Fisch. ex Spreng) [4] – a rare species that is listed in the Russian Federation's Red Book and is a source of phytoecdysteroids, which display a range of useful physiological activities. The obtained results show [3] that inoculation in vitro of potato mericlones improves the physiology and growth of plants, increases their survivability in the field 1.5-fold, and ultimately improves minituber yield by 50% or even more. For cretaceous catchfly, it was shown that Azospirillum successfully colonizes its mericlones in vitro and that the inoculated regenerant plants are able to adapt much better ex vitro (their survivability increases from 20 до 90%) [4]. This technique of microclonal propagation can be used for the large-scale production of S. cretacea planting material to restore population numbers, as well as in selection and breeding when this endangered species is brought under cultivation. We are examining the possibility of using bacteria isolated directly from the plant rhizosphere,

in addition to collection cultures, in the plant–microbe associations being developed in vitro. To this end, an active bacterial strain was isolated for work with potato and was found to belong to the species Ochrobactrum lupini on the basis of several molecular genetic and physiological–biochemical tests.

References:
1. Parray J.A. Kamili A.N., Reshi Z.A., Qadri R.A., Sumira J. Interaction of rhizobacterial strains for growh improvement of Crocus sativus L. under tissue culture conditions // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2015. – Vol. 121, No. 2. – P. 325-334.
2. Pereg L., de-Bashan L.E., Bashan Y. Assessment of affinity and specificity of Azospirillum for plants // Plant Soil. – 2016. – Vol. 399, No. 1-2. – P. 389-414.
3. Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Lobachev Yu.V., Shchyogolev S.Yu. Improved potato microclonal reproduction with the plant growth-promoting rhizobacteria Azospirillum // Agron. Sustain. Dev. – 2015. – Vol. 35, No. 3. – 1167-1174.
4. Kritskaya T.A., Evseeva N.V., Burygin G.L., Kashin A.S., Shchyogolev S.Yu. Use of Azospirillum brasilense Sp245 to increase the efficacy of microclonal propagation of cretaceous catchfly (Silene cretacea Fisch. ex Spreng.) // Biotekhnologiya. – 2016 (in Russian) (in press).

УДК 631.52

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЕМЯН БЕЗ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ И ВОЗМОЖНОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ НА КУКУРУЗЕ

Чумаков М.И.,[1],* Моисеева Е.М.[1], Гусев Ю.С.[1], Гуторова О.В. [2], Апанасова Н.В.[2], Юдакова О.И. [2], Волохина И.В.[1]

[1] Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13,
** e-mail: chumakovmi@gmail.com;*
[2] Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,
410012, Саратов, ул. Московская 155, корп.5

Впервые проведено изучение экспрессии генов слияния гамет у гаплоиндуцирующей линии кукурузы и экспрессии генов метилирования ДНК у партеногенетической линии кукурузы. Обсуждаются подходы и перспективы разработки технологии получения семян кукурузы без оплодотворения.

Ключевые слова: партеногенез, гаплоиндукция, кукуруза, экспрессия генов слияния гамет, метилирование ДНК

Покрытосеменные растения размножаются половым и апомиктичным (семенами, полученными без опыления) путем. Однако, апомиксис, как правило, характерен для дикорастущих и не наблюдается у культурных форм растений, поскольку селекция культурных растений длительное время проводилась человеком путем гибридизации и последующего отбора (т.е. путем полового размножения). Перевод на этот тип размножения ведущих сельскохозяйственных культур может стать революционной биотехнологией для растений. Для изучения молекулярно-генетического механизма переключения полового и апомиктичного способов размножения у кукурузы впервые проведен анализ экспрессии некоторых генов, вовлеченных в процесс слияния гамет и ранние этапы эмбриогенеза. В докладе впервые представлены данные по экспрессии генов ZMhap2/gcs1, ZMgex2, контролирующих этап слияния мембран спермия и яйцеклетки, в генеративных и вегетативных тканях гаплоиндуцирующей линии кукурузы и данные по экспрессии ряда генов метилирования ДНК в генеративных тканях партеногенетической линии кукурузы. Установлена спермий-специфичная экспрессия гена ZMgex2 кукурузы, исследованы нуклеотидные последовательности генов слияния гамет (ZMhap2/gcs1, ZMgex2) и обнаружены однонуклеотидные замены в гене ZMgex2 гаплоиндуцирующей линии ЗМС-П кукурузы (см. Волохина с соавт., 2017).

Впервые представлены экспериментальные данные об экспрессии генов метилирования ДНК (dmt102, dmt103, hdt104, hon101, chr106) в пыльце, семязачатках, зародышевых мешках, проэмбрио, зародышах и листьях контрольной и партеногенетической линий кукурузы. Установлено, что при экспериментальной задержке опыления на 3-15 дней у партеногенетической линии кукурузы АТ-3 в определенном проценте зародышевых мешков (исследовано более 3000 шт.) наблюдается спонтанное развитие партеногенетического проэмбрио из яйцеклеток. Впервые будут представлены данные по экспрессии генов метилирования ДНК (dmt103, hdt104, hon101, chr106) при экспериментальной задержке опыления на 3-7 дней в семязачатках партеногенетической и контрольной линий кукурузы. Обсуждаются подходы изменения

экспрессии генов, участвующих в ранних этапах эмбриогенеза кукурузы с помощью технологий антисмысловых РНК и редактирования генома.

Работа частично поддержана грантом РФФИ 15-04-08413.

Литература.
1. Волохина И.В., Моисеева Е.М., Гусев Ю.С., Гуторова О.В., Чумаков М.И. Анализ генов слияния гамет у гаплоиндуцирующей линии кукурузы // Онтогенез. - 2017. - №2 (в печати).

BIOTECHNOLOGY FOR FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED REPRODUCTION: FUNDAMENTAL ASPECTS OF ITS APPLICATION TO CORN

Chumakov M.I.,[1],* Moiseeva Ye.A.[1], Gusev Yu.S.[1], Apanasova N.V.[2], Gutorova O.V.[2], Yudakova O.I., Volokhina I.V.[1]

[1] Bioengineering Laboratory, Inst. Bioch. & Physiol. Plants & Microorg., Russ. Acad. Sci., 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia;
** chumakovmi@gmail.com;*
[2] Saratov State University, 155 Moskovskaya St., Saratov 410012, Russia

The expression of gamete-fusion genes in a haploid-inducing maize line and of DNA methylation genes in a parthenogenetic maize line was evaluated for the first time. The development of a fertilization-independent seed technology will be discussed.

Key words: parthenogenesis, haploid induction, maize, gene expression, gamete fusion, DNA methylation

Angiosperms reproduce both sexually and asexually (apomictic reproduction). Study of the genetic mechanism regulating plant reproduction by seed without fertilization and the application of this knowledge to agricultural crops are a major trend in basic embryogenetics and an innovative technology for agriculture. Apomixis is typical of wild plants but has not been observed in modern forms of agricultural crops. This is possibly because the selection of cultivated plants has been through hybridization and subsequent breeding (i.e., through sexual reproduction). However, the conversion (return) of agricultural plants to apomictic reproduction is desirable in biotechnology.

For the first time, we will present data on the sequence and expression of the ZM_hap2/gcs1 and Zm_gex2 maize gamete fusion genes in male and female tissues of a haploid-inducing maize line and also data on the expression of DNA methylation genes in female tissues of parthenogenetic maize lines. Sperm-specific expression of the ZM_gex2 maize gene was established. We investigated the nucleotide sequences of the Zm_hap2, Zm_gex2 maize gamete-fusion genes and identified SNP mutation in the ZM_gex2 gene in the ZMS-P haploid-inducing maize line (Volokhina et al., 2017).

Cytoembryological analysis of the embryo sacs isolated from AT-3 maize line showed that embryo- and endospermogenesis occurred in a part of embryo sacs for 3–15 days without pollination. Experimental data on the expression dynamics of DNA methylation genes in the parthenogenetic (AT-3) and control maize lines will be presented for the first time. In particular, data will be reported concerning the dynamics of the methylation (dmt103, hdt104, hon101, chr106) gene expression at three developmental stages [sporogenesis, mature embryo sac before fertilization, and early embryogenesis (three days after fertilization)] of the AT-3 maize line.

The development of a fertilization-independent seed reproduction using antisense RNA and genome editing technology will be discussed.

The work was supported in part by the Russian Foundation for Basic Research (15-04-08413).

References:
1. Volokhina I.V., Moiseeva Ye.M., Gusev Yu.S., Gutorova O.V., Chumakov M.I. Analyzing of the gamete-fusion genes in the haplo-inducing ZMS-P maize line // Rus. J. Develop. Biol. 2017. Vol. 2 (in press).

УДК: 575.222.72:635.658

RAPD-АНАЛИЗ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ЧЕЧЕВИЦЫ

Суворова Г.Н.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур», Орел, Россия
302502 г. Орел, п/о Стрелецкое, ул. Молодежная, кор. 1
e-mail: galina@vniizbk.ru

Выявлены видоспецифичные RAPD праймеры для генотипирования генетических ресурсов рода Lens. Подобраны праймеры для идентификации гибридов Lens culinaris × L. orientalis и L. culinaris × L. tomentosus.

Ключевые слова: чечевица, L. orientalis, L. tomentosus, межвидовые гибриды, RAPD, праймер

Чечевица Lens culinaris Medik. ценная бобовая культура, мировое производство которой ежегодно растет, тогда как в современной России ее возделывают в незначительных объемах. Недостатками культуры являются низкий потенциал продуктивности, неспособность противостоять сорным растениям, слабая отзывчивость на приемы интенсификации. Возделываемые сорта чечевицы характеризуются низким полиморфизмом, поэтому источником генетической изменчивости может быть гибридизация с дикорастущими родичами.

Были проведены скрещивания культурной чечевицы L. culinaris с таксонами L. orientalis (Boiss) Hand.-Mazz. (по современным представлениям L. culinaris ssp. orientalis) и L. tomentosus Ladizinsky. С использованием методов культуры семян или семяпочек in vitro получены межвидовые гибриды, а также созданы селекционные линии и новые сорта Восточная и Чернава.

В процессе гибридизации и селекционной работы возникла необходимость идентификации межвидовых гибридов а также отслеживания генетического материала диких видов в геноме культурной чечевицы, для чего помимо морфологических критериев успешно использовался RAPD анализ, основанный на полимеразной цепной реакции.

Выявлены видоспецифичные RAPD праймеры OPW2, OPF4, CS4, OPF14, OPA11, OPA12, CS31 и CS33 для генотипирования генетических ресурсов рода Lens. Для идентификации гибридов L. culinaris × L. orientalis рекомендованы праймеры OPW2 и CS33, для гибридов L. culinaris × L. tomentosus – праймеры OPF4 и CS4.

С использованием праймера CS33 показана интрогрессия генетического материала дикорастущего образца Lens orientalis ILWL 7 в геном новых сортов чечевицы Восточная и Чернава.

RAPD ANALYSIS FOR IDENTIFICATION OF INTERSPECIFIC HYBRIDS OF LENTYL

Suvorova G.N.

The All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, p/b Streletskoye, Orel, Russia
302502 Orel, p/b Streletskoye, Molodeznaya str., 1
e-mail: galina@vniizbk.ru

Specific RAPD primers suitable for genotyping of the genus Lens were detected.
In order to identify the hybrids Lens culinaris × L. orientalis and L. culinaris × L. tomentosus the appropriate primers have been recommended.

Key words: lentil, L. orientalis, L. tomentosus, interspecific hybrids, RAPD, primer

Lentil Lens culinaris Medik. is a valuable legume crop, its production in the world has increased annually, whereas in the Russian Federation it has been cultivated only on a small scale. The low yield, the inability to compete with weeds, the weak response to intensive agriculture are the main drawbacks of the crop. The cultivated lentil varieties are characterized by low level of polymorphism, so the hybridization with the wild relatives could be a source of genetic diversity.

The cultivated lentil L. culinaris was crossed with the wild taxa L. orientalis (Boiss) Hand.-Mazz. (according to the modern classification L. culinaris ssp. orientalis) and L. tomentosus Ladizinsky. The interspecific hybrids and breeding lines as well as the new varieties Vostocnaya and Chernava have been created with use of seed or ovule cultures in vitro.

In the processes of hybridization and selection the problem of identification of interspecific hybrids as well as tracking of genetic material of wild species in the genome of cultivated lentil has been arisen, for that the PCR based RAPD analysis was applied besides morphological characters.

Specific RAPD primers OPW2, OPF4, CS4, OPF14, OPA11, OPA12, CS31 and CS33 suitable for genotyping of the genus Lens were detected. In order to identify the hybrids L. culinaris × L. orientalis the primers OPW2 and CS33 have been recommended, and the primers OPF4 and CS4 were taken for the L. culinaris × L. tomentosus hybrids.

Introgression of the genetic material of wild accession Lens orientalis ILWL 7 into genome of the new varieties Vostocnaya and Chernava was demonstrated with the use of primer CS33.

УДК 633.49:632/3:631.522/.524:577.2

ГЕНЫ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К Y ВИРУСУ КАРТОФЕЛЯ У ДИКОРАСТУЩИХ СОРОДИЧЕЙ КАРТОФЕЛЯ.

М.П. Бекетова[1], Е.В. Рогозина[2], Н.А. Чалая[2], Е.Н. Юркина[2], Э.Е. Хавкин[1].

[1]ФБГНУ Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия, 127550, ул. Тимирязевская, 42;
[2]ФБГНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), С. Петербург
e-mail: m.beketova@gmail.com

Ключевые слова: Solanum, вирус Y, гены Ry

Создание сортов картофеля, устойчивых к Y вирусу картофеля (YBK), основано на интрогрессии генетического материала сородичей картофеля Solanum andigenum, S. chacoense и S. stoloniferum, несуших гены устойчивости к этому вирусу. Гены экстремальной устойчивости к YBK (Ry) картированы, но не клонированы, и об их присутствии судят по результатам маркерного анализа (Рогозина и др., 2012; Valkonen, 2015). Успеху интрогрессивной селекции будет способствовать расширение наших знаний о присутствии функциональных Ry генов за пределами трех указанных видов Solanum. Мы верифицировали ранее опубликованные протоколы определения маркеров генов Ry_adg , Ry_chc и Ry_sto, используя сорта картофеля, на которых были валидированы эти маркеры. Результаты скрининга восьми видов Solanum были сопоставлены с устойчивостью растений, которую оценивали в ИФА тесте после заражения растений YBK. Присутствие двух маркеров Ry_sto в образцах S. stoloniferum было тесно связано с устойчивостью растений к YBK. Маркеры генов Ry_sto и Ry_adg не были видоспецифичными, однако за пределами S. stoloniferum и S. andigenum связь между присутствием маркеров и устойчивостью была менее очевидной.

UDC 633.49:632/3:631.522/.524:577.2

GENES FOR EXTREME RESISTANCE TO POTATO VIRUS Y IN WILD POTATO RELATIVES.

M.P. Beketova[1], E.V. Rogozina[2], N.A. Chalaya[2], E.N. Yurkina[2], E.E. Khavkin[1].

[1]Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia, 127550, Timiryazevskaya ul. 42;
[2]Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
e-mail: m.beketova@gmail.com

Key words: Solanum, virus Y, Ry genes

Breeding potato varieties resistant to potato virus Y (PVY) depends on the germplasm introgression from such potato relatives as Solanum andigenum, S. chacoense and S. stoloniferum comprising the genes for PVY resistance. The genes for extreme resistance to this virus (Ry) have been mapped, but not cloned, and their presence is recognized by the marker analysis (Rogozina et al., 2012; Valkonen, 2015). Deeper understanding of the presence of functional Ry genes outside the three Solanum species will considerably promote further introgression breeding for PVY resistance. We have verified previously published protocols for assessing markers of Ry_adg, Ry_chc and Ry_sto genes, using potato varieties that were employed to validate these markers. The results of screening eight Solanum species were compared with plant resistance evaluated with the ELISA test following plant infection with PVY. The presence of two Ry_sto markers in S. stoloniferum accessions was closely related to plant resistance to PVY. The markers Ry_sto and Ry_adg were not species-specific, and outside S. stoloniferum and S. andigenum the relationship between the presence of Ry marker and PVY resistance was less evident.

УДК 582.21.05

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ L-ЛИЗИН А-ОКСИДАЗА ГРИБА TRICHODERMA CF. AUREOVIRIDE RIFAI ВКМ F-4268D И РАЗВИТИЕ СИСТЕМНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Макрушин К.В.*, Меденцев А.Г.*, Лукашева Е.В., Аринбасарова А.Ю.***

**ФАНО ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, РАН, Пущино, Россия,*
*** ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия.*
e-mail: aarin@rambler.ru

Изучены свойства и физиолого-биохимические особенности синтеза L-лизин α-оксидазы грибом Trichoderma. Кинетические характеристики, высокая стабильность и антимикробная активность фермента, а также образование в качестве продуктов реакции пипеколиновой кислоты и H2O2 определяют роль фермента во взаимоотношениях “Trichoderma – растение – патоген”.

Ключевые слова: Trichoderma, L-лизин α-оксидаза, антимикробное действие, кинетические характеристики, протеолитическая активность, патогенез, H_2O_2.

Грибы рода Trichoderma, играющие важную роль в формировании микробиоценозов почвы, продуцируют множество метаболитов, включая литические ферменты, а также антибиотики различного химического строения. Известно также о способности грибов синтезировать оксидазы L-аминокислот, в том числе и L-лизин α-оксидазу (ЛизО) [1, 2].

В отличие от других продуцентов, у грибов Trichoderma фермент определен как внеклеточный. Этот факт подводит к закономерному вопросу о роли этого фермента для продуцента и делает необходимым изучение физиолого-биохимических особенностей его синтеза и свойств, определяющих участие продуцента в развитии системной устойчивости растений к патогенам и активацию основных метаболических процессов.

Впервые биосинтез ЛизО показали японские исследователи при твердофазном культивировании гриба T. viride Y 244 на пшеничных отрубях [1].

Мы обнаружили, что образование ЛизО T. cf. aureoviride Rifai ВКМ F-426 происходит при культивировании гриба также и на других злаковых культурах. При этом процесс биосинтеза сопряжен с накоплением в ферментационной среде протеолитических ферментов, различных аминокислот, а также продуктов ферментативного окислительного дезаминирования L-лизина: H2O2 и 2-кето-6-аминокапроата, который превращается в пипеколиновую кислоту. Перечисленные метаболиты играют центральные роли в индукции системной устойчивости растений к фитопатогенам [3]. Пипеколиновая кислота индуцирует синтез растительных гормонов – жасмоновой и салициловой кислот, ответственных за развитие устойчивости растения к некротрофам и биотрофам. H_2O_2 (и другие активные формы кислорода) является ключевым элементом в активации митоген-активируемых протеинкиназ, также участвующих в иммунном ответе растений при биотических и абиотических стрессах.

На тестовых микроорганизмах нами показано антимикробное действие ЛизО, которое проявлялось в аэробных условиях в присутствии лизина и тормозилось каталазой, что указывает на решающую роль H_2O_2 в механизме антимикробной защиты.

Фермент, очищенный до гомогенного состояния, показал высокую активность (90 Е/мг белка), высокую селективность и абсолютную стереоспецифичность, а также стабильность - при хранении, к действию протеаз, детергентов, мочевины и др. Изучение кинетических закономерностей ЛизО выявило положительную кооперативность 2-х субъединиц фермента (h = 2.05 ± 0.15) и высокое сродство к лизину (Км ≈ 10-5М) [4]. Полученные кинетические параметры также предопределяют физиологическую роль внеклеточной ЛизО как участие во взаимоотношениях “Trichoderma – растение – патоген”.

Литература.
1. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Soda K. Extracellular production L-lysine α-oxidase in wheat bran culture of a strain of Trichoderma viride // Agric. Biol. Chem. - 1979. - Vol. 43. № 12. - P. 2531-2535.
2. Makrushin K.V., Medentzev A.G., Arinbasarova A.Yu., Lukasheva E.V., Berezov T.T. Isolation, Purification and Some Properties of L-Lysine alpha-Oxidase from Trichoderma sp. 6, in: Varfolomeev S.D., Zaikov G.E., Krylova L.P. (Eds.), Biochemistry and Biotechnology: Research and Development, Nova Science Publishers, 2012, P. 7-16.
3. Bernsdorff F., Döring A.C., Gruner K., Schuck S., Bräutigam A., Zeier J. Pipecolic Acid Orchestrates Plant Systemic

Acquired Resistance and Defense Priming via Salicylic Acid-Dependent and -Independent Pathways // Plant Cell. - 2016. - Vol. 28. - P. 102-129.
4. Krupyanko V.I., Medentsev A.G., Lukasheva E.V., Arinbasarova A.Yu. Kinetic characteristics of L-lysine - oxidase from Trichoderma cf. aureoviride Rifai VKM F-4268D: substrate specificity and allosteric effects // BBRep. - 2017. - Vol. 9. - P. 9-12.

UDC 582.21.05

EXTRACELLULAR L-LYSINE A-OXIDASE FROM FUNGI TRICHODERMA CF. AUREOVIRIDE RIFAI VKM F-4268D AND THE DEVELOPMENT OF PLANT SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE

Makrushin K.V.*, Medentzev A.G.*, Lukasheva E.V., Arinbasarova A.Yu.***

**G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Russia.*
*** RUDN University, Moscow, Russia.*
e-mail: aarin@rambler.ru

The properties, physiological and biochemical features of the synthesis of L-lysine α-oxidase by the fungus Trichoderma were investigated. Kinetic characteristics, high stability and antimicrobial activity of the enzyme, as well as the formation of pipecolic acid and H_2O_2 as the reaction product may underlie physiological role of extracellular enzyme and its involvement in the relationships “Trichoderma – plant – pathogens”.

Key-words: Trichoderma, L-lysine α-oxidase, antimicrobial effect, kinetic characteristics, proteolytic activity, pathogenesis, H_2O_2.

Fungi of the genus Trichoderma, which play an important role in the formation of soil microbiocenosis, produce many metabolites, including lytic enzymes and antibiotics of different chemical structure. It is also known about the ability of fungi synthesize L-amino acid oxidase, including L-lysine α-oxidase (LysOx) [1, 2].

Unlike the enzymes from other producers, LysOx from fungi Trichoderma was determined to be extracellular. This fact leads to a logical question about the role of this enzyme for producer and make it necessary to study the physiological and biochemical peculiarities of its synthesis and properties defining the involvement of the producer in the development of plant systemic acquired resistance to pathogens and the activation of basic metabolic processes.

For the first time LysOx synthesis was shown by Japanese researchers during solid-phase cultivation of the fungus T. viride Y244 on wheat bran [1].

We have also found the formation of LysOx by Trichoderma cf. aureoviride Rifai VKM F-426 for the fungus cultivation on wheat or many other cereals. Herewith, biosynthesis process is associated with the accumulation in the fermentation medium of proteolytic enzymes, various amino acids, and the products of enzymatic oxidative deamination of L-lysine: H_2O_2 and 2-keto-6-amino caproate, which transforms into pipecolic acid. These metabolites play a major role in the induction and development of systemic plant resistance to phytopathogens [3]. Pipecolic acid induces the synthesis of plant hormones - jasmonic and salicylic acids, responsible for plant resistance to the necrotrophic and biotrophic microorganisms. H_2O_2 (or the other reactive oxygen species) is a key element in the activation of mitogen-activated proteases involved in the immune response of plants under biotic or abiotic stress also.

Using the test microorganisms antimicrobial effect of LysOx was demonstrated, which took place only under aerobic conditions in the presence of L-lysine, and being inhibited by catalase, indicating a critical role of H_2O_2 in the mechanism of antimicrobial defense.

The enzyme purified to homogeneity was shown to reveal high specific activity (equal to 90 U/mg of protein), high selectivity and absolute L-stereospecificity, stability (during storage, to the action of proteases, detergents, urea, etc.). The study of the kinetic peculiarities of LysOx has revealed positive cooperativity ($h = 2.05 \pm 0.15$) of two enzyme subunits and a high strength of substrate binding to the active site of each subunit ($Km \approx 10\text{-}5M$) [4]. The kinetic parameters above also determine the physiological role of the extracellular LysOx as participation in the relationships «Trichoderma - plant - pathogen».

References:
1. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Soda K. Extracellular production L-lysine α-oxidase in wheat bran culture of a strain of Trichoderma viride // Agric. Biol. Chem. - 1979. - Vol. 43. № 12. - P. 2531-2535.

2. Makrushin K.V., Medentzev A.G., Arinbasarova A.Yu., Lukasheva E.V., Berezov T.T. Isolation, Purification and Some Properties of L-Lysine alpha-Oxidase from Trichoderma sp. 6, in: Varfolomeev S.D., Zaikov G.E., Krylova L.P. (Eds.), Biochemistry and Biotechnology: Research and Development, Nova Science Publishers, 2012, P. 7-16.
3. Bernsdorff F., Döring A.C., Gruner K., Schuck S., Bräutigam A., Zeier J. Pipecolic Acid Orchestrates Plant Systemic Acquired Resistance and Defense Priming via Salicylic Acid-Dependent and -Independent Pathways // Plant Cell. - 2016. - Vol. 28. - P. 102-129.
4. Krupyanko V.I., Medentsev A.G., Lukasheva E.V., Arinbasarova A.Yu. Kinetic characteristics of L-lysine - oxidase from Trichoderma cf. aureoviride Rifai VKM F-4268D: substrate specificity and allosteric effects // BBRep. - 2017. - Vol. 9. - P. 9-12.

ПРИМЕНЕНИЕ PATHWAY STUDIO PLANT ДЛЯ ПОНИМАНИЯ РЕАКЦИЙ РАСТЕНИЙ НА ИНФЕКЦИИ

Худошин А.Г., Elsevier B.V., Amsterdam, Netherlands

115035, Москва, ул. Садовническая д. 82, стр. 2, подъезд 6, офис 2044
e-mail: a.khudoshin@elsevier.com

С нарастающей реакцией общества против генетически-модифицированных продуктов (ГМО), ученым, работающим в области проведения селекционных программ растений, нужны новые инструменты, предназначенные для улучшения урожайности и устойчивости к болезням растений. В докладе предложен автоматизированный подход применения биоинформатики в биотехнологии в сельскохозяйственном производстве.

Ключевые слова: селекция, биотехнология в сельскохозяйственном производстве, биоинформатика

Заболевания, поражающие экономически важных культур может снизить отдачу от и без того напряженных источников продовольствия.

С нарастающей реакцией общества против генетически-модифицированных продуктов (ГМО), ученым, работающим в области проведения селекционных программ растений, нужны новые инструменты, предназначенные для улучшения урожайности и устойчивости к болезням растений.

Представленная в докладе, платформа Pathway Studio Plant предоставляет исследователям растений ресурсом, который инкапсулирует практически все современные исследовательские данные об основных модельных организмах растений - Арабидопсис, кукуруза и рис. Сложные аналитические инструменты позволяют исследователям растений сделать вывод о функциональных свойствах в исследуемом организме с помощью гомологии к модельным организмам, что способствуют генерации новых идеи в биологии растений.

В этом докладе показано применение Pathway Studio для выявления потенциально важных белков-мишеней, участвующих в модуляции устойчивость риса к инфекции агентами, такими как rice blast M.grisea.

UNDERSTANDING PLANT RESPONSES TO INFECTION USING PATHWAY STUDIO

Khudoshin A., Elsevier B.V., Amsterdam, Netherlands

115035, Moscow, SAdovnicheskaya str, 82 b2, office 2044
e-mail: a.khudoshin@elsevier.com

With a growing backlash against genetically-modified foods (GMO), plant researchers need new tools to help guide breeding programs designed to improve crop yield and disease resistance. Automated approach including application of bioinformatics in agricultural biotechnology is presented.

Key words: breeding, bioinformatics, agricultural biotechnology, rice, responses to Infection

Diseases affecting economically-important crops can devastate already strained food supplies.

With a growing backlash against genetically-modified foods (GMO), plant researchers need new tools to help guide breeding programs designed to improve crop yield and disease resistance.

Pathway Studio Plant provides plant researchers with a unique resource that encapsulates virtually all current research data about the key model plant organisms Arabidopsis, corn, and rice. Sophisticated analytical tools enable plant researchers to infer functionality in their organism of study by homology to the model organisms, helping to drive new insights into plant biology.

We demonstrate how this capability can be used to identify potentially important target proteins involved in modulating a rice plant's resistance to infection by agents such as rice blast M.grisea.

УДК 632.4.01/.08 : 582.244.2

СУБКЛОНЫ PHYTOPHTHORA INFESTANS, КОЛОНИЗУЮЩИЕ ГИБРИДЫ КАРТОФЕЛЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОФИЛЯМИ ГЕНОВ РАСОСПЕЦИФИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ.

Е.А. Соколова[1], М.А. Кузнецова[2], Т.И. Уланова[2], А.Н. Рогожин[2], Т.И. Сметанина[2], Е.В. Рогозина[3], Э.Е. Хавкин[1]

[1]ФБГНУ Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия, 127550, ул. Тимирязевская, 42;
[2]ФБГНУ Всероссийский институт фитопатологии, Большие Вяземы, Московская обл.;
[3]ФБГНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), С. Петербург.
e-mail: katesokol83@mail.ru

Ключевые слова: Phytophthora infestans, фитофтороз картофеля, SSR генотипирование, Avr гены.

Клоны сложных межвидовых гибридов картофеля, поддерживаемые в полевом генбанке ВИР в Пушкине, использовали для сопоставления нескольких фенотипических и генотипических показателей, характеризующих устойчивость растений картофеля и вирулентность колонизующих его форм возбудителя фитофтороза Phytophthora infestans. У гибридов картофеля определяли морфофизиологические параметры, устойчивость к фитофторозу в полевых и лабораторных условиях и профиль расоспецифичных генов устойчивости. У изолятов P. infestans, собранных на тех же гибридах, и выделенных из них монозооспоровых линий охарактеризованы профили микросателлитных локусов и Avr генов, а также состав генов вирулентности (в тестах с растениями-дифферециаторами) и агрессивность. Сопряженный анализ полиморфных фенотипических и генетических характеристик патогена и растения-хозяина позволит выявить особенности их взаимодействия при поражении картофеля фитофторозом. Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-00098.

UDC 632.4.01/.08 : 582.244.2

SUBCLONES OF PHYTOPHTHORA INFESTANS COLONIZING POTATO HYBRIDS WITH DIFFERENT PROFILES OF GENES FOR RACE-SPECIFIC LATE BLIGHT RESISTANCE.

E.A. Sokolova[1], M.A. Kuznetsova[2], T.I. Ulanova[2], A.N. Rogozhin[2], T.I. Smetanina[2], E.V. Rogozina[3], E.E. Khavkin[1].

[1]Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia, 127550, Timiryazevskaya ul. 42;
[2]Institute of Phytopathology, Bol'shiye Vyasemy, Moscow region, Russia;
[3]Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia.
e-mail: katesokol83@mail.ru

Key words: Phytophthora infestans, potato late blight, SSR genotyping, Avr genes.

Clones of complex interspecific potato hybrids maintained in the VIR field bank, Pushkin, were employed for comparing multiple phenotypic and genotypic indices of potato resistance and virulence of the strains of late blight pathogen Phytophthora infestans colonizing these hybrids. In potato hybrids, we followed morphological and physiological indices, resistance to late blight in field and laboratory tests and the profiles of race-specific

resistance genes. In P. infestans isolates collected on the same potato hybrids and derived monozoospore lines, we characterized the profiles of microsatellite loci and Avr genes, as well as the composition of virulence genes (in the tests with differential plants) and aggressiveness. The parallel analysis of polymorphic phenotypic and genetic characteristics of the pathogen and the host plant will help clarify their specific interactions following late blight infection. This study was supported by the RFBR grant 16-04-00098.

УДК 579.64 + 57.063.7

СИМБИОТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ ПРИ РАЗНЫХ УРОВНЯХ ФОСФОРА В ПОЧВЕ

Юрков А.П.[1,2,3], Якоби Л.М.[1,2], Степанова Г.В.[4], Крюков А.А.[1], Шишова М.Ф.[2]

*[1]Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Россия
196608, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д.3;
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия
199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9;
[3]Российский государственный гидрометеорологический университет, Россия
195196, г. Санкт-Петербург, Малоохтинский пр., д. 98;
[4]Всеросссийский научно-исследовательский институт кормов им. В.Р. Вильямса, Россия
141055, Московская область, Научный городок, г. Лобня, корпус 1
e-mail: yurkovandrey@yandex.ru*

В статье проведено сравнение роста грибов арбускулярной микоризы и их симбиотической эффективности при различных уровнях фосфора в почве в вегетационных условиях. Проведен корреляционный анализ взаимосвязей между параметрами симбиотической эффективности и параметрами микоризации в вегетационных опытах, а также между эффективностью и уровнем плодородия почв в полевых экспериментах географической сети опытов ВНИИСХМ.

Ключевые слова: симбиотическая эффективность, арбускулярная микориза, биопрепарат, Rhizophagus irregularis, идентификация

Арбускулярная микориза является самым распространенным симбиозом, формируемым высшими растениями с грибами отдела Glomeromycota [1]. АМ-грибы способствуют усилению минерального (особенно фосфорного) питания растений, защите их от патогенов и ускорению развития [1-2]. Применение инокулятов АМ-грибов в сельском хозяйстве в качестве биопрепаратов-усилителей роста растений имеет широкие перспективы [3]. Целью настоящего исследования была оценка условий формирования эффективного симбиоза между высшими растениями и грибами АМ.

Проведено исследование симбиотической эффективности и активности развития 10 штаммов грибов арбускулярной микоризы на сильно микотрофной линии люцерны хмелевидной при двух уровнях доступного фосфора (P) в почве. По результатам исследования выделены 5 эффективных штаммов родов Rhizophagus и Glomus и 5 неэффективных штаммов родов Glomus и Funneliformis. Отмечено, что симбиотическая эффективность первых по сухому весу надземных частей существенно (в среднем на 69,9%) выше на почве с низким уровнем P, чем на почве с добавлением P-удобрения, а неэффективные штаммы обладали более сильным откликом (в среднем на 60,7%) на почве с добавлением P. Корреляционные взаимосвязи симбиотической эффективности с индексами микоризации положительны и более существенны в эксперименте на почве с низким уровнем P.

Впервые проведен корреляционный анализ результатов многолетних экспериментов, проводимых в рамках географической сети опытов с землеудобрительными биопрепаратами ВНИИСХМ. Инокулят АМ-гриба (штамм RCAM00320, идентифицированный как Rhizophagus irregularis) был эффективным на кормовых культурах различных семейств в силу неспецифичности взаимодействия с растениями. Средняя эффективность АМ-инокулята варьировала по урожайности семян в диапазоне +5,8...+47,2%. Результаты анализа корреляционных взаимосвязей между показателями эффективности, урожая с агрохимическими показателями почвы показали, что характерно наличие отрицательной корреляции между симбиотической эффективностью биопрепарата и содержанием доступного калия в почве (r = -0,58), фосфора (r = -0,53), уровнем pH (r = -0,40). Эти данные согласуются с гипотезой о ключевой роли АМ в фосфорном питании растений, и свидетельствуют о том, что разрабатываемый прототип

микоризного препарата будет иметь существенную эффективность на почвах с низким уровнем доступного для питания растений фосфора. По результатам исследования авторы рекомендуют применение АМ-инокулята для ячменя обыкновенного (Hordeum vulgare), ржи посевной озимой (Secale cereale), овсяницы красной (Festuca rubra), пшеницы мягкой яровой (Triticum aestivum) и люцерны изменчивой (Medicago x varia).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ-офи-м №15-29-02753 и гранта Президента РФ НШ-6759.2016.4.

Литература.
1. Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. 3rd Edn. Academic Press, New York, 2008.
2. Smith S.E., Smith F.A., Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. // Plant Physiology. - 2003. - V. 133. - P. 16-20.
3. Bauma C., El-Tohamy W., Gruda N. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. // Scientia Horticulturae. - 2015. - V. 187. - P. 131-141.

SYMBIOTIC EFFICIENCY AND ACTIVITY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI UNDER CONDITION OF DIFFERENT PHOSPHORUS LEVEL IN SOIL

Yurkov A.P.[1,2,3], Jacobi L.M.[1,2], Stepanova G.V.[4], Shishova M.F.[2]

[1]All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Russia
196608, Saint-Petersburg, Pushkin, Podbelsky shausse, 3;
[2]Saint Petersburg State University, Russia
199034, Saint-Petersburg, Universitetskaya embankment, 7-9;
[3]Russian State Hydrometeorological University, Russia
195196, Saint-Petersburg, Maloochtinsky prospect, 98;
[4]All-Russia Williams Fodder Research Institute, Russia
141055, Moscow region, Lobnya, 1 corps
e-mail: yurkovandrey@yandex.ru

The comparison of arbuscular mycorrhizal fungi growth and their symbiotic efficiency under different phosphorus level in the soil was provided. The correlation analyses of the relationships between symbiotic efficiency and parameters of mycorrhization in pot tests, as well as between efficiency and level of soil fertility in the field experiments in ARRIAM geographical experiment net were performed.

Key words: symbiotic efficiency, arbuscular mycorrhiza, biopreparation, Rhizophagus irregularis, identification

Arbuscular mycorrhiza is the most widespread symbiosis formed by higher plants with Glomeromycota fungi [1]. AM fungi application guarantees increased mineral (especially phosphorus) plant nutrition, protection against pathogens and fine plant development [1-2]. AM fungi inoculant usage as biopreparations promoting of plant growth has wide perspectives in current agriculture [3]. The aim of this study was to assess the conditions for formation of effective symbiosis between higher plants and AM fungi.

The study of symbiotic efficiency and development activity for ten strains of arbuscular mycorrhizal fungi in highly mycotrophic lines of black medic under conditions of two available phosphorus (P) levels in the soil was carried out. As a result of the study we identified 5 effective Rhizophagus and Glomus strains, and 5 ineffective Glomus and Funneliformis strains. Noted that symbiotic efficiency of top five strains for dry above-ground mass was significantly (on average about 70%) higher under low P level in the soil than under conditions of P fertilizer application, but next five ineffective strains had a strong response (on average about 61%) under conditions of P fertilizer application than otherwise there. Correlations of symbiotic efficiency with mycorrhization indices were positive and more significant in the experiment under low P level in the soil.

For the first time the correlation analysis was carried out for the results of long-term experiments which conducted in the framework of geographical experiment net of All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology. AM fungal inoculum (RCAM00320 strain, identified as R. irregularis) was effective for forage crops from different families because of lack of specificity in interactions with plants. AM inoculum average efficiency in seed mass varied in the range of +5,8..+47,2%. The results of the correlation analysis for symbiotic efficiency parameters and harvest with agrochemical parameters of soil showed negative correlations between symbiotic efficiency of biopreparation and content of available potassium in the soil (r = -0,58), phosphorus (r = -0,53), pH (r= -0,40).

Obtained data were consistent with the hypothesis about key role of AM in phosphate plant nutrition and indicate that the developed mycorrhizal biopreparation prototype will have significant efficiency under condition of lower level of phosphorus available for plants. According to study results, authors recommend AM inoculum application primarily for barley (Hordeum vulgare), winter rye (Secale cereale), red fescue (Festuca rubra), spring common wheat (Triticum aestivum) and alfalfa (Medicago x varia). The work was supported by grants of RFBR (15-29-02753) and the President of the Russian Federation (НШ-6759.2016.4).

References:
1. Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. 3rd Edn. Academic Press, New York, 2008.
2. Smith S.E., Smith F.A., Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. // Plant Physiology. - 2003. - V. 133. - P. 16-20.
3. Bauma C., El-Tohamy W., Gruda N. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. // Scientia Horticulturae. - 2015. - V. 187. - P. 131-141.

УДК 577.112:636.085.55

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ: ПРОТЕАЗЫ И ЛИПАЗЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ КОРМОВЫХ ДОБАВОК

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

Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия
394036, Россия, г. Воронеж, проспект Революции, д. 19
e-mail: anna-biotech@yandex.ru

Проведен анализ баз данных биологической информации, выбраны наиболее перспективные ферменты, определены источники генов, проведено клонирование, экспрессия целевых генов в E.coli, выделены и очищены рекомбинантные ферменты: протеаза и липаза, с целью разработки кормовых добавок на их основе.

Ключевые слова: протеаза, липаза, рекомбинантные ферменты, кормовые добавки, клонирование, экспрессия

Использование высокобелковых и жиросодержащих компонентов в составе комбикорма, например, соевого шрота или подсолнечного жмыха, диктует необходимость улучшения условий для пищеварения и усвоения питательных веществ сельскохозяйственными животными. Одним из путей повышения конверсии такого корма является использование кормовых ферментных добавок, способствующих ускоренному гидролизу избыточных белков и жиров [1]. Однако производство высокоактивных ферментных препаратов из природных источников является дорогостоящим и трудоемким процессом. Решением данной проблемы может стать использование недорогих и технологичных рекомбинантных ферментов, полученных в результате отбора и клонирования наиболее подходящих для данных целей генов. Для решения данной задачи нами были проанализированы данные об активности, специфичности и структуре указанных ферментов, а также кодирующих их генов. На основании совокупности полученных данных определен круг наиболее перспективных для дальнейших исследований ферментов. Проведен поиск подходящих продуцентов в коллекциях микроорганизмов и их биохимический скрининг. Выделены целевые гены липазы и протеазы из микроорганизмов и клонированы путем встраивания в плазмидные векторы системы PET (Novagen, США). Экспрессию клонированных генов проводили в клетках E. coli (Top-10, Bl-21, C-41). Оптимальное время индукции определяли экспериментальным путем, проверяя уровень индукции целевых ферментов после внесения IPTG, с интервалом 20 минут. Выделение и очистку рекомбинантных ферментов проводили хроматографическим методом, по наличию в структуре белков 6 His-Tag, с использованием Ni-NTA агарозы (Qiagen, США). Активность полученных ферментов определяли стандартными биохимическими методами. В результате проведенных исследований нами выделены и охарактеризованы рекомбинантные ферменты: протеаза и липаза, перспективные для использования в сельском хозяйстве в качестве компонентов кормовых добавок, улучшающих переваривание белковых и жировых составляющих комбикорма. Определено оптимальное время индукции биосинтеза рекомбинантных ферментов, достигнуты высокие показатели содержания целевых ферментов в клеточной культуре - до 40% от общего объема белка [2]. Полученные данные могут послужить основой для разработки технологии производства кормовых добавок на основе рекомбинантных ферментов. Данная технология будет способствовать

увеличению продуктивности животноводства и птицеводства, а также снизит расходы на производство и закупку комбикормов сельскохозяйственными предприятиями за счет увеличения степени конверсии корма.

Литература.
1. Chikkali S., Mecking S. Refining of plant oils to chemicals by olefin metathesis // Angewandte Chemie Int. Ed. 2012. Vol. 54. №2. P. 58-72.
2. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Agafonov A.V., Kondratyev M.S., Purtov Y.A. Interaction of phospholipase A of the E. coli outer membrane with the inhibitors of eucaryotic phospholipases A2 and their effect on the Ca2+-induced permeabilization of the bacterial membrane // J. of membr. boil. 2014. Vol. 247. № 3. P. 281-288

UDC 577.112:636.085.55

OBTAINING OF RECOMBINANT ENZYMES: PROTEASE AND LIPASE FOR USE AS COMPONENTS OF FEED ADDITIVES

Tolkacheva A.A., Cherenkov D.A., Korneeva O.S.

Voronezh state university of engineering technologies
394036, Russia, Voronezh, Revolutsii av., 19
e-mail: anna-biotech@yandex.ru

Authors analyzed the databases of biological information. Most promising enzymes were selected. Sources of target genes have been identified. Target genes were cloned and expressed in E. coli. Recombinant enzymes (protease and lipase) were isolated and purified in order to develop feed additives based on them.

Key words: protease, lipase, recombinant enzymes, food additives, cloning, expression

The use of high-protein and fat-containing components in animal feed, such as soybean meal or sunflower meal, dictates the need to improve conditions for digestion and assimilation of nutrients by agricultural animals. One way to improve the conversion of the feed is to use feed enzyme additives that accelerate the hydrolysis of excess protein and fat [1]. However, the production of highly active enzyme preparations from natural sources is expensive and labor intensive process. The use of cheap and technological recombinant enzymes, obtained by selection and cloning of genes most suitable for this purpose, may become a solution to this problem. To solve this problem we were analyzed data about activity, structure and specificity of these enzymes and encoding genes. The most promising for further studies enzymes have been identified on the basis of the totality of the data. Suitable microorganisms are found in the collections of microorganisms and their biochemical screening was further held. Target genes of lipase and protease isolated from microorganisms and cloned by inserting into a plasmid vector system PET (Novagen, USA). Expression of cloned genes was performed in E. coli cells (Top-10, Bl-21, C-41). The optimal induction time was determined experimentally by checking every 20 minutes the level of induction the target enzyme after introduction of IPTG. Isolation and purification of the recombinant enzyme was carried out chromatographically by the presence of protein structure 6 His-Tag using Ni-NTA agarose (Qiagen, USA). The activity of obtained enzymes were determined by standard biochemical methods. Thus we have identified and characterized recombinant enzymes (lipase and protease) that are promising for agricultural use as components of feed additives that enhance the digestion of fat and protein of compound feed. The optimal time for induction of biosynthesis of recombinant enzyme was determined. We have achieved high levels of content targeted enzymes in cell culture - up to 40% of the total volume of protein [2]. The obtained data are the basis for the development of manufacturing technology of feed additives based on recombinant enzymes. This technology will help increase the productivity of livestock and poultry, as well as reduce the cost of production and purchase of animal feed by agricultural enterprises, due to increase degree of feed conversion.

References:
1. Chikkali S., Mecking S. Refining of plant oils to chemicals by olefin metathesis // Angewandte Chemie Int. Ed. 2012. Vol. 54. №2. P. 58-72.
2. Belosludtsev K.N., Belosludtseva N.V., Agafonov A.V., Kondratyev M.S., Purtov Y.A. Interaction of phospholipase A of the E. coli outer membrane with the inhibitors of eucaryotic phospholipases A2 and their effect on the Ca2+-induced permeabilization of the bacterial membrane // J. of membr. boil. 2014. Vol. 247. № 3. P. 281-288

УДК 542.924: 547. 535-39

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА ФИЗИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ: ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕПЛИЧНЫХ КОМПЛЕКСАХ

Рубцова Н.А.[1], Апашева Л.М.[1], Лобанов А.В.[1], Гантман Ю.В.[1], Овчаренко Е.Н.[1], Сергеев А.И.[1], Сурдо А.В.[2], Герасимов М.Ю.[2], Евстафеев А.С.[1], Будник М.И.[3], Комиссаров Г.Г.[1]

[1]Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, Москва, Россия
119991, ул. Косыгина, д 4, e-mail: nroubtsova@yandex.ru
[2]Специальное конструкторское бюро «ЗЕНИТ», Москва, Россия
[3]Научно-исследовательский инженерный институт, Балашиха, Россия

Предлагается в сложных условиях с/х землепользования и в тепличных комплексах применять для стимуляции развития растений растворы пероксида водорода, получаемые обработкой воды физическими методами: комбинированным УФ- и КВЧ-облучением. Такие растворы значительно более эффективны в качестве регулятора роста, чем коммерческие растворы пероксида.

Ключевые слова: тепличные комплексы, пероксид водорода, регулятор роста.

На территориях рискованного земледелия, для получения гарантированных урожаев применяют регуляторы роста растений. Нами показано, что эффективным стимулятором развития растений и антистрессовым препаратом является пероксид водорода (ПВ) [1-3]. Описана существенная роль ПВ в процессе фотосинтеза [4].

Коммерческий раствор ПВ стабилизируют добавками, многие из которых токсичны. Транспортировка и разведение ПВ до нужных концентраций перед использованием усложняет и удорожает процесс его применения.

Предложен метод получения ПВ на месте применения в нужных концентрациях. Растворы ПВ получали, обрабатывая на воду комбинированным ультрафиолетовым (УФ) и крайне высокочастотным (КВЧ) электромагнитным излучением (ЭМИ). Через 30 мин после воздействия (УФ+КВЧ) концентрации ПВ в воде составляла 8⊠10-6 М. Сравнение эффективности растворов ПВ, получаемых активацией воды (УФ+КВЧ) и эквимолярных растворов коммерческого ПВ, проводили на разных тест-объектах по ряду морфологических признаков. Растения проращивали в испытуемых растворах ПВ и в воде (контроль), доращивали в культуральном шкафу с периодами освещения темнота : свет=12:12 ч в культуральных сосудах на песке, который увлажняли испытуемыми растворами ПВ и водой. Во всех вариантах эксперимента наблюдали существенное превышение опытных значений по тестам, определяющим развитие растений. При проращивании растений в растворах ПВ и в воде показано, что по отношению к контролю (вода – 100%), высота растений, подрощенных на растворах коммерческого ПВ, была выше на 8-10%, а растений, подрощенных на растворах ПВ (УФ+КВЧ), на 80-90%. Всхожесть семян в опыте превышала контрольные значения на 25-30%. Высота растений, выращиваемых в культуральных сосудах при увлажнении грунта растворами ПВ (УФ+КВЧ), была выше контроля на 30-35%. В последовательные стадии развития растения вступали раньше там, где применяли растворы ПВ (УФ+КВЧ). Показателем эффективности фотосинтеза растений является содержание хлорофилла. Мы определяли количество хлорофилла в зеленых проростках. В опытных образцах эти значения были больше контрольных на 19-20%. Отмечено существенное изменение значений спин-спиновой релаксации Т2 у проростков, выращенных в опытных вариантах. Количество внутриклеточной воды, связанной с клеточными структурами, в опыте было выше.

Растворы ПВ, получаемые путем обработки воды физическими методами ЭМИ КВЧ и УФ, значительно более активны и эффективны при действии на растения по сравнению с действием коммерческих растворов ПВ, содержащих стабилизирующие добавки. Именно эти растворы ПВ рекомендуется получать и использовать в сложных условиях с/х землепользования, а также в тепличных комплексах на месте применения.

Литература.
1. Патент РФ 2264070 /06.09. 2004
2. Патент РФ 2423813/04.21. 2010
3.Патент РФ 2445759/11.24.2010
4. Комиссаров Г.Г. «Фотосинтез: физико-химический подход».– Москва: УРСС, 2003. – 224 с.

GENERATION OF HYDROGEN PEROXIDE BY PHYSICAL METHODS: PROSPECTS OF APPLICATION IN THE GREENHOUSE COMPLEX

Rubtsova N.A.[1], Apasheva L.M.[1], Lobanov A.V.[1],Gantman U.V. [1],Ovcharenko E.N.[1], Sergeev A.I.[1], Surdo A.V.[2], Gerasimov M.U.[2], Evstafeev A.S.[2], A.Budnik M.I.[3], Komissarov G.G[1].

[1]. Semenov Institute of Chemical Physics, 119991, Kosygin str. 4, Moscow,
e-mail: nroubtsova@yandex.ru
[2]. ZENIT Special Design Bureau, JSC Panfilovsky prospect, 10 Zelenograd
[3]. Scientific Research Engineering Institute, JSC sh. .Enthuziastov, 6, Moscow Region

It is proposed to use solutions of hydrogen peroxide obtained through the water treatment by physical methods: Water treatment with a combination of ultraviolet and short-wave radiation to stimulate plant growth in difficult conditions of agricultural land use and in greenhouse complexes. As a plant growth regulator, these solutions are much more effective than commercially sold peroxide solutions.

Key words: greenhouse, hydrogen peroxide, plant growth regulator, EMR, UV, EHF

In areas of risk farming, the use of plant growth regulators is recommended to guarantee harvest. We have shown that hydrogen peroxide (HP) is an effective plant growth stimulator and anti-stress drug [1-3]. The important role of HP in the process of photosynthesis is noted in the literature [4]. Commercially sold HP solutions are usually stabilized by additives, many of which are toxic. Transport and subsequent dilution of HP to the desired concentration prior to use, complicate the process of its application and make it more expensive.

A method is proposed to obtain HP on the site in the right concentrations.

HP solutions were obtained by treating water with combined ultraviolet (UV) and extremely high frequency (EHF) electromagnetic radiation (EMR). After 30 minutes of exposure (UV + EHF), the concentration of HP in water reached 8x10-6 M.

We compared the effectiveness of HP solutions, obtained by water activation (UV + EHF) with equimolar commercial HP solutions. Different plant species and a number of morphological characters of them were used for this study. Seeds were germinated in test solutions of HP and in water (control) and then cultivated in a germinating chamber with lighting periods of 12:12 hours (light: darkness) in germination containers with sand. The sand was soaked with the test HP solutions or with distilled water. Experimental values significantly exceeded the control values that are used to determine plant growth. It is shown that the height of the plants that were cultivated with commercially sold HP solutions, was bigger than the control value (water) by 8-10%, while plants cultivated on HP solutions, that were treated by UV + EHF, grew by 80-90% higher compared to the control. Seed germination rate in the experiment exceeded the reference value by 25-30%.

When the soil in the germination container was soaked with UV + EHF treated HP solutions, the plant height was bigger than the control value by 30-35%. The plants entered all stages of development earlier where UV + EHF treated HP solutions were used. The content of chlorophyll is an indicator of the efficiency of plant photosynthesis. We determined the amount of chlorophyll in the green seedlings.

In test samples these control values were higher by 19-20%. A substantial change in the values of the spin-spin relaxation time T2 has been marked in seedlings that were grown for the experiment. The intracellular water amount which is known to be associated with cellular structures, was higher in the experiment HP solutions obtained by physical methods of water treatment and EHF EMR UV, were much more active and effective when applied to plants, compared to the current commercially sold HP solutions containing stabilizing additives.

These HP solutions are recommended to obtain in difficult agricultural conditions, as well as in the greenhouse complexes on site.

References:
1. Patent RF 2264070/06.09. 2004
2. Patent RF 2423813/06.09. 2004
3. Patent RF 2445759/11.24.2010
4. Komissarov G.G. «Photosynthesis: Physical-Chemical Approach » Moscow URSS, 2003– 244 p.

*УДК 630*4*

ТЕХНОЛОГИЯ МАЛОТОННАЖНОГО ПРОИЗВОДСТВА НЕОВИРА - НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ЛЕСА ОТ РЫЖЕГО СОСНОВОГО ПИЛИЛЬЩИКА

Сергеева Ю.А., Долмонего С.О.

ФБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства»
141202, Россия, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д.15
e-mail: sergeeva.vniilm@gmail.com

Изложены результаты выполнения работ созданию технологии малотоннажного производства Неовира – нового биологического средства для защиты леса от рыжего соснового пилильщика

Ключевые слова: биологическое средство, защита леса, малотоннажное производство

В соответствии с Программой Био2020 проведены исследования, направленные на создание новых биологических средств защиты леса от вредных насекомых, в том числе разработку технологии малотоннажного производства Неовира - биологического средства на основе энтомопатогенного вирусного штамма против рыжего соснового пилильщика Neodiprion sertifer Geoff. Проведение работ вызвано необходимостью ликвидировать отставание обеспеченности лесного хозяйства страны новыми эффективными и экологически безопасными биологическими средствами для борьбы с вредными организмами.

Биологическое средство Неовир представляет собой концентрированную суспензию вирусных полиэдров, которую получают из погибших от вируса ядерного полиэдроза, в результате обработки штаммом SNsrR11/12, личинок рыжего соснового пилильщика (РСП), путем очистки вирусной биомассы. Штамм-продуцент депонирован в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского».

В процессе работ созданы и полностью оснащены современным оборудованием пилотная лаборатория в ФБУ ВНИИЛМ и региональная биотехнологическая лаборатория в Южно-европейском филиале ФБУ ВНИИЛМ (станица Вешенская Ростовской области).

Согласно разработанной Технологической схеме малотоннажного производства Неовира отработаны оптимальные режимы при его малотоннажной наработке. Экспериментально определены технологические параметры переработки и хранения биоматериала, повышающие выход вирусных полиэдров при производстве биологического средства с минимальными трудозатратами. Для снижения бактериальной обсемененности определена эффективная добавка антибиотика, позволяющая снизить количество контаминантов в 10 раз, не оказав при этом влияния на эффективность вирусного начала в биологическом средстве.

На основе полученных в процессе исследований данных разработаны Технические условия на Неовир. Выполнен расчет себестоимости биологического средства. Определены направления работ по внедрению в практику Неовира и возможности его коммерциализации.

По итогам выполненных работ составлена технология малотоннажного производства биологического средства для защиты леса от рыжего соснового пилильщика (Технология), которая содержит перечень работ по накоплению вирусной биомассы; инструкции по переработке погибших личинок и очистке вирусной биомассы; описание манипуляций и обязательных требований к процессу приготовления биологического средства, способов определения его титра, чистоты суспензии и контроля качества. Все указанные в Технологии нормы прошли многократную проверку на технологическом производстве в пилотной и региональной лабораториях ФБУ ВНИИЛМ и подтверждены экспериментальными данными.

Реализация результатов выполненных исследований позволит организовать в стране малотоннажное производство Неовира против рыжего соснового пилильщика. Применение биологического средства позволит увеличить сохранность создаваемых искусственных посадок сосны и естественных лесов и даст экономический эффект в результате сокращения количества обработок в конкретном насаждении за весь период выращивания, позволит снизить экологические риски от обработок химическими инсектицидами очагов рыжего соснового пилильщика. Современные лабораторные мощности будут использованы для проведения дальнейших всесторонних исследований по созданию новых биологических средств защиты леса от вредителей и патогенов.

LOW TONNAGE PRODUCTION TECHNOLOGY OF NEOVIR A NEW BIOLOGICAL AGENT TO PROTECT FOREST AGAINST RED PINE SAWFLY.

Sergeeva Yu., Dolmonego S.

Russian Research Institute for Suilviculture and Mechanization of Forestry
141202, Russia, Moscow region, Pushkino, Institutskaya str. 15

Findings of studies to develop low tonnage production technology of a new biological agent to protect forest against red pine sawfly.

Key words: biological agent, forest protection, low tonnage production.

The studies aimed at development of new forest protection biological agents against hazardous insects including low tonnage production technology of a new biological agent to protect forest against red pine sawfly Neodiprion sertifer Geoff. were conducted under the Bio2020 Program. This work was needed to overcome gap in available new efficient and environmental biological agents for hazardous organism control in our national forestry.

Neovir biological agent is a concentrated suspension of virus loppyhedra produced from red pine sawfly (RPS) larvae killed by nuclear polyhedrosis virus due to its treatment with SNsrR11/12 strain and afterwards virus biomass clearing. The producer strain has been submitted to the State virus collection at the Ivanovsky Virology Research Institute.

A pilot laboratory at VNIILM and a regional biotechnological laboratory at the South-European subsidiary of VNIILM (village Veshenskaya, Rostovskaya region) have been set up and completely equipped with updated hardware during these studies.

Optimal low tonnage production modes have been worked out according to available Neovir low tonnage production technological design. Biomaterial processing and storage technological parameters that boost virus polyhedral output in this biological agent production with minimum labour costs have been identified experimentally. An efficient antibiotic additive that enables 10 times reduction of contaminant number without any impact on virus base in the biological agent has been found.

The study findings enabled development of the Neovir terms of reference. The biological net cost has been calculated. Neovir practical introduction operations and its commercialization opportunities have been identified.

The study results enabled development the biological agent low tonnage production technology for forest protection against red pine sawfly (Technology) that comprise a list of operations to accumulated virus biomass, dead larvae and virus biomass clearing instructions, description of operations and compulsory requirements for the biological agent production process, its titre and suspension purity identification ways and quality control. All standards specified in the Technology have been tested many times at the VNIILM pilot and regional laboratories. And supported by experiment data.

Implementation of the study results will enable to set up Neovir low tonnage production against red pine sawfly in our country. The biological agent application will enable to boost preservation of pine plantations and natural forests and economic effect due to reduction of specific wood treatments over the whole production period and cut environmental risks of chemical insecticide applications in red pine sawfly outbreaks. Updated laboratory facilities will be used in further comprehensive studies for development of new biological agents to protect forests against pests and pathogens.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 579.62

СЕЛЕКЦИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПТИЦЕВОДСТВА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОМАШНИХ КУР, ОТОБРАННЫХ В ГРУЗИИ

Амиранашвили Л.Л., Гагелидзе Н.А., Варсимашвили Х.И., Толордава Л.Л., Тиникашвили Л.М., Гамкрелидзе М.Д., Амашукели Н.В.

Институт Биохимии и Биотехнологии им. С. Дурмишидзе Аграрного Университета Грузии, Тбилиси, Грузия

0159, Тбилиси, Университетский кампус им. Кахи Бендукидзе, Аллея Давида Агмашенебели №240
E-mail: l.amiranashvili@agruni.edu.ge

4 Изолята молочнокислых бактерий были выбраны среди культур, выделенных из желудочно-кишечного тракта домашних кур отобранных в Мингрельском регионе Грузии, по антибактериальным свойствам, толерантностью к желчи и кислоте. Эти свойства делает их перспективными для использования в рационе кур, в виде кормовых добавок.

Ключевые слова: Изоляты молочнокислых бактерий, антибактериальная активность, толерантность к желчи и кислоте

Пробиотики обладают большим потенциалом коррекции микрофлоры пищеварительного тракта, повышения клеточного и гуморального иммунитета и улучшения здоровья. Вклю¬чение молочнокислых бактерий в рацион домашней птицы яв-ляется экологически безопасным и безвредным методом для профилакти¬ки и борьбы с острыми кишечными инфекциями, вызванными патогенными и услов¬но-патогенными микроорганизмами. В передовых капиталистических странах ущерб только от сальмонеллёза достигает несколько миллионов долларов [1].

Целью работы являлось выделение молочнокислых бактерий из разных сегментов желудочно-кишечного тракта и изучение их пробиотических свойств.

5 Голов домашних кур были отобраны в разных деревнях Мингрелии (Грузия) по следующим критериям: кладка яиц и выведение цыплят в домашних хозяйствах; отсутствие антибиотикотерапии, кормление экологически чистым кормом.

53 Изолятов различной морфологии и консистенции были выделены из разных частей желудочно-кишечного тракта (подвздошная кишка, слепые кишки, прямая кишка) на агаризованных средах MRS, M17 и селективной среде для бифидобактерий. 26 Изолятов грамположительных кокков и палочек, характерных для молочнокислых бактерий были отобраны для дальнейших исследований.

Методом агаровых блоков [2] была изучена антимикробная активность изолятов к 8 тест-культурам (Campylobacter jejuni ATCC 33291, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Shigella flexneri ATCC 29903, E.coli ATCC 8739, Bacillus cereus ATCC 10876, Salmonella enterica DSH 50912, Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes). Антибактериальную активность определяли по диаметру зон ингибирования.

Таблица. Ингибиторная активность молочнокислых бактерий

Изолят	*Listeria monocytogenes*	*Staphylococcus aureus*	*E.Coli*	*Salmonella enterica*	*Salmonella typhimurium*	*Shigella flexneri*	*Bacillus cereus*	*Campylobacter jejuni*
LC 108	14	18	16	10	20	20	14	15
LC 111	15	19	12	10	11	13	13	17
LC 112	12	18	20	10	13	20	12	9
LC 114	13	18	15	0	12	12	11	15
LC 115	13	16	18	0	15	20	10	15
LC 120	11	18	20	16	14	20	12	15
LC 121	11	14	16	16	12	12	11	16
LC 124	13	18	20	14	12	20	12	15
LC 157	17	10	16	13	14	14	11	17
LC 160	16	13	15	12	12	15	8	18

Наибольший ингибирующий эффект против роста L. Monocytogenes проявили изоляты LC 161 (18 мм), против St. aureus – LC 111 (19 мм), против E. coli – LC 112, LC 120 и LC 124 (20 мм), против S. enterica – LC 120 и LC 121 (16 мм), против S. typhimurium – LC 108 (20 мм), против Sh. Flexneri – LC 108, LC 112, LC 115, LC 120 и LC 124 (20 мм), против B. cereus – LC 108 (14 мм), против C. jejuni – LC 158 и LC 160 (18 мм). Особенно надо выделить изолят LC 108, который проявил ингибирующее действие против 6 испытанных тест-культур и LC 115 и LC 120 – против 5.

В изолятах, которые проявили высокую антибактериальную активность (диаметр зон ингибирования >14 мм), по меньшей мере, к трем индикаторным культурам, были изучены толерантность к желчи (1%) и кислоте (pH 2) и высокая жизнеспособность после 30 мин инкубации при pH 2; Всего таких изолятов оказалось 10: LC 108, LC 111, LC 112, LC 114, LC 115, LC 120, LC 121, LC 124, LC 157, LC 160 (см.Таблицу). Из них только 4 (LC 108, LC 111, LC 120, LC 124) обладают вышеперечисленными свойствами.

Секвенирование PCR-продуктов (праймеры: 27F-1492R) ДНК выбранных штаммов показало, что они

принадлежат к виду Lactobacillus Brevis.

Толерантность к желчи и кислоте и сохранение жизнеспособности после инкубации в кислой среде дают этим штаммам возможность выжить в желудочно-кишечном тракте и, следовательно, проявить свою антибактериальную способность при использовании в рационе кур в виде кормовых добавок.

Работа выполнена по финансовой поддержке Национального Научного Фонда им. Шота Руставели [грант № AR/100/10-130/14].

Литература.
1. Ушакова Н. А., Некрасов Р. В., Правдин В. Г., Кравцова Л. З., Бобровская О. И., Павлов Д. С. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения // Научные обзоры. — 2012. №1. — С.184-192.
2. Егоров Н. С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: Высшая школа, 1965. 212 с.

UDC 579.62

SELECTION OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM DOMESTIC CHICKEN CHOSEN IN GEORGIA FOR POULTRY FARMING

Amiranashvili L.L., Gagelidze N.A., Varsimashvilil Kh.I. Tolordava L.L., Tinikashvili L.M., Gamkrelidze M.D., Amashukeli N.V.

S. Durmishidze Institute of Biochemistry and Biotechnology, Agricultural University of Georgia, Tbilisi, Georgia
0159, Tbilisi, Kakha Bendukidze University Campus, #240 David Aghmashenebeli Alley, Tbilisi, Georgia
E-mail: l.amiranashvili@agruni.edu.ge

Four LAB isolates have been chosen by antibacterial properties, bile and acid tolerance among the cultures isolated from GIT of domestic chickens, collected in Mingrelia, region of Georgia. These properties make them effective remedy as perspective probiotic additives for chicken feeding stuff.

Key words: Isolates of lactic acid bacteria, antibacterial activity, antibacterial activity, bile and acid tolerance

Probiotics have great potential for the correction of digestive tract microflora, enhancement of cellular and humoral immunity and health improvement. Introduction of lactic acid bacteria into the diet of domestic poultry is environmentally safe and harmless method for the prophylaxis and control of acute intestinal infections, caused by pathogenic and opportunistic bacteria. In the advanced capitalist countries, the losses from salmonellosis only reach several million dollars [1].

The aim of the work was isolation of lactic acid bacteria from different segments of chicken gastrointestinal tract and study of their probiotic properties.

In various villages of Mingrelia (Georgia), 5 domestic chickens were selected by the following criteria: rearing of eggs and hatching of chicks in family household; absence of antibiotic therapy, feeding by ecologically pure feeding stuff.

53 Isolates with different morphology and consistency were isolated from different parts of the gastrointestinal tract (ileum, ceca, and rectum) on agar medium of MRS, M17 and selective medium for bifidobacteria. 26 Isolates of gram-positive cocci and rods characteristic of the LAB were selected for further studies.

Antimicrobial activity of isolates to 8 test cultures (Campylobacter jejuni ATCC 33291, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Shigella flexneri ATCC 29903, E. coli ATCC 8739, Bacillus cereus ATCC 10876, Salmonella enterica DSH 50912, Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes) was studied by agar block method [2]. Antibacterial activity was determined by the diameter of the inhibition zones.

The highest inhibitory effect against the growth of L. Monocytogenes showed the isolate LC161 (18 mm); against St. aureus – LC111 (19 mm); against E. coli – LC112, LC120 and LC124 (20 mm); against S. enterica – LC120 and LC121 (16 mm); against S. typhimurium – LC 108 (20 mm); against Sh. Flexneri –LC 108, LC112, LC115, LC120, and LC124 (20 mm); against B. cereus – LC108 (14 mm); against C. jejuni – LC158 and LC160 (18 mm). Especially it should be marked the isolate LC108, which showed inhibitory effects against 6 tested test-cultures, and isolates LC115 and LC120 – against 5 ones.

Table. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria

Isolate	*Listeria monocytogenes*	*Staphylococcus aureus*	*E.Coli*	*Salmonella enterica*	*Salmonella typhimurium*	*Shigella flexneri*	*Bacillus cereus*	*Campylobacter jejuni*
LC 108	14	18	16	10	20	20	14	15
LC 111	15	19	12	10	11	13	13	17
LC 112	12	18	20	10	13	20	12	9
LC 114	13	18	15	0	12	12	11	15
LC 115	13	16	18	0	15	20	10	15
LC 120	11	18	20	16	14	20	12	15
LC 121	11	14	16	16	12	12	11	16
LC 124	13	18	20	14	12	20	12	15
LC 157	17	10	16	13	14	14	11	17
LC 160	16	13	15	12	12	15	8	18

Bile (1%) and acid (pH 2) tolerances, and high viability after 30 min of incubation at pH 2 were studied in isolates, which revealed high bacterial activity (diameter of inhibition zones > 14 mm) against at least three indicator cultures. Such kind of isolates was found 10 in all: LC108, LC111, LC112, LC114, LC115, LC120, LC121, LC124, LC157, LC160 (see Table). Among them, only 4 ones possess above-mentioned properties.

Sequence analysis of PCR-products of DNA (primers 27F-1492R) for chosen strains showed that they belong to the species of Lactobacillus Brevis.

Bile and acid tolerance and maintenance of viability after incubation in the acid medium enable these strains to survive in gastro-intestinal tract and consequently, reveal their antibacterial ability at application in chicken diet as feed additives.

This work was supported by Shota Rustaveli National Science Foundation (SRNSF) [grant #AR/100/10-130/14].

References:
1. Ushakova, N.A., Nekrasov R.V., Pravdin V.G., Kravtsov L.Z., Bobrovskaya O.I., Pavlov D.S. New generation of probiotic preparations as fodder // Scientific reviews. — 2012. №1. — P.184-192.
2. N.S. Egorov. Microbes – the antagonists and the biological methods of determination of antimicrobial activity, Visshaja Shkola, Moscow, 1965, 212 p.

УДК 633.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ, ОТВЕЧАЮЩИХ ЗА ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ОВСА (AVENA SATIVA L.)

Григорьева Е. А., Ульянич П.С., Кошкин В. А., Лоскутов И. Г., Потокина Е.К.

Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И.Вавилова (ВИР)
190000, Санкт-Петербург,Большая Морская ул., 42-44.
Email: Grigoriewa.liz@yandex.ru

В геноме овса идентифицирована короткая последовательность ДНК, ортологичная генам фотопериодической чувствительности (ФПЧ) у других злаков. С ее использованием становится возможным идентифицировать полноразмерную последовательность гена ФПЧ у овса и изучить его фенотипический эффект в расщепляющейся популяции RILs.
Ключевые слова: фотопериодическая реакция; овёс; вегетационный период; синтения злаков; идентификация генов, рекомбинантные инбредные линии

Для гексаплоидного овса гены Ppd (photoperiod response), контролирующие реакцию на фотопериод, на сегодняшний день не идентифицированы, хотя возможность создавать раннеспелые сорта со слабой ФПЧ имеет большое значение для отечественных селекционеров. В большинстве случаев сорта овса со слабой ФПЧ являются также скороспелыми. Такие сорта необходимы во многих регионах России, так как

доминантные аллели Ppd опосредованно влияют на засухоустойчивость,позволяют растениям пройти ключевые фазы развития до наступления высоких летних температур. Кроме того, сокращение вегетационного периода значительно снижает уровень накопления токсичных метаболитов грибов рода Fusarium в зерне овса (Gagkaeva et al., 2011).

Ранее для поиска наиболее скороспелых и слабочувствительных к короткому фотопериоду сортов овса в ВИРе было проанализировано 105 образцов отечественного и зарубежного происхождения, в их числе местные и селекционные сорта (Смирнова, 2011). Среди изученных образцов овса были обнаружены 24 источника скороспелости и слабой ФПЧ, среди них выделялся мексиканский местный сорт Чихуахуа (Chihuahua, к-12230), который по срокам начала колошения имел совсем небольшую задержку на коротком дне по сравнению с длинным. В 2008 г. этот потенциальный источник скороспелости был скрещен с позднеспелым образцом Анатолишер (Anatolisher, к-14668) из Турции, и от этого скрещивания в поколении F4 была получена популяция рекомбинантных инбредных линий (RILs), у которых задержка сроков начала колошения на коротком дне по сравнению с длинным варьировала от 8 до 40 сут.

Располагая таким исследовательским материалом, была предпринята попытка идентифицировать генетические локусы, которые могут отвечать за реакцию овса на фотопериод. Поиск таких локусов осуществлялся на основе синтении геномов злаков. Нуклеотидные последовательности генов Ppd различных видов злаков, включая Ppd-A1, Ppd-B1, Ppd-D1 пшеницы, Ppd-H1 ячменя, а также ортологичные последовательности Lolium и Brachipodium, были получены из базы данных GenBank. По результатам выравнивания в UGENE (Okonechnikov et al. 2012) были получены две консенсусные последовательности, оказавшиеся консервативными у таких злаков, как пшеница, сорго, ячмень, рис и Brachipodium. Наиболее консервативные участки консенсусных последовательностей были использованы в качестве мест отжига сконструированных консервативных праймеров. Ожидаемый размер целевого фрагмента составил 128 п.н.

Из свежих листьев растений родительских генотипов, а также пяти RILs с наиболее контрастной реакцией на фотопериод, была выделена ДНК с использованием которой была проведена ПЦР с консервативными праймерами. В результате ПЦР был получен целевой продукт ожидаемого размера для всех семи генотипов в анализе. ПЦР-продукт был вырезан из геля, очищен и секвенирован с использованием генетического анализатора Нанофор-05 (Синтол, Москва). Полученная нуклеотидная последовательность была сопоставлена с известными для других злаков генами ФПЧ, в результате чего максимальное сходство (65%) было установлено для секвенированной последовательности овса и последовательности гена Ppd-A1 твердой пшеницы. Таким образом, создан экспериментальный задел, который позволяет вплотную приступить к клонированию полноразмерных последовательностей генов ФПЧ у овса, используя метод Step-Out RACE (Matz et al., 1999). Метод позволяет получить данные о структуре полноразмерного транскрипта, основываясь на минимальной информации о его последовательности (30-50 нуклеотидов).

Литература:

Koshkin V. A. et al. Investigation of photoperiod sensitivity in oats and selection of early weakly photoperiod-sensitive and late strongly photoperiod-sensitive forms //Russian Agricultural Sciences. – 2009. – Т. 35. – №. 2. – С. 77-80.
Loskutov I. G. Influence of vernalization and photoperiod to the vegetation period of wild species of oats (Avena spp.) // Euphytica. – 2001. – Т. 117. – №. 2. – С. 125-131.
Gagkaeva T. Y. et al. Fusarium head blight of cereals //Plant Protection and Quarantine. – 2011. – №. 5. – С. 70-120.
Matz M. et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR //Nucleic Acids Research. – 1999. – Т. 27. – №. 6. – С. 1558-1560.
Smirnova L. O. Genetic Diversity in Oats photoperiodic sensitivity and earliness– 2011.

DISCOVERING OF THE GENETIC LOCI UNDERLYING VARIATION OF PHOTOPERIOD SENSITIVITY IN THE POPULATION OF OAT (AVENA SATIVA L.) RECOMBINANT INBRED LINES

Grigorieva E.A., Ulianich P.S.,Koshkin V.A., Loskutov I.G., Potokina E.K.

N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR)
190000, St. Petersburg Bolshaya Morskaya Str., 42-44.
E-mail: Grigoriewa.liz@yandex.ru

In oat genome a short DNA sequence was identified showing high homology to genes of photoperiod sensitivity (Ppd) in other cereals. Using the sequence as a target, it becomes possible to identify the full-length Ppd gene sequence in oats and explore its phenotypic effect using segregating populations of RILs.

Key words: photoperiodic response; oats; vegetation period; identification of genes; synteny of cereals; Recombinant Inbred Lines

For hexaploid oats (Avena sativa L.) the genes that underlying photoperiodic response (Ppd) have not been identified, although the ability to create early-maturing varieties with a weak photoperiodic sensitivity is of great value to domestic breeders. In the most cases the oat varieties with low sensitivity to photoperiod are early maturing. Such oat varieties are required in many regions of Russia, since dominant Ppd alleles may affect oat drought tolerance by early flowering allowing escaping high summer temperatures.

Earlier, 105 oat accessions of the VIR collection were analyzed to find the most early maturing and photoperiod insensitive varieties of oats (Smirnova, 2011). As a result 24 accessions were selected, among them cv. Chihuahua (k-12230, Mexico) was chosen as the most photoperiod insensitive. In 2008 the parental Chihuahua genotype was crossed with day length sensitive parent Anatolisher (к-14668) from Turkey. From the cross Recombinant Inbred Lines (RILs) population containing ~120 oat genotypes of F4 was obtained. The RILs were contrast in their photoperiod response: their heading date delay in short day (SD) conditions comparing to long day (LD) varies between 8-40 days.

Using the research material we attempted to identify genetic loci that are responsible for the photoperiod sensitivity in oat by means of synteny of cereal genomes. The sequences of Ppd loci in various cereal species including Ppd-A1, Ppd-B1, Ppd-D1 of wheat, Ppd-H1 of barley, and the ortholog loci from Lolium и Brachipodium genomes were obtained from GenBank. Alignment of the sequences was performed with UGENE (Okonechnikov et al. 2012) and two Ppd conservative sequences were discovered among the cereal species (wheat, sorghum, barley, rice and Brachipodium). The conservative sequences were employed to design a pair of the conservative primers. The expected length of DNA fragment amplified with the primers was 128 bp.

Next, total DNA was extracted from leaves of parental genotypes and RILs with the most contrast photoperiod sensitivity. PCR was performed with the designed conservative primers yielding PCR-fragment of the expected size. The amplified fragment was sequences using Nanophor-05 sequencer (Syntol, Moscow). The obtained sequence was blasted against NCBI data base showing the maximal homology to hard wheat Ppd-A1 gene (65%). Thus, the experimental groundwork was created that enables cloning of full length Ppd gene sequences in oats, for instance, using the method of Step-Out RACE (Matz et al., 1999). The method allows obtaining data on the structure of the full-length transcript, based on a minimum of information about its sequence (30-50 nucleotides).

References:
Koshkin V. A. et al. Investigation of photoperiod sensitivity in oats and selection of early weakly photoperiod-sensitive and late strongly photoperiod-sensitive forms //Russian Agricultural Sciences. – 2009. – T. 35. – №. 2. – C. 77-80.
Loskutov I. G. Influence of vernalization and photoperiod to the vegetation period of wild species of oats (Avena spp.) // Euphytica. – 2001. – T. 117. – №. 2. – C. 125-131.
Gagkaeva T. Y. et al. Fusarium head blight of cereals //Plant Protection and Quarantine. – 2011. – №. 5. – C. 70-120.
Matz M. et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR //Nucleic Acids Research. – 1999. – T. 27. – №. 6. – C. 1558-1560.
Smirnova L. O. Genetic Diversity in Oats photoperiodic sensitivity and earliness– 2011.

УДК 631.461.7; 633.5.511; 631.414.3.

РОСТСТИМУЛИРУЮЩАЯ И КОРНЕОБРАЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ ФОСФОРМОБИЛИЗУЮЩИХ РИЗОБАКТЕРИЙ ХЛОПЧАТНИКА

Закирьяева С.И., Джуманиязова Г.И., Нарбаева Х.С.

Институт микробиологии Академии Наук Республики Узбекистан,
100125, Узбекистан, Ташкент, ул. Дурмон йули, 30
E-mail: szakiryaeva@mail.ru

Изучена ростстимулирующая и корнеобразующая активность иммобилизованных на фосфоритной муке клеток солеустойчивых фосформобилизующих ризобактерий хлопчатника рода Bacillus и Paenibacillus, хранившихся в течение 4-х лет. Определено, что у иммобилизованных клеток лучше сохранялась ростстимулирующая и корнеобразующая активность по сравнению со свободными клетками.

Ключевые слова: солеустойчивые ризобактерии хлопчатника, род Bacillus и Paenibacillus, ростстимулирующая и корнеобразующая активность, свободные и иммобилизованные клетки.

Иммобилизованные клетки микроорганизмов, по сравнению со свободными, обладают длительной функциональной активностью, что определяется экранирующим от вредных воздействий эффектом носителя.

В связи с этим, целью наших исследований было изучение ростстимулирующей и корнеобразующей активности иммобилизованных на стерильных носителях клеток солеустойчивых ризобактерий хлопчатника рода Bacillus и Paenibacillus. Изучено влияние свободных и иммобилизованных клеток на всхожесть семян, рост, развитие и корнеобразование проростков хлопчатника в лабораторных опытах. Опыты проводили с семенами хлопчатника сорта С-6524. Эксперименты показали, что иммобилизованные клетки Bacillus subtilis BS-80 (accession number of GenBank: KY041889), B. licheniformis BL-83 (accession number of GenBank: KY041694), Paenibacillus polymyxa PP-113 (accession number of GenBank: KY041978) и P. amylolyticus PA-118 (accession number of GenBank: KY041979) показали лучший ростстимулирующий и корнеобразующий эффект по сравнению со свободными клетками. При инокуляции семян хлопчатника иммобилизованными на фосфоритной муке клетками B. subtilis BS-80 на 30-е сутки опыта высота главного стебля, была выше на 2,0 см, по сравнению с вариантом со свободными клетками и на 6,5 см по сравнению с контролем (замочка семян в воде). Длина корней проростков хлопчатника в варианте с иммобилизованными клетками B. subtilis BS-80 была выше на 1,8 см по сравнению со свободными клетками и на 3,9 см по сравнению с контрольным вариантом. Масса корней увеличилась на 0,02 г/1 растение по сравнению со свободными клетками и на 0,03 г/1 растение по сравнению с контрольным вариантом. Кроме того, варианты с инокуляцией семян иммобилизованными клетками превосходили варианты с инокуляцией свободными клетками и контролем по весу надземной массы. Аналогические данные были получены с иммобилизованными клетками B. licheniformis BL-83, Paenibacillus polymyxa PP-113 и P. amylolyticus PA-118.

Таким образом, полученные нами результаты показали, что иммобилизованные на фосфоритной муке клетки солеустойчивых фосформобилизующих ризобактерий после длительного срока (4 лет) хранения, лучше сохранили свою ростстимулирующую и корнеобразующую активность, в отличие от свободных клеток.

UDC 631.461.7; 633.5.511; 631.414.3.

GROWTH-STIMULATING AND ROOT-FORMATIVE ACTIVITY OF THE IMMOBILIZED CELLS OF SALT-TOLERANT PHOSPHORUS MOBILIZING RHIZOBACTERIA OF COTTON

Zakiryaeva S.I., Djumaniyazova G.I., Narbaeva Kh.S.

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
100125, Uzbekistan, Tashkent, 30 Durmon yuli str.
E-mail: szakiryaeva@mail.ru

Growth-stimulating and root-formative activity of immobilized cells on the phosphorite flour have been studied. Those immobilized cells of the salt-tolerant phosphorus mobilizing rhizobacteria of cotton from Bacillus and Paenibacillus genera had been stored during 4 years. The experiment results have determined that immobilized cells have preserved their growth stimulation and root formation activity better in comparison with free cells.

Key words: salt-tolerant phosphorus mobilizing rhizobacteria of cotton, genera Bacillus and Paenibacillus, growth stimulation and root formation activity, free and immobilized cells.

Immobilized cells of the microorganisms have longer functional activity as compared with free cells, which is determined by shielding effects from inimical of carriers.

In this connection the purpose of our scientific research was to study the growth-stimulating and root-formative activity of the on aseptic carriers immobilized cells of salt-tolerant phosphorus mobilizing rhizobacteria of cotton, which belong to the Bacillus and Paenibacillus genera. During the laboratory experiments it was studied studied influence of the free and immobilized cells on germinating capacity, growth, development and root formation abilities of the cotton plant. Experiments were carried out with seeds of the cotton cultivar C-6524. Experiment results showed that immobilized cells Bacillus subtilis BS-80 (accession number of GenBank: KY041889), B. licheniformis BL-83 (accession number of GenBank: KY041694), Paenibacillus polymyxa PP-113 (accession number of GenBank:

KY041978) and P. amylolyticus PA-118 (accession number of GenBank: KY041979) had better effects for growth stimulation and root formation as compared with free cells. After inoculation of cotton seeds with cells B. subtilis BS-80, that on phosphorite flour immobilized, in the 30 day of the experiment the height of the main stems were by 2.0 cm higher than the variant with free cells, and by 6.5 cm higher than control (soaked in water). The root length of cotton plantlets with the variant of immobilized cells B. subtilis BS-80 increased by 1.8 cm in comparison with free cells, and by 3.9 cm longer than control variant. Weight of the roots has been higher by 0.02 g/1 plant compared with free cells and by 0.03 g/1 plant compared with control variant. Additionally, variants of inoculated seeds with immobilized cells have exceeded the variants of the inoculated free cells and controls in weight of elevated mass of the plants. Analogical results have been obtained with immobilized cells of B. licheniformis BL-83, Paenibacillus polymyxa PP-113 and P. amylolyticus PA-118.

Thus, obtained results suggest, that immobilized cells on the phosphorite flour of the salt-tolerant phosphorus mobilizing rhizobacteria after long storage period (4 years) preserved better their growth-stimulating and root-formative activity in comparison with free cells.

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLUCATUONS

УДК: 581.143.6:635.65

БИОТЕХНОЛОГИЯ В СЕЛЕКЦИИ БОБОВЫХ

Зотиков В.И., Суворова Г.Н., Бобков С.В., Соболева Г.В., Иконников А.В., Сидоренко В.С., Наумкина Т.С.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур», Орел, Россия
302502 г. Орел, п/о Стрелецкое, ул. Молодежная, кор. 1
e-mail: galina@vniizbk.ru

Проведены исследования по получению гаплоидных растений в культуре изолированных пыльников и микроспор гороха. Разработаны селективные системы на устойчивость к осмотическому стрессу in vitro изолированных тканей гороха, получены засухоустойчивые регенеранты. В результате интрогрессивной гибридизации созданы новые сорта чечевицы Восточная и Чернава.

Ключевые слова: горох, чечевица, культура пыльников, регенеранты, засухоустойчивость

Зерновые бобовые играют важную роль в производстве растительного белка и в фиксации атмосферного азота. Однако, несмотря на высокий потенциал современных сортов, их урожайность остается нестабильной и часто подвержена влиянию внешних факторов. Использование методов биотехнологии расширяет возможности классической селекции и позволяет создать новый исходный материал в более сжатые сроки.

Перспектива использования дигаплоидов в селекции гороха состоит в возможности заметного усовершенствования технологии селекционного процесса за счет уменьшения себестоимости и времени создания новых сортов. Методы классической селекции позволяют достигать достаточно высокого уровня гомозиготности только после длительного периода самоопыления. Гомозиготные линии можно получить из репрограммированных микроспор в течение одной генерации.

Проведены исследования по получению гаплоидных растений в культуре изолированных пыльников и микроспор гороха. Определены условия и типы стрессовых воздействий, приводящих к репрограммированию изолированных микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития. Установлено, что обработка изолированных бутонов гороха холодом (+4°C) в течение 7-21 дней стимулирует переход микроспор на спорофитный путь развития, формирование тотипотентных каллусных тканей и регенерацию растений. Выявлено положительное влияние обработки культуры изолированных пыльников теплом (+35°C) на эффективность формирования зеленых морфогенных и эмбриогенных каллусов. В культуре изолированных пыльников получены микрокаллусы, неморфогенные, морфогенные и эмбриогенные каллусы. В культуре изолированных микроспор гороха получены многоклеточные структуры, микрокаллусы и эмбриоиды. Разработаны оригинальные методы стимулирования регенерационного процесса в морфогенных каллусных тканях и созданы питательные среды для поддержания непрерывной регенерации растений гороха в течение длительного периода времени. Полученные результаты можно использовать для разработки новых технологий селекции гороха с использованием гаплоидных растений-регенерантов.

С целью расширения спектра исходного материала в селекции гороха на устойчивость к засухе разработаны и апробированы селективные системы in vitro, которые позволяют проводить скрининг генотипов на устойчивость к осмотическому стрессу на клеточном уровне, а также вести целенаправленный отбор сомаклональных вариантов толерантных к водному дефициту. В результате получены регенеранты гороха которые в условиях засухи по таким показателям как водоудерживающая способность, общее содержание воды в тканях и рабочая адсорбирующая поверхность корневой системы превосходят исходные генотипы и контроль. Установлено, что потомство большинства полученных в результате клеточной селекции регенерантов сохраняют повышенную устойчивость к водному дефициту. Выявлено, что большей устойчивостью к осмотическому стрессу как на уровне каллусных культур, так и полученных из них регенерантов обладают листочковые, белоцветковые морфотипы гороха в сравнении с безлисточковыми (усатыми) формами. Выделены регенерантные линии гороха достоверно превосходящие оригинальные сорта по основным хозяйственно-значимым показателям: числу бобов и семян с растения, продуктивности одного растения, массе 1000 семян, урожайности семян и содержанию белка в семенах. В конкурсном сортоиспытании получены перспективные для селекции засухоустойчивые регенерантные линии гороха с урожайностью семян 3,5-4,0 т/га.

С использованием методов культивирования in vitro семян и семяпочек получены межвидовые гибриды чечевицы в комбинациях Lens culinaris × L. orientalis и L. culinaris × L. tomentosus. В первом случае для преодоления периода покоя зрелые семена F1 проращивали in vitro, при скрещивании с L. tomentosus использовали культуру незрелых семяпочек. В процессе многократного отбора и возвратных скрещиваний получены перспективные селекционные линии и созданы 2 сорта чечевицы Восточная и Чернава, которые проходят Государственное сортоиспытание с 2014 и 2016 годов соответственно. Сорт Восточная имеет белую окраску цветков и желтую окраску семян и семядолей, что свойственно большинству сортов чечевицы выращиваемых в Российской Федерации. Сорт Чернава характеризуется светло-фиолетовой окраской цветков, красной окраской семядолей и оригинальной черно-пестрой окраской семян. Урожайность новых сортов в 2016 году в сортоиспытании ФГБНУ ВНИИЗБК составила у сорта Восточная 2,4 т/га, сорта Чернава 2,8 т/га.

BIOTECNOLOGY IN LEGUMES BREEDING

Zotikov V.I., Suvorova G.N., Bobkov S.V., Soboleva G.V., Ikonnikov A.V., Sidorenko V.S., Naumkina T.S.

The All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, p/b Streletskoye, Orel, Russia
302502 Orel, p/b Streletskoye, Molodeznaya str., 1
e-mail: galina@vniizbk.ru

The study on production of pea haploid plants in cultures of isolated anthers and microspores has been performed. The in vitro selective systems on resistance to osmotic stress of isolated tissues of pea were developed; drought resistance regenerants have been obtained. As a result of introgressive hybridization the new varieties of lentil Vostochnaya and Chernava have been created.

Key words: pea, lentil, anther culture, regenerants, drought resistance

The grain legumes play an important role in the production of plant protein as well as in the nitrogen fixation. Nevertheless, despite of the high potential of modern varieties their yield continues to be unstable and exposed to environmental factors. The use of biotechnological methods broadens the possibilities of classic breeding and allows producing the new genetic material in a short time.

Dihaploid plants would accelerate pea breeding through decreasing of cost and time consumption for production of new varieties. Traditional methods of pea breeding allow obtaining the high level of homozygosity for a long period of selfing. Completely homozygous lines can be produced from reprogrammed microspores for a generation.

For pea haploid plant production the cultures of isolated anthers and microspores were studied. Stress treatments and nutrient media suitable for reprogramming of microspores from gametophytic to sporophytic pathway of development were determined. It was found that cold (+4°C) treatment of buds for 7-21 days stimulated transition of microspores to sporophytic development. Positive influence of heat (+35°C) stress on formation of green morphogenic and embryogenic calli was revealed. Microcalli, morphogenic and embryogenic calli were obtained in pea anther culture. Multicellular structures, microcalli and embryos were produced in culture of pea isolated microspores. The original methods of plant regeneration from anther derived morphogenic and embryogenic calli

as well as the nutrient media for a long-term continuous regeneration were elaborated. Results of this study are very important for development of new pea breeding technologies based on the use of haploid regenerants.

The in vitro selective systems which allow screening of pea on resistance to osmotic stress on the cell level and selection of the somaclonal variants resistant to water deficit were developed. As a result the pea regenerants which exceed the initial genotypes on such parameters as the water-holding capacity, the total water content and the absorbent working surface of the root system were produced. It was found that the progenies of the regenerants obtained by means of sell selection keep the high resistance to water deficit. The leaf, white flower pea genotypes demonstrate the higher resistance to osmotic stress on the callus and plant levels in comparison to the leafless (tendril) forms. The developed regenerant lines of pea significantly exceeded the initial varieties on the next valuable traits as the number of pods and seeds per plant, the seed weight per plant, the weight of 1000 kernels, the yield capacity and the protein content in the seeds. The advanced breeding lines with yield 3.5 – 4.0 t/ha have been developed

The interspecific lentil hybrids in crosses of Lens culinaris × L. orientalis and L. culinaris × L. tomentosus have been produced by means of seed and ovule in vitro culture. In the first cross the mature seeds were germinated in vitro in order to overcome the seed dormancy, in the cross with L. tomentosus the immature ovule culture technique was applied. As a result of multiple selection and backcrosses the advanced breeding lines and two new lentil varieties Vostochnaya and Chernava have been created, which have been in the State trials since the 2013 and 2016 respectively. The yield of new variety Vostochnaya in the 2016 in the field testing of the All-Russia Institute of Legumes and Groat Crops was 2.4 t/ha, and the yield of Chernava was 2.8 t/ha.

УДК 631.8

РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Волков А.И., Прохорова Л.Н.

Чувашская государственная сельскохозяйственная академия, Россия
428003, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. К. Маркса, 29
e-mail: alex-volkov@bk.ru

Получен природный регулятор роста и развития растений, способствующий повышению урожайности и улучшению качества зерна, корне- и клубнеплодов.

Ключевые слова: регулятор роста, биотехнология, Великан, эффективность.

В настоящее время создание биопрепаратов, отвечающих современным требованиям возделывания продовольственных культур, является актуальной проблемой сельскохозяйственной биотехнологии [1-6].

На основе микроорганизмов, провитамина и природных цеолитов под руководством доктора биологических наук, профессора Н.А. Кириллова разработан природный регулятор роста – «Великан» [7-8].

Лабораторные, полевые и производственные исследования показали высокую эффективность предложенного нами препарата по сравнению с имеющимися зарубежными и отечественными аналогами – природными и синтетическими регуляторами роста растений. Созданный регулятор роста в производственных условиях способствовал увеличению сбора качественной продукции клубней картофеля на 20%, корнеплодов моркови на 22% и сахарной свеклы на 18%, а также зерна кукурузы на 15%; снижению в 1,2-1,4 раза себестоимости произведенной продукции; улучшению агрофизических, агрохимических и биологических свойств выщелоченных черноземов, дерново-подзолистых и серых лесных почв Чувашской Республики [9-13].

Инновационная составляющая предлагаемого продукта заключается в решении фундаментальной и прикладной научной проблемы пролонгации действия входящих в состав композиции активных веществ, что открывает перспективы создания на его основе биопрепаратов нового поколения. Тем более, реалии сегодняшнего дня (членство в ВТО) заставляет товаропроизводителей искать и находить продукты, способные конкурировать с лучшими мировыми аналогами.

Таким образом, предлагаемая разработка имеет новизну и несет в себе принципиально новый подход в развитии данной отрасли науки, кроме того, содержит все предпосылки, необходимые для реализации данного продукта в виде конечной технологии.

Литература.

1. Волков А.И., Кириллов Н.А., Прохорова Л.Н. Повышение продуктивности земельных ресурсов Чувашии // Агро XXI. – 2014. – № 10-12. – С. 26-27.

2. Волкова Е.Н., Волков А.И., Кириллов Н.А. Влияние химических мелиорантов на плодородие дерново-подзолистых почв и урожайность зерновых культур // Аграрная Россия. – 2009. – № 5. – С. 23-26.
3. Ефремов И.В., Кириллов Н.А., Волков А.И. Эффективность природных стимуляторов роста // Сахарная свекла. – 2011. – № 8. – С. 29-31.
4. Ефремов И.В., Волков А.И., Кириллов Н.А. Агроэкономическая оценка использования природных стимуляторов при возделывании сахарной свёклы // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 2. – С. 19-23.
5. Кириллов Н.А., Волков А.И. Минимальная обработка почвы при возделывании зерновых культур в Чувашской Республике //
Земледелие. – 2008. – № 4. – С. 30-31.
6. Кириллов Н.А., Волков А.И., Прохорова Л.Н. Приемы повышения урожайности сахарной свеклы на дерново-подзолистых почвах Чувашии //
Сахарная свекла. – 2013. – № 1. – С. 26-27.
7. Кириллов Н.А., Волков А.И. Способ возделывания кукурузы на зерно в агроклиматических условиях Чувашской Республики // Патент России № 2569240. 2015. Бюл. № 32.
8. Кириллов Н.А., Волков А.И., Мачуйская Ю.С. Способ возделывания сахарной свеклы // Патент России № 2572342. 2016. Бюл. № 1.
9. Прохорова Л.Н., Волков А.И., Кириллов Н.А., Куликов Л.А. Энергетическая эффективность биопрепаратов при зерновой технологии возделывания кукурузы // Аграрная Россия. – 2015. – № 9. – С. 2-5.
10. Kirillov N.A., Volkova E.N., Volkov A.I. Efficiency of chemical ameliorants at cultivation of grain crops on sod-podzol soils of Chuvashiya // Агро XXI. – 2013. – № 01. – P 19-21.
11. Kulikov L.A., Volkov A.I., Kirillov N.A., Semenov V.G., Ershov M.A. Use of the multicomponent biostimulator and microfertilizer on crops of corn // Proceedings of the VIII International Academic Congress «Development of Countries in Asia, Africa and Europe: Past, Present and Future». Volume II. «Seoul National University Press». 2016. P. 70-74.
12. Volkov A., Grigor'eva I., Prohorova L., Kirillov N. Economic performance resource technologies // Proceedings of the XV International Academic Congress «Fundamental and Applied Studies in the Modern World». Volume XV. «Oxford University Press». 2016. P. 64-69.
13. Volkov A.I., Kirillov N.A., Prohorova L.N., Kulikov L.A. Prospects of «zero» processing of the soil at corn cultivation on grain in the Volga-Vyatka region // Agriculture. 2015. № 1. P. 3-5.

UDC 631.8

GROWTH REGULATORS IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

Volkov A.I., Prokhorova, L.N.

Chuvash state agricultural Academy, Russia
428003, Chuvash Republic, Cheboksary, str. K. Marks, 29
e-mail: alex-volkov@bk.ru

Received a natural growth regulator and plant growth, enhancing yield and improving the quality of grain, root and tuber crops.

Key words: growth regulators, biotechnology, Giant, performance.

Currently, the creation of biological products that meet the modern requirements of cultivation of food crops is an important problem of agricultural biotechnology [1-6].

On the basis of microorganisms, provitamin, and natural zeolites under the guidance of doctor of biological Sciences, professor N.A. Kirillov developed a natural growth regulator – «Velikan» [7-8].

Laboratory, field and production studies have shown high efficiency of the proposed drug compared with existing domestic and foreign analogues of natural and synthetic plant growth regulators. Created growth regulator in terms of production contributed to the increase in collection of quality products of potato tubers by 20%, root crops carrots by 22% and sugar beet by 18%, and corn by 15%; reduction in 1.2-1.4 times the cost of goods manufactured; to improve the agrophysical, agrochemical and biological properties of leached chernozem, sod-podzolic and gray forest soils of the Chuvash Republic [9-13].

Innovative aspect the proposed product is to solve fundamental and applied scientific problems of prolongation of a part of the composition of active substances, which opens prospects of creation on its basis of biological preparations of new generation. Moreover, today's realities (membership in WTO) is forcing producers to seek and find products that can compete with the best world analogues.

Thus, the proposed development is a novelty and carries with it a fundamentally new approach in the

development of this branch of science, moreover, contains all the prerequisites necessary for the implementation of this product in the form of ultimate technology.

References:
1. Волков А.И., Кириллов Н.А., Прохорова Л.Н. Повышение продуктивности земельных ресурсов Чувашии // Агро XXI. – 2014. – № 10-12. – С. 26-27.
2. Волкова Е.Н., Волков А.И., Кириллов Н.А. Влияние химических мелиорантов на плодородие дерново-подзолистых почв и урожайность зерновых культур // Аграрная Россия. – 2009. – № 5. – С. 23-26.
3. Ефремов И.В., Кириллов Н.А., Волков А.И. Эффективность природных стимуляторов роста // Сахарная свекла. – 2011. – № 8. – С. 29-31.
4. Ефремов И.В., Волков А.И., Кириллов Н.А. Агроэкономическая оценка использования природных стимуляторов при возделывании сахарной свёклы // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 2. – С. 19-23.
5. Кириллов Н.А., Волков А.И. Минимальная обработка почвы при возделывании зерновых культур в Чувашской Республике //
Земледелие. – 2008. – № 4. – С. 30-31.
6. Кириллов Н.А., Волков А.И., Прохорова Л.Н. Приемы повышения урожайности сахарной свеклы на дерново-подзолистых почвах Чувашии //
Сахарная свекла. – 2013. – № 1. – С. 26-27.
7. Кириллов Н.А., Волков А.И. Способ возделывания кукурузы на зерно в агроклиматических условиях Чувашской Республики // Патент России № 2569240. 2015. Бюл. № 32.
8. Кириллов Н.А., Волков А.И., Мачуйская Ю.С. Способ возделывания сахарной свеклы // Патент России № 2572342. 2016. Бюл. № 1.
9. Прохорова Л.Н., Волков А.И., Кириллов Н.А., Куликов Л.А. Энергетическая эффективность биопрепаратов при зерновой технологии возделывания кукурузы // Аграрная Россия. – 2015. – № 9. – С. 2-5.
10. Kirillov N.A., Volkova E.N., Volkov A.I. Efficiency of chemical ameliorants at cultivation of grain crops on sod-podzol soils of Chuvashiya // Агро XXI. – 2013. – № 01. – P 19-21.
11. Kulikov L.A., Volkov A.I., Kirillov N.A., Semenov V.G., Ershov M.A. Use of the multicomponent biostimulator and microfertilizer on crops of corn // Proceedings of the VIII International Academic Congress «Development of Countries in Asia, Africa and Europe: Past, Present and Future». Volume II. «Seoul National University Press». 2016. P. 70-74.
12. Volkov A., Grigor'eva I., Prohorova L., Kirillov N. Economic performance resource technologies // Proceedings of the XV International Academic Congress «Fundamental and Applied Studies in the Modern World». Volume XV. «Oxford University Press». 2016. P. 64-69.
13. Volkov A.I., Kirillov N.A., Prohorova L.N., Kulikov L.A. Prospects of «zero» processing of the soil at corn cultivation on grain in the Volga-Vyatka region // Agriculture. 2015. № 1. P. 3-5.

УДК 631.527:633.11

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУТАЦИОННОЙ И АЛЛОЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В СЕЛЕКЦИИ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА АДАПТИВНОСТЬ

Поползухина Н.А., Поползухин П.В., Якунина Н.А., Супонин М.С.

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Омск, Россия.
644008, Омск, Институтская площадь. 1; 644012, Омск, проспект Королева,26.
email: popolzuxinana@mail.ru

На основе использования экспериментального мутагенеза, мутантно-сортовых и аллоцитоплазматических скрещиваний, включения в гибридизацию яровых фенотипических аналогов озимых форм созданы сорта яровой мягкой пшеницы, которые включены в Государственные реестры селекционных достижений России и Республики Казахстан и внедрены в производство. Отработаны элементы технологии получения семян высших репродукций с высокими посевными и урожайными свойствами.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, сорт, семена, адаптивность, мутационная и аллоцитоплазматическая изменчивость.

В связи с задачей импортозамещения продовольствия в России, проблема увеличения производства зерна и семян высокого качества основных сельскохозяйственных культур, и в первую очередь, пшеницы,

становится весьма актуальной. Кроме того, в рамках Евразийского сотрудничества важное значение приобретает проблема экспорта зерновой продукции и внедрение инновационных селекционных достижений в сопредельные государства. Разнообразие почвенно-климатических условий регионов с необходимостью диктует ведение адаптивной селекции, что предполагает создание новых сортов сельскохозяйственных культур, «пригнанных» к конкретным условиям возделывания. В сложившихся условиях актуальным является и ведение адаптивного семеноводства, которое основывается на получении оригинальных семян новых сортов высокого качества, производстве элиты и репродукционных семян, базирующихся на агротехнологиях, разработанных применительно к конкретным условиям возделывания. Эксперименты осуществлялись на основе проведения полевых и лабораторных опытов на базе ФГБНУ «СибНИИСХ». Исследования по созданию сортов яровой мягкой пшеницы проводятся с 1980 г. Для получения нового исходного материала применялись физические (гамма-лучи) и химические супермутагены (ДМС, ЭИ, ЭМС, НДММ и др.) [1,2]. Широко использовались многоступенчатые мутантно-сортовые, межмутантные, межсортовые и аллоцитоплазматические скрещивания. Отбор ценных генотипов начинали с М1 и F2. Оценку ценных линий проводили на всех этапах селекционного процесса. Предварительное сортоиспытание организовывалось в отделе семеноводства ФГБНУ «СибНИИСХ». Экологическое испытание по типу конкурсного проводилось в ОПХ «Новоуральское», на Тарской опытной станции (Омская область), а также в условиях Республики Казахстан (ТОО «Пушкинское», Северо-Казахстанская область; ТОО НПЦЗХ им. А.И. Бараева, п. Шортанды). Агротехнические опыты закладывались по 2-м предшественникам при посеве в различные сроки и с разными нормами высева на делянках площадью 15 кв. м в 4-х кратной повторности. Все анализы, учеты и наблюдения соответствовали методике Государственной комиссии по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур.

В связи с большим почвенно-климатическим разнообразием зон растениеводства Западно-Сибирского региона и Республики Казахстан важное значение приобретает создание узкоспециализированных сортов с конкретной региональной приспособленностью. Именно в этом направлении осуществлялась наша многолетняя работа по созданию адаптивных сортов яровой мягкой пшеницы различных групп спелости. Для расширения генотипического разнообразия используемого исходного материала использовались методы экспериментального мутагенеза, межмутантные, мутантно-сортовые и аллоцитоплазматические скрещивания с включением в схемы скрещиваний яровых фенонотипических аналогов форм озимой пшеницы, а также диких сородичей пшеницы. Результатом этой работы явилось создание сортов, включенных в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в 10-м регионе Российской Федерации и в Республике Казахстан, а также испытывающихся и передаваемых на сегодняшний день на государственное сортоиспытание. Сорта яровой мягкой пшеницы, включенные в Госреестры - мутантного происхождения: Росинка (РФ), Росинка 2(РФ), Лавруша (РФ); сорта, полученные на основе мутантно-сортовых и межсортовых скрещиваний: Росинка 3 (Республика Казахстан), Катюша (РФ, Республика Казахстан), Светланка (РФ, Республика Казахстан), Серебристая (РФ), Омская золотая (РФ); сорта, созданные на основе аллоцитоплазматических скрещиваний: Мелодия (РФ, Республика Казахстан), Волошинка (РФ)(3). В 2016 г. на государственное испытание РФ передан сорт среднераннего типа Омская юбилейная (линия Г 2755/04), созданный на основе сложных многоступенчатых мутантно-сортовых скрещиваний. Площадь посева под созданными сортами на сегодняшний день составляет более 1 млн. га в Западной и Восточной Сибири, Республике Саха Якутия, в Казахстане, что является подтверждением эффективности многолетней деятельности научно-производственной системы «Сибирские семена». Вопросы адаптивного семеноводства изучаются на примере яровой мягкой пшеницы. В результате проведенных исследований выявлены оптимальные агротехнические приемы (сроки посева, нормы высева, предшественники) для получения высокой урожайности зерна ряда сортов: Катюша, Серебристая, обеспечивающие получение семян с хорошими посевными и урожайными свойствами с целью обеспечения сельхозтоваропроизводителей высококачественными оригинальными семенами и семенами высших репродукций, а значит и быстрого внедрения сортов в производство.

Литература.
1. Поползухина Н.А. Индуцированный мутагенез и гибридизация в селекции яровой мягкой пшеницы: монография. Омск, 2003. 155 с.
2. Поползухина Н.А. Создание яровой мягкой пшеницы для Западно-Сибирского региона на основе сочетания экспериментального мутагенеза и гибридизации: Автореф. дис. докт. с.-х. наук. Тюмень, 2004. 18с.
3. Поползухина Н.А., Козленко Н.П., Поползухин П.В.и др. Основные результаты работ по созданию адаптивных сортов яровой мягкой пшеницы для Западно-Сибирского региона Российской Федерации и Республики Казахстан // Труды Кубанского гос. аграрного университета. №2 (59), 2016. с. 315-320.

UDK 631.527:633.11

ALLOCATEFLOPPIES VARIABILITY IN THE BREEDING OF SPRING SOFT WHEAT ON ADAPTABILITY

Popolzuhina N.A., Popolzuhin P.V., Yakunina N.A., Suponin M.S.

Omsk state agrarian University named after P. A. Stolypin, Siberian research Institute of agriculture, Omsk, Russia. 644008, Omsk, Institutskaya ploshchad' 1; 644012, Omsk, prospekt Koroleva, 26.
email: popolzuxinana@mail.ru

Based on the use of experimental mutagenesis, the mutant-varietal and allocatefloppies crossings, be included in the hybridization of spring phenotypic analogues of winter forms created varieties of spring soft wheat, which is included in the State register of breeding achievements of Russia and the Republic of Kazakhstan and put into production. Developed elements of the technology for producing seeds of higher reproductions with high sowing and productive properties.

Key words: spring soft wheat, variety, seed, adaptability, mutational and allocatefloppies variability.

In connection with the objective of import substitution of food in Russia, the problem of increasing grain production and high quality seeds of major crops, primarily wheat, is very important. In addition, in the framework of the Eurasian cooperation is important to the problem of export of grain products and the introduction of innovative breeding achievements in a neighboring state. The variety of soil and climatic conditions of the regions with the need dictates maintenance of adaptive selection, which involves the creation of new varieties of crops that are «fitted» to the specific conditions of cultivation. In the current conditions it is urgent and the adaptive management of seed production, which is based on the receipt of original seeds of new varieties of high quality, the production of elite reproduction and seed-based agricultural technologies, developed for specific growing conditions. The experiments were carried out on the basis of field and laboratory experiments on the basis of FSBSI «SibSRIA». Research on varieties of spring wheat conducted since 1980 to obtain a new source material used, physical (gamma rays) and chemical spermatogeny (LCA, EI, EMC, HMM, etc.)[1, 2]. Widely used multi-stage mutant-varietal, megmutatni, and allocatefloppies intervarietal crossing. Selection of valuable genotypes started with M1 and F2. The value of the lines was carried out at all stages of the breeding process. Pre-testing was organized in the seed Department of the FSBSI «SibSRIA».Environmental type tests the competition was conducted in the EIF «Novoural'skoe», in Tarski experiment station (Omsk region), as well as in conditions of the Republic of Kazakhstan (LLP «Pushkinskoe», North-Kazakhstan oblast; LLP SPCGF named after A. I. Barayev, Shortandy settlement). Agrotechnical experiments were laid at 2-m predecessors when sown at different times and with different sowing rates on plots with an area of 15 sq. m in 4-fold repetition. All the tests, surveys and observations were consistent with the methodology of State variety testing Commission of agricultural crops.

Due to the large soil and climatic variety of the zones of crop in West-Siberian region and Kazakhstan, it is important to create highly specialized varieties with specific regional adaptation. In this direction was carried out our long-term work on creation of adaptive varieties of spring soft wheat of different ripeness groups. For expansion of the genotypic diversity of the used starting material was used the methods of experimental mutagenesis, megmutatni, mutant-varietal and allocatefloppies crossing with the inclusion of the scheme crosses spring fenotipicheskikh analogues of forms of winter wheat, and wild relatives of wheat. The result of this work was the creation of varieties included in the State register of breeding achievements admitted for use in the 10th region of the Russian Federation and in the Republic of Kazakhstan, as well as experience and transferred today to the state. Varieties of spring soft wheat included in the state register - mutant origin: Rosinka (RF), Rosinka 2 (RF), Lavrusha (RF); varieties of spring soft wheat included in the state register - mutant origin: Rosinka 3 (Kazakhstan), Katusha (Russia, Kazakhstan), Svetlanka (Russia, Kazakhstan), Serebristaya (Russia), Omskaya zolotaya (Russia); varieties created through crosses allocatefloppies: Melodiya (RF, Kazahstan), Voloshinka (RF). In 2016 on the state test of the Russian Federation it is planned to transfer the variety is mid type, Omskaya yubilejnaya (line G 2755/04) created on the basis of a complex multi-step mutant-varietal crosses. The acreage under established varieties to date is more than 1 million ha in West and East Siberia, the Sakha Republic Yakutia, Kazakhstan, which confirms the effectiveness of many years of research and production systems «of the Siberian seeds.» Questions adaptive seed production are studied on the example of spring wheat. The research resulted in identification of optimal agricultural practices (sowing date, seeding rate, precursors) for obtaining high grain yield of several varieties: Katyusha, Serebristaya, producing seeds with good sowing and productive properties with the goal of providing agricultural producers with high quality original seeds and seeds of high reproduction, and thus rapid adoption of varieties in production.

References:
1. Popolzuhina N.A. Induced mutagenesis and hybridization in the breeding of spring soft wheat: monograph. Omsk, 2003. 155 p.
2. Popolzuhina N.A. The creation of spring soft wheat for West-Siberian region on the basis of a combination of experimental mutagenesis and hybridization: abstract. dis. doctor. of agricultural sciences. Tyumen, 2004. 18 p.
3. Popolzuhina N.A., Kozlenko N.P., Popolzuhin P.V. The main results of works on creation of adaptive varieties of spring soft wheat for West-Siberian region of the Russian Federation and the Republic of Kazakhstan // Proceedings of Kuban state agrarian University. N 2 (59), 2016. P. 315-320.

УДК [633.1:631.53.02]:631.461:631.559

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ДЕЙСТВИЯ ДИАЗОТРОФНОЙ БАКТЕРИЗАЦИИ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Поползухина Н.А., Сейтуарова А.Д., Стрелецкий А.М., Божко А.А., Поползухин П.В., Хамова О.Ф.

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Омск, Россия.
644008, Омск, Институтская площадь. 1; 644012, Омск, проспект Королева,26.
email: popolzuxinana@mail.ru

В работе представлены результаты опытных данных по изучению действия диазотрофной бактеризации на сорта яровой мягкой пшеницы, ярового ячменя, овса посевного в агроэкологических условиях южной лесостепи Западной Сибири. Для инокуляции семян были использованы биопрепараты Ризоагрин и Азоризин. Выявлено влияние инокуляции на микробиологическую активность почвы и продуктивность зерновых культур.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, яровой ячмень, овес посевной, ассоциативная азотфиксация, диазотрофы, Ризоагрин, Азоризин, рисофера, сорт, инокуляция.

Одним из возможных путей снижения расходования азотных удобрений, а также повышения коэффициента их использования является применение микробиологических препаратов, способствующих сохранению природных экологических систем и реализации потенциальной продуктивности растений за счет адаптивных свойств.

В связи с этим актуальной задачей является изучение действия ассоциативных диазотрофов на микробиологическую активность и продуктивность зерновых культур в условиях южной лесостепи Западной Сибири.

В проведенных ранее исследованиях [1, 2] нами было выявлено влияние биопрепарата ризоагрин на продуктивность и микробиологическую активность лугово-черноземной почвы в ризосфере различных сортов яровой мягкой пшеницы.

Объект исследований - сортообразцы яровой мягкой пшеницы 3-х групп спелости; сорта ярового ячменя зернофуражного и пивоваренного назначения; сорта овса посевного двух групп: пленчатые и голозерные; почва опытного участка, представленная лугово-черноземной среднемощной среднегумусовой тяжелосуглинистой почвой с содержанием гумуса 6,4 – 6,6% (по Тюрину); pHсол – 6,5 – 6,7.

Исследования проводились на опытных полях отдела семеноводства ФГБНУ СибНИИСХ в 2011 - 2016 гг. Площадь делянок 3 м2, повторность опыта 5-ти кратная. Норма высева – 5 млн. всхожих зерен на га. Предшественник - зерновые (вторая культура после пара). В опыте три варианта: сорта без инокуляции (К) и с инокуляцией (И) ризоагрином и азоризином.

Годы проведения исследований были контрастными.

Определяющее влияние на микробиологическую активность почвы оказали условия года (28,6%), доля вклада генотипа составила 14,6%, инокуляции – 6%, различного рода взаимодействия факторов – от 12,7 до 14,0%. Численность нитрификаторов и олигонитрофилов определялась действием абиотических факторов, инокуляция ризоагрином способствовала увеличению общей численности микроорганизмов, в то же время количество бактерий на МПА и микроорганизмов на КАА в большей степени зависело от генотипических особенностей сортов.

Наибольшую долю микробного населения составляли олигонитрофиллы, бактерии на МПА и микроорганизмы на КАА. Численность большей части изученных групп микроорганизмов положительно коррелировала с содержанием в почве $N\text{-}NO_3$ и P_2O_5 и отрицательно – с K_2O.

Выявлено, что в ризосфере пшеницы преобладали минерализационные процессы, интенсивность которых увеличивалась к фазе налива зерна. Инокуляция биопрепаратом способствовала активизации этого процесса, к моменту созревания зерна этот эффект сглаживался. Наиболее интенсивно процесс минерализации проходил в ризосфере сортов Памяти Азиева и Омская 35.

Интенсивность иммобилизационных процессов снижалась к фазе налива зерна, преимущества инокуляции отмечались лишь в эту фазу развития растений. Наибольшая интенсивность иммобилизационных процессов была характерна для ризосферы сорта Памяти Азиева.

Увеличение урожайности зерна при инокуляции отмечено для сортов ярового ячменя – на 9,5 – 13,7%; овса – на 3 –12,9%. Выявлены наиболее отзывчивые на инокуляцию сортообразцы яровой мягкой пшеницы - Памяти Азиева, Дуэт, Светланка, Г2755/04 и Г540/05; ячменя – Омский 91 и Омский 95; овса – Орион и Иртыш 23. На ячмене более эффективен азоризин, на овсе – ризоагрин.

Литература.
1. Аужанова А. Д., Поползухина Н. А. Формирование продуктивности генотипов яровой мягкой пшеницы под действием биопрепарата ассоциативных диазотрофов в агроэкологических условиях южной лесостепи Западной Сибири // Омский научный вестник. – 2014 - № 1. – С. 90-92.
2. Аужанова А. Д., Поползухина Н. А., Хамова О. Ф, Падерина Е. В., Божко А. А. Микробиологическая активность лугово-черноземной почвы в зависимости от агроэкологических условий выращивания различных генотипов яровой мягкой пшеницы при инокуляции ассоциативными диазотрофами // Омский научный вестник. – 2014 - № 2. – С. 235-239.

UDK [633.1:631.53.02]:631.461:631.559

THE RESULTS OF STUDYING THE DIAZOTROPHIC BACTERIZATION ON SOIL MIRCOBIOLOGICAL ACTIVITY AND PRODUCTIVITY OF GRAIN CROPS

Popolzuhina N.A., Sejtuarova A.D., Streleckij A.M., Bozhko A.A., Popolzuhin P.V., Hamova O.F.

Omsk state agrarian University named after P. A. Stolypin, Siberian research Institute of agriculture, Omsk, Russia.
644008, Omsk, Institutskaya ploshchad' 1; 644012, Omsk, prospekt Koroleva, 26.
email: popolzuxinana@mail.ru

The paper presents the results of experimental data on studying the effect of diazotrophic bacterization on varieties of spring soft wheat, spring barley, oats, seed in agro-ecological conditions of southern forest-steppe of Western Siberia. For seed inoculation was used biopreparation Risoagrin and Azorisin. The effect of inoculation on soil microbiological activity and productivity of grain crops.

Key words: spring soft wheat, spring barley, oats seeding, associative nitrogen fixation, diazotrophy, Risoagrin, Azorizin, recover, variety, inoculation.

One of the possible ways of reducing the expenditure of nitrogen fertilizer, and improve the efficiency of their use is the application of microbiological preparations, contributing to the preservation of natural ecological systems and the realization of potential productivity of plants due to adaptive properties.

In previous studies [1, 2] we have identified the influence of biopreparation risogrin on yield and microbiological activity of meadow-Chernozem soil in the rhizosphere of different varieties of spring soft wheat.

In this regard, the urgent task is to study the associative action of diazotrophs microbiological activity and productivity of grain crops in the conditions of southern forest-steppe of Western Siberia.

Object of research - varieties of spring soft wheat breeding 3 maturity groups; varieties of spring barley fodder and malting purposes; varieties of oat two groups: hulled and naked oat; the soil of experimental plot, represented by meadow-Chernozem medium loamy srednekraevoy soil c humus content of 6.4 – 6.6 percent (according to Tyurin); the pH of Sol – 6,5 – 6,7.

The research was conducted on experimental fields of the Department of seed growing of FSBSI SibSRIA. in 2011 - 2016 Square plots of 3 m 2, repeated experience 5-fold. Seeding rate – 5 million germinating grains per hectare. Predecessor - corn (second crop after pair). Experience three options: variety without inoculation (To) and with inoculation (And) risoagrin and asorizin.

Years of research were contrasting.

A decisive influence on microbiological activity of soil provided the conditions of the year (28,6%), the share of contribution of genotype was 14.6%, inoculation 6%, and various kinds of interaction factors – from 12.7 to 14.0%.

The number of nitrifying and oligonitrophilous largely determined by abiotic factors, inoculation with risoagrin contributed to the increase in the total number of microorganisms at the same time, the number of bacteria on MPA and micro-organisms for KAA to a greater extent depended on the genotypic characteristics of the varieties.

The largest share of the microbial population oligonitrophilic, bacteria on MPA and microorganisms on CSA. A number of the most part of the studied groups of micro-organisms is positively correlated with the content in the soil N-NO_3 and P_2O_5 is negatively correlated with K_2O.

It is revealed that in the rhizosphere of wheat prevailed mineralization processes, the intensity of which increased the grain ripening phase. Inoculation with biological preparations contributed to the intensification of this process, the time of ripening of the grain, this effect is smoothed out. The most intensive process of mineralization took place in the rhizosphere of varieties in Pamyati Azieva and Omskaya 35.

The intensity of the immobilization process reduced the grain ripening phase, the benefits of inoculation were noted in this phase of plant development. The greatest intensity of the immobilization processes were characteristic of the rhizosphere of the variety of Pamyati Azieva. Pointed out that harvesting is the accumulation in the soil of mobile nutrition elements for plants, N-NO_3 to 10 mg/kg; P_2O_5 to 197 mg/kg; K_2O up to 366,7 mg/kg.

The increase in grain yield with inoculation observed for spring barley varieties – 9.5 – 13.7 per cent; oats – 3 decrease of 12.9 per cent. Identified the most responsive to the inoculation cultivars of spring wheat - in Pamyati Azieva, Dueht, Svetlanka, G2755/04, G540/05; barley – Omskij 91 and Omskij 95; oats – Orion and Irtysh 23. The more effective azorisin barley, oats effective risoagrin.

References:
1. Auzhanova A. D., Popolzuhina N. A. The formation of productivity genotypes of spring wheat under the influence of biological preparations of associative diazotrophs in agro-ecological conditions of southern forest-steppe of Western Siberia // Omsk scientific Bulletin. 2014. № 1. P. 90-92.
2. Auzhanova A. D., Popolzuhina N. A, Hamova O. F, Paderina E. V., Bozhko A. A. Microbiological activity of meadow-Chernozem soil depending on agroecological conditions of cultivation of different genotypes of spring wheat by inoculation with associative diazotrophs // Omsk scientific Bulletin. 2014. № 2. P. C. 235-239.

УДК 635. 656 : 581.5

ОЦЕНКА ГОРОХА ПОСЕВНОГО НА ВЫСОКИЙ ФОТОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ, СИМБИОТИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И АДАПТИВНОСТЬ

Поползухина Н.А., Кадермас И.Г., Озякова Е.Н.

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия.
644008, Омск, Институтская площадь. 1;
e-mail: popolzuxinana@mail.ru

На основе многолетних исследований выделены сортообразцы с высокой фотоэнергетической и симбиотической эффективностью, формирующие стабильную урожайность зерна и сбор белка с гектара. Выделен адаптивный сортообразец Л 37/03 (Омский 18), который успешно проходит Государственное сортоиспытание.

Ключевые слова: горох посевной, фотосинтез, симбиотическая азотфиксация, клубенькообразование, сорт, адаптивность, урожайность и качество зерна.

Значимость зернобобовых культур в последнее время весьма возросла. Это связано, прежде всего, с высоким содержанием белка в зерне, а также большой средообразующей ролью и симбиотической азотфиксацией, что позволяет вовлекать дополнительное поступление азота в агроценоз без применения минеральных удобрений. Наряду с выявлением оптимального сочетания факторов внешней среды, важное значение приобретает изучение сортов с интенсивной биологической фиксацией атмосферного азота и эффективной фотосинтетической деятельностью. Сорта гороха, обладающие такими качествами являются высоко адаптивными и способны формировать высокие устойчивые урожаи зерна.

В связи с этим изучение гороха посевного на высокий фотоэнергетический потенциал, симбиотическую эффективность и адаптивность является актуальной задачей современной селекции растений.

Исследования проводились на полях лаборатории селекции зернобобовых культур ФГБНУ СибНИИСХ в 2006 – 2008 и 2010 – 2012 гг. В качестве объекта исследований использовали 12 сортообразцов гороха посевного: Омский 9, Омский 7, Зауральский 1, Батрак, Таловец 55, Благовест, Демос, Омский неосыпающийся, Л 35/03 (Бонус), Л 34/01, Л 36/03, Л 37/03.

Полевые опыты закладывались в четырехкратной повторности. Агротехника – общепринятая для зоны южной лесостепи Западной Сибири.

Установлены значительные генотипические различия по формированию симбиотического аппарата. Наибольшим количеством, массой и крупностью активно функционирующих клубеньков, показателями АСП характеризовались сортообразцы гороха Благовест, Батрак, Демос и линия Л 37/03. Выявлена взаимообусловленность процессов фотосинтеза и клубенькообразования у растений гороха[1].

Установлено, что формирование ассимиляционной поверхности происходит вплоть до фазы цветения, в благоприятные годы – до фазы плодообразования. Наиболее мощный фотосинтетический аппарат у растений гороха сформировался в условиях 2010 года, наибольшей его величиной и эффективностью характеризовались сортообразцы Демос, Л 37/03, Омский 7 [2].

Продуктивность агроценозов гороха в значительной мере определялась среднесуточной температурой воздуха в период полное цветение – полное созревание, а также продолжительностью этого периода; суммой осадков в период от всходов до полного цветения. Максимальная урожайность зерна 3,72 и 3,17 т/га была отмечена в 2008 и 2010 гг. соответственно. Наибольшие прибавки урожайности были характерны для сортообразцов Омский 7, Благовест, Демос, Л 37/03. Последний из сортов отличался наибольшей стабильностью этого показателя по годам, что указывает на его высокую адаптивность.

Максимальное содержание белка в зерне и сбор белка с гектара отмечены в условиях 2008 и 2010 гг. Высокобелковое зерно и наибольший выход белка с гектара обеспечили сортообразцы Омский 9, Демос, Благовест, Л 37/03.

Таким образом, сочетание высоких показателей фотосинтеза и клубенькообразования обеспечивают генотипам наибольшую адаптивность к условиям возделывания, которая проявляется в формировании стабильной урожайности зерна и сборе белка с гектара. Наибольший интерес представляет линия Л 37/03, которая под названием горох Омский 18 с 2013 г. успешно проходит Государственное сортоиспытание.

Литература.
1. Поползухина Н.А., Озякова Е.Н., Кадермас И.Г., Асанов А.М. Оценка симбиотической и фотосинтетической эффективности зернобобовых культур в различных агроэкологических условиях // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2016. – № 3. – С. 223-231
2. Поползухина Н.А., Озякова Е.Н., Кадермас И.Г. Фотосинтез и симбиотическая азотфиксация гороха и сои (научное исследование). – Saarbrucken, Deutschland : Palmarium Academic Publishing, 2014. – 119 с.

EVALUATION ON PEA FOTOENERGETICHE CAPACITY, SYMBIOTIC EFFECTIVE AND ADAPTIVE

Popolzuhina N.A., Kadermas I.G., Ozykova E.N.

Omsk State Agrarian University, 644008, Omsk State, Institutskay ploshad, 1; 644012.
e-mail: popolzuxinana@mail.ru

Based on years of research highlighted accessions with high photo-energy and symbiotic efficiency of forming a stable grain yield and protein collection per hectare. Isolated Adaptive sortoobrazets L 37/03 (Omsk 18), which passes the state variety testing.

Key words: pea, photosynthesis, symbiotic nitrogen fixation, klubenkoobrazovanie, variety, adaptability, yield and grain quality.

The importance of legumes in recent years very increased. This is due primarily to the high protein content in the grain, as well as a great environment-forming role and symbiotic nitrogen fixation, which allows which allows to involve additional input of nitrogen to agrocenosis without the use of mineral fertilizers. Along with the identification of the optimal combination of environmental factors, it becomes important the study of varieties with intense biological fixation of atmospheric nitrogen and efficient photosynthetic activity. Varieties of peas, which have the highest potential for photovoltaic and klubenkoobrazuyuschey ability are highly adaptable and are able to generate high and stable yields of grain.

In this regard, the study of pea on a high photovoltaic potential symbiotic efficiency and adaptability is an actual problem of modern plant breeding.

Studies conducted on laboratory breeding crop legumes FGBNU SibNIISKH in 2006 - 2008 and 2010 - 2012 years.

As an object of research we used 12 pea accessions: 9 Omsk, Omsk 7, Zauralsky 1, Batrak, Talovets 55, Blagovest, Demos, Omsk Neosypayushchiisya, L 35/03 (Bonus), L 34/01, L 36/03, L 37/03.

Experiments were laid on plots of 10 m2, in four replications. Farming equipment - common for the southern forest-steppe zone of Western Siberia. Sampling to determine the symbiotic and photosynthetic parameters was carried out on the main phases of development of plants: complete germination, budding, flowering, fruit formation.

A significant genotypic differences in the formation of the symbiotic system. The greatest number, weight and fineness actively functioning nodules, figures active symbiotic potential accessions characterized peas Blagovest, Batrakt, Demos and the line L 37/03. Revealed the interdependence of the processes of photosynthesis and klubenkoobrazovaniya in pea plants.

It was found that the value of the photosynthetic apparatus of pea plants is largely determined morfobiologichesky features genotype-dressing and hydrothermal conditions of cultivation. Formation of assimilation surface is up to the flowering phase in good years - before fruiting phase. The most powerful in the photosynthetic apparatus of pea plants was formed under the conditions of 2010, most of its value and effectiveness of accessions characterized Demos, L 37/03, Omsk 7.

Productivity agrotcenozov peas to a large extent determined by the average daily temperature during full bloom - full maturation, as well as the duration of this period; amount of precipitation in the period from germination to full bloom. Maximum grain yield of 3.72 and 3.17 t / ha was recorded in 2008 and 2010 respectively. The greatest gain of the harvest, were typical of the accessions Omsk 7, Blagovest, Demos, L 37/03. The last of the variety has the highest stability of this indicator over the years, which indicates its high adaptability.

The maximum protein content in grain and protein collection per hectare recorded in the conditions of 2008 and 2010. High-protein grain and highest protein yield per hectare provided accessions Omsk 9, Demos, Blagovest, L 37/03.

Thus, the combination of high rates of photosynthesis and klubenkoobrazovaniya genotypes provide the greatest adaptability to the conditions of cultivation, which manifests itself in the formation of stable yields of grain and protein assembly hectare. Of greatest interest is the line L 37/03, which called peas Omsk 18 2013 passes the state variety testing [1,2].

References:
1. Popolzuhina N.A., Ozyakova E.N., Kadermas I.G., Asanov A.M. Evaluation of symbiotic and photosynthetic efficiency of leguminous crops in different agro-ecological conditions // Proceedings of the Kuban State Agrarian University. –2016. – № 3. – P. 223–231
2. Popolzuhina N.A., Ozyakova E.N., Kadermas I.G. Photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation of peas and soybeans (scientific research). – Saarbrucken, Deutschland : Palmarium Academic Publishing, 2014. – 119 p.

УДК 631.95:577.391; 621:039.58

ПРИМЕНЕНИЕ БИОНАНОКАПСУЛЬНЫХ ФОРМ АНТИОКСИДАНТОВ В ПТИЦЕВОДСТВЕ

Ильязов Р.Г[1], Пахомова В.М.[2]

[1] НПЦ «Липосомальные технологии», Елабуга, Т. Гиззата, 16, 423602
[2] Казанский государственный аграрный университет, Казань, Россия
Казань, ул. К. Маркса, 420015
e-mail: pahomovav@mail.ru

Разработаны бионанокапсульные формы антиоксидантов (β-каротина, витамина Е, омега-3) для повышения продуктивности и здоровья сельскохозяйственных птиц, а также улучшения качества их продукции.

Ключевые слова: бионанокапсулы, антиоксиданты, птицеводство

Разработанные ООО НПЦ «Липосомальные технологии» бионанокапсульные формы антиоксидантов (β-каротина, витамина Е, омега-3) представляют собой новые многофункциональные регуляторные препараты для сельскохозяйственных птиц и обладают высокой биодоступностью (96%). Они обеспечивают увеличение яйценоскости и качества яйца на 14 – 17%, профилактику гепатозов и их устранение на 40 – 60%, снижение расходов концентратов и зерна на 15 – 20%, увеличение репродуктивной функции птиц на 60 – 70%, сохранности поголовья на 10- 50%, рентабельности предприятия на 5,6 – 10%, улучшение конверсии корма, обмена веществ и здоровья птиц, совершенствование воспроизводства и увеличение продуктивности их маточного стада, а также значительное уменьшение затрат на медикаменты.

APPLICATION OF BIONANOCAPSULES OF ANTIOXIDANTS IN POULTRY

Ilyazov R.G., Pakhomova V.M.

Kazan State Agrarian University, Kazan, Russia
420015, Kazan, st. Karl Marx, 65
e-mail: pahomovav@mail.ru

Bionanocapsules of antioxidants (β-carotene, vitamin E, omega-3) improved poultry productivity and health , as well as the quality of poultry productions have been developed.

Key words: bionanocapsules, antioxidants, poultry

Bionanocapsules of antioxidants (β-carotene, vitamin E, omega-3) as a new multifunctional regulatory drugs for farm animals with a high bioavailability (96%) were developed by SPC «Liposomal Technology». They provide increase egg production and egg quality by 14 - 17%, steatosis prevention and elimination by 40 - 60%, reduction of costs of concentrated food and grain by 15 - 20%, increase of reproductive function of the birds by 60 - 70%, the keeping of poultry by 10- 50% , the profitability of the enterprise by 5,6 - 10%, improvement of feed conversion, bird metabolism and health, perfection of reproductivity and increase in productivity of bird ewe flock and also significant reduction in the cost of medicine.

УДК 635.657:576.8

СИМБИОТИЧЕСКАЯ АЗОТФИКСАЦИЯ НУТА В УСЛОВИЯХ ОРЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Донская М.В., Наумкина Т.С.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур», Россия, 302502, Орел, п. Стрелецкий, ул. Молодежная, д. 10, корп. 1
e-mail: nmaria_87@mail.ru

Показано, что при возделывании нута в условиях Орловской области эффективным приемом повышения показателей продуктивности является моно- и двойная инокуляция семян ризоторфином на основе специфичных азотфиксирующих бактерий Mesorhizobium ciceri и внесение в почву перед посевом грибов арбускулярной микоризы. Данные приемы улучшают рост и развитие растений нута, повышают семенную продуктивность и крупность семян.

Ключевые слова: нут, симбиоз, азотфиксация, клубеньковые бактерии, арбускулярная микориза.

Нут (Cicer arietinum L.) является важнейшей зернобобовой культурой в мировом сельскохозяйственном производстве. Российская Федерация занимает 15 место среди стран производителей нута, валовой сбор зерна в 2014 г. составил 453,7 тыс. тонн. Посевные площади под нутом в России продолжают увеличиваться, в том числе и в нетрадиционных для культуры регионах, что связано с высоким спросом на его зерно, как на внутреннем, так и на внешнем рынке.

Современные сорта нута подвержены влиянию погодно-климатических условий. В дождливые и холодные годы нут в сильной степени поражается болезнями. Инокуляция семян нута специфическими клубеньковыми бактериями Mesorhizobium ciceri позволяет увеличивать не только урожай семян, содержание белка в них, но и повысить иммунитет растений.

Исследования проводили в 2010-2015 гг. в условиях Орловской области. Почва опытного участка темно-серая лесная, среднесуглинистая. Материалом для исследований послужили 26 сортообразцов нута из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург). Схема опытов включала контроль и варианты с моно- и двойной инокуляцией семян ризоторфином (штаммы 527, 522 и 065 на основе клубеньковых бактерий Mesorhizobium ciceri) и почвенно-корневой смеси из-под микоризованной суданской травы, содержащей штаммы грибов арбускулярной микоризы (Glomus intraradices – штамм 8, Glomus fasciculatum – штамм 7).

Предпосевная инокуляция семян нута ризоторфином и внесение в почву перед посевом грибов арбускулярной микоризы повышали выживаемость растений к уборке на 5,0…9,0% по сравнению с контролем. Применение микробиологических препаратов увеличивало продолжительность вегетационного периода сортов нута на 1…7 сут., при

этом высота растений повышалась на 0,9…21,5% по сравнению с контролем. Ризоторфин и грибы АМ положительно влияли на массу сухого растения, число и массу семян с растения, массу 1000 семян. Максимальные значения массы сухого растения (+51,3% к контролю), числа семян с растения (+67,3%) и семенной продуктивности (+82,4%) отмечены у сорта Золотой юбилей в варианте с двойной инокуляцией. У всех сортов применение ризоторфина и грибов АМ увеличивало крупность семян, по сравнению с контролем, на 1,4…15,6%. Учет количества клубеньков и нитрогеназной активности в различные фазы вегетации нута показал, что у большинства сортообразцов наиболее мощный и активный симбиотический аппарат формируется к цветению – началу формирования бобов. Наибольшее число клубеньков отмечено на корнях растений сорта Краснокутский 123 в варианте с ризоторфином шт. 527 и 522 (79…94 шт.) и у сорта Аватар (71…102 шт.) в варианте с ризоторфином шт. 065. Максимальные значения показателя нитрогеназной активности (146,8-256, 16 мкг N2/раст. час) были зафиксированы в варианте с двойной инокуляцией у сортов Устойчивый 3/65, Зерноградский 36, Краснокутский 123 и у сорта Аватар.

Выделены образцы, отличающиеся высокой отзывчивостью на применение микробиологических препаратов. Они рекомендованы для использования в сопряженной селекции сорто-микробных систем на повышение эффективности симбиоза.

UDC 635.657:576.8

THE SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION OF CHICKPEA IN OREL REGION

Donskaya M.V., Naumkina T.S.

Federal state budgetary scientific institution «The all-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops», Russia, 302502, Orel, p/o Streletsky, ul. Molodezhnaya, 10, corp. 1,
e-mail: nmaria_87@mail.ru

It is shown that at cultivation of chickpea in the Orel region the effective method of increase of productivity index is mono- and double inoculation of seeds with Rhizotorphin on the basis of specific nitrogen-fixing bacteria Mesorhizobium ciceri and presowing application of arbuscular mycorrhiza fungi. The methods improve growth and development of chickpea plants, increase seed production and size of seeds.

Key words: chickpea, symbiosis, nitrogen fixation, nodule bacteria, arbuscular mycorrhiza.

Chickpea (Cicer arietinum L.) is the major legume crop in world farm-production. The Russian Federation occupies the 15 place among the countries of growers of chickpea, the grain total production in 2014 was 453,7 thousand tons. Areas under chickpea crops in Russia continue to increase, including nonconventional regions for this crop, that is linked to great demand on its grain, both on home and in foreign market.

The modern varieties of chickpea are influenced by the environmental factors. In rainy and cold years the chickpea in strong degree is attacked by diseases. Inoculation of chickpea seeds with specific nodule bacteria Mesorhizobium ciceri allows to increase not only seed yield, the protein content in them, but also to raise immunodefence of plants.

Research was performed in 2010-2015 years in Orel region. Soil of trial plot was dark-grey forest, medium loam. The 26 chickpea accessions from the VIR collection of were tested. The scheme of experiments included control and variants with mono- and double inoculation of seeds with Rhizotorphin (strains 527, 522 and 065 on the basis of nodule bacteria Mesorhizobium ciceri) and soil-root admixture from the mycorrhized Sudanese grass containing strains of arbuscular mycorrhiza fungi (Glomus intraradices - strain 8, Glomus fasciculatum - strain 7).

Presowing inoculation of chickpea seeds with Rhizotorphin and application of arbuscular mycorrhiza fungi into soil before sowing increased survival rate of plants to harvesting on 5,0 … 9,0% in comparison to control. Application of microbiologic preparations increased the vegetation period of chickpea on 1…7 days, thus the height of plants increased on 0,9 … 21,5% in comparison to control. Rhizotorphin and arbuscular mycorrhiza fungi positively influenced on weight of dry plant, number and weight of seeds per plant, mass of 1000 seeds. The maximum values of plant dry weight (+51,3% to control), number of seeds per plant (+67,3%) and seed yield (+82,4%) were registered for variety Zolotoj Yubilej in variant with double inoculation. For all the varieties application of Rhizotorphin and arbuscular mycorrhiza fungi increased size of seeds, in comparison to control, on 1,4…15,6%. The most powerful and active symbiotic apparatus (number of nodules, nitrogenase activity) is formed to beginning of pod formation of phase. The greatest number of nodules is noted on roots of plants of variety Krasnokutskij 123 in variant with Rhizotorphin str. 527 and 522 (79 … 94) and at variety Avatar (71 … 102) in variant with Rhizotorphin str. 065. The maximum values of nitrogenase activity (146,8-256, 16 mkg N2/plant. h) were registered in variant with double inoculation for varieties Ustojchivyj 3/65, Zernogradskij 36, Krasnokutskij 123 and for variety Avatar.

The accessions with high responsiveness on application of microbiologic preparations are determined. They are recommended for use in the integrated selection of plant-microbe systems for increase of the symbiosis efficacy.

УДК 637.03

РАЗРАБОТКА СПОСОБА БИОКОНВЕРСИИ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Зинина О.В., Бажина К.А.

Южно-Уральский государственный университет (Национальный исследовательский университет), Челябинск, Российская Федерация
454000, Челябинская область, Челябинск, пр. Ленина, 85
E-mail: zininaov@susu.ru

Работа направлена на исследование свойств коллагенсодержащего сырьяи разработку на основе полученных данных способа его биоконверсии. Объектами исследования являются субпродукты сельскохозяйственных животных и птицы с высоким содержанием коллагена. Биоконверсию проводили посредством обработки сырья бактериальными препаратами и закваскаими бифидобактерий и пропионовокислых бактерий.

Ключевые слова: коллаген, субпродукты, биотехнология, бифидобактерии, пропионовокислые бактерии

В работе проведено исследование свойств коллагенсодержащего сырья подвергнутого биотехнологической обработке. Объектами исследования являются субпродукты сельскохозяйственных животных и птицы с высоким содержанием коллагена – уши, губы, легкие, рубцы говяжьи, уши и желудки свиные, желудки, ноги и гребни цыплят-бройлеров. Биотехнологическую обработку проводили такими концентратами и закваскаими бифидобактерий и пропионовокислых бактерий как PropionicCulturePS–4, Probio–Tec BB–12 (компания Христиан Хансен, Дания), concentrateБифилакт-Про (Экспериментальная Биофабрика, г. Углич), концентрат «Йодпропионикс», концентрат бифидобактерий жидкий (ООО «Пропионикс», г.Москва). Выбор данных препаратов обусловлен содержанием в них бифидобактерий и пропионовокислых бактерий, обладающих высокой протеолитической активностью.

Проведены микроструктурные исследования биотехнологически обработанного сырья для выявления изменений отдельных структурных элементов. Установлено, что под воздействием бифидобактерий и пропионовокислых бактерий происходит набухание и разрыхление коллагеновых волокон на отдельные фибриллы и их фрагментация. Степень изменения гистоструктуры мало зависела от вида закваски, картина изменений структуры практически одинакова, но в большей степени выражена в образцах субпродуктов, обработанных бактериальным концентратом Бифилакт-Про. Данный факт можно объяснить более высокой протеолитической активностью концентрата, связанной с включением в состав концентрата помимо бифидобактерий и пропионовокислых бактерий молочнокислых бактерий Lactococcuslactissubsp. Diacetilactis, которые способствовали более активному росту бифидобактерий, а также дополнительному воздействию продуцированных органических кислот, прежде всего молочной и пропионовой, на структуру коллагенсодержащих субпродуктов. Экспериментально установлены параметры биотехнологической обработки по интенсивности накопления аминного азота, изменению органолептических характеристик сырья. Продолжительность биотехнологической обработки установлена при различных температурах – 36-38°С, 10-12°С, 2-4°С. В зависимости от температуры и условий подготовки бактериальных препаратов предложены способы проведения биоконверсии коллагенсодержащего сырья.

Предлагаемый способ биотехнологической обработки может быть использован для получения на основе коллагенсодержащих субпродуктов различных белковых композиций для последующего введения в состав мясопродуктов.

Работа выполнена при поддержке Правительства РФ (Постановление №211 от 16.03.2013 г.), соглашение № 02.A03.21.0011.

DEVELOPMENT OF BIOCONVERSION COLLAGEN-CONTAINING RAW MATERIALS METHODS

Zinina O.V., Bazhina K.A.

South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation
454000, Chelyabinsk region, Chelyabinsk, Lenin avenue, 85
E-mail: zininaov@susu.ru

The work is focused on study of the properties of the collagen-containing raw materials and on developing bioconversion method based on the data obtained. The objects of the study are by-products of agricultural animals and poultry with a high content of collagen. The bioconversion was carried out by processing the raw materials of bacterial preparations and starter cultures of bifid bacteria and propionic acid bacteria.

Key words: collagen, by-products, biotechnology, bifidus bacteria, propionic acid bacteria

The authors studied the properties of the collagen-containing raw materials subjected to biotechnological processing. The objects of the research are the by-products of agricultural animals and poultry with a high content of collagen - beef ears, lips, lungs, rumen, pork ears and stomachs, broiler chickens stomachs, legs and crests. Biotechnological treatment was carried out of by such concentrates and starter cultures of bifidus bacteria and propionic acid bacteria as a Propionic Culture PS-4, Probio-Tec BB-12 (company Christian Hansen, Denmark), concentrate Bifilact-Pro (Experimental Biofactory, Uglich), concentrate «Iodpropioniks», concentrate of bifidus bacterias liquid (LLC «Propioniks», Moscow). Selection of the given preparations is due to the content of bifidus bacteria and propionic acid bacteria, having high proteolytic activity, in them.

Microstructural researches of biotechnologically processed raw materials were conducted to detect changes of individual structural elements. It was found that there is swelling and loosening of collagen fibers in the individual fibrils and their fragmentation under the influence of bifidus bacteria and propionic acid bacteria. The degree of histological structure changes insignificantly depended on the type of ferments the picture of changes in the structure is almost the same, but more profound in the offal samples treated with bacterial concentrate Bifilakt-Pro. This fact can be explained by higher concentrate proteolytic activity associated with the inclusion of the bifidus bacteria and propionic acid bacteria concentrate the lactic acid bacteria Lactococcuslactis subsp. Diacetilactis, which contributed to more active growth of bifidus bacteria, as well as the additional impact produced by organic acids, especially lactic and propionic acid, the structure of the collagen by-products.

Biotech processing parameters on the intensity of accumulation of amino nitrogen, changing the organoleptic characteristics of the raw material were experimentally established. Duration of biotechnological processing was determined at various temperatures - 36-38 ° C, 10-12 ° C, 2-4 ° C. Due to temperature and conditions of bacteria concentrate preparation, the methods of conducting bioconversion of collagen-containing raw materials were suggested.

The proposed method of bioprocessing treatment can be used to produce collagen-based by-products of different protein compositions being subsequently added to meat product.

The work was supported by Act 211 Government of the Russian Federation, contract № 02.A03.21.0011.

УДК 606.3:579.6

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОБНЫХ КОНСОРЦИУМОВ ДЛЯ ДЕСТРУКЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

Скрипникова Е.В., Емельянов А.В., Скрипникова М.К.

Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, Тамбов, Россия
392000, Тамбов, Комсомольская пл., 5, корп. 2
e-mail: elena.sk@mail.ru

Разработана высокоспецифичная технология для переработки органических отходов животноводческих предприятий в эффективное вермиудобрение. Проанализирована микрофлора кишечного тракта дождевых червей, наработана биомасса определенных видов микроорганизмов, содержащихся в кишечнике Eisenia fetida, и получен микробный консорциум, обладающий способностью к биодеградации отходов животноводческих комплексов.

Ключевые слова: микробные консорциумы, переработка отходов животноводства, ферментация, вермитехнологии.

Предприятия животноводческого комплекса являются источниками мощного антропогенного воздействия на экосистемы и окружающую среду. Среди основных источников загрязнения выделяются отходы свиноводства, птицеводства и крупного рогатого скота.

В связи с этим нами проводятся исследования, направленные на оптимизацию и усовершенствование промышленных процессов переработки отходов и вторичного сырья агропромышленного комплекса методами биотехнологии как наиболее эффективными, экономичными и экологически обоснованными, на основе системного подхода, т.е. с учетом свойств перерабатываемого сырья, получаемых продуктов и применяемых технологий.

Основными путями решения этих проблем являются аэробное и анаэробное компостирование, а также переработка биологических отходов по технологии вермикультивирования. Нами была разработана высокоспецифичная технология для переработки органических отходов животноводческих предприятий в эффективное вермиудобрение.

Подобран состав микробных консорциумов, содержащих микроорганизмы-деструкторы и бактерии-активаторы, обеззараживающие исходный субстрат и уменьшающие срок его подготовки для вермикомпостирования. Для этих целей было получено специализированное микробное сообщество, содержащие микроорганизмы, обладающие высокой протеолитической, целлюлозолитической, сахаролитической активнотью.

Еще одним направлением вермитехнологий, реализуемых нами, является синтез микробных консорциумов, аналогичных составу микрофлоры кишечника дождевых червей.

Микробиоценоз кишечника природных дождевых червей Eisenia fetida – сложная саморегулирующаяся сбалансированная система симбионтных микроорганизмов-деструкторов, которые перерабатывают и реутилизируют различные органические субстраты. Этот микробиоценоз стабилен в различных условиях, даже в случае смены питательного субстрата.

Нами была проанализирована микрофлора кишечного тракта дождевых червей Eisenia fetida. Были выделены микроорганизмы, обладающие способностью к аммонификации, нитрификации, азотофиксации, разложению углеводов и мобилизации органических фосфатов, а также некоторые виды грибов.

Нами было отработано культивирование и наработана биомасса определенных видов микроорганизмов в биореакторах с учетом возможности масштабирования процессов и получен микробный консорциум, представляющий собой многовидовую, полифункциональную композицию, в состав которой входит смесь суспензий живых эффективных микроорганизмов, выделенных из кишечника Eisenia fetida.

Этот консорциум обладает усиленной и ускоренной способностью к биодеградации отходов животноводческих комплексов, деструкции мочевой кислоты и утилизации аммиака, способностью к подавлению патогенных микроорганизмов за счет синтеза антибиотических и других биологически активных веществ.

В результате применения микробного консорциума значительно сокращается срок переработки навоза. Также внесение препарата в субстрат повышает приживаемость популяции червей в новом субстрате, что позволит решить основные проблемы биокомпостирования и вермикультивирования.

APPLICATION OF MICROBIC COMMUNITIES FOR DESTRUCTION OF ORGANIC WASTE

Skripnikova E.V., Emelyanov A.V., Skripnikova M.K.

Tambov State University after G.R. Derzhavina, Tambov, Russia
392000, Tambov, Komsomolskaya area., 5/2
e-mail: elena.sk@mail.ru

The high-specific technology is developed for processing of organic waste of the livestock enterprises in effective fertilizer. The microflora from the earthworm digestive tract is analyzed, biomass of the certain species of microorganisms containing in Eisenia fetida intestines is acquired and the microbial community possessing ability to biodegradation of waste of livestock complexes is received.

Key words: microbial community, processing of waste of animal husbandry, fermentation, worm technology.

The enterprises of livestock complex are sources of powerful anthropogenic impact on ecosystems and environment. Waste of pig-breeding, poultry farming and cattle are distinguished from the main sources of pollution.

In this regard we conduct the researches directed on optimization and improvement of industrial processes of processing of waste and secondary raw materials of agro-industrial complex by biotechnology methods as the

most effective, economic and ecologically reasonable, on the basis of system approach, i.e. taking into account properties of the processed raw materials, the received products and the applied technologies.

The main solutions of these problems are the aerobic and anaerobic composting, and also processing of biological waste on technology of worm technology. We have developed high-specific technology for processing of organic waste of the livestock enterprises in effective fertilizer.

The structure of the microbial community containing the microorganisms destructors and bacteria activators disinfecting initial substrate and reducing the term of its preparation for worm composting is picked up. For these purposes the specialized microbial community, the containing microorganisms possessing high proteolytic and cellulolytic activity have been received.

One more direction of the worm technology realized by us is synthesis of the microbial community similar to composition of intestinal microflora of earthworms.

The microbiocenosis of intestines of natural earthworms of Eisenia fetida - the complex self-regulating balanced system of symbiotic microorganisms destructors which overwork by different organic substrates. This microbiocenosis is stable in different conditions, even in case of change of nutritious substrate.

We have analyzed microflora of intestinal path of earthworms of Eisenia fetida. The microorganisms possessing ability to ammonification, nitrification, nitrogen fixation, decomposition of carbohydrates and mobilization of organic phosphates, and also some species of mushrooms have been allocated.

We have fulfilled cultivation and biomass of certain species of microorganisms in bioreactors taking into account possibility of scaling of processes is acquired and the microbial community representing multispecific, multifunctional composition which part mix of suspensions of the live effective microorganisms allocated from Eisenia fetida intestines is received.

This consortium possesses the increased and accelerated ability to biodegradation of waste of livestock complexes, destruction of uric acid and utilization of ammonia, ability to suppression of pathogenic microorganisms due to synthesis of antibiotic and other biologically active agents.

As a result of application of microbial community manure processing term is considerably reduced. Also entering of preparation into substrate increases survival of population of worms in new substrate that will allow to solve the main problems of biocomposting and worm technology.

УДК 581. 522.4

УСТОЙЧИВОСТЬ К ДЕЙСТВИЮ ИОНОВ МЕДИ РАННЕСПЕЛЫХ СОРТОВ SOLANUM TUBEROSUM L.

Ефимова М.В., Головацкая И.Ф., Коломейчук Л.В., Бойко Е.В., Мурган О.К., Малофий М.К., Видершпан А.Н., Медведева Ю.В., Плюснин И.Н., Захарова Н.А., Вебер Е.И., Симон Е.В., Кузнецов Вл.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36.
E-mail: stevmv555@gmail.com

Установлена сортоспецифичность физиологических реакций ранних сортов картофеля Жуковский и Red Scarlett на действие избытка ионов меди.

Ключевые слова: микроклоны картофеля, осмотический и окислительный стресс

Медь является микроэлементом, в малых дозах жизненно важным для нормального роста и развития растений, тогда как в высоких концентрациях она оказывает токсическое и даже летальное действие на растения (Куликова и др., 2015). Согласно «Постановлению Президента России от 21.07.2016 г. №350» картофелеводство относят к одному из приоритетных направлений фундаментальных и поисковых научных исследований в области сельского хозяйства. Несмотря на обилие сортов картофеля, крайне важно выявлять перспективные для промышленного выращивания генотипы, сочетающие в себе высокую устойчивость к тяжелым металлам с низким уровнем их аккумуляции.

Нами исследовано влияние ионов меди в диапазоне концентраций от 10 до 200 мкМ на рост и развитие микроклонов S. tuberosum раннеспелых сортов Жуковский и Red Scarlett, районированных в Сибири, в условиях гидропоники. Подробное описание условий проведения эксперимента приведено в статье М.В. Ефимовой и др. (2016).

Степень устойчивости растений S. tuberosum оценивали по ростовым и физиологическим показателям.

Учитывали накопление сырой и сухой биомассы, линейные размеры побега и корня, площадь листовой поверхности, количество столонов, содержание фотосинтетических пигментов, накопление ионов меди в надземных и подземных частях растений, интенсивность осмотического и окислительного стрессов.

Наибольшую чувствительность к негативному влиянию меди проявлял сорт Жуковский; при 25 мкМ длина корня и количество столонов уменьшались на 20-25%, содержание фотосинтетических пигментов снижалось. Увеличение концентрации CuSO4 до 50 мкМ приводило к снижению продуктивности (количество столонов, площадь листовой поверхности, сырая и сухая биомасса растений) растений максимальный негативный эффект был отмечен для сорта Жуковский. Показана органоспецифичность ответов на действие тяжелого металла. Минимальные колебания содержания пролина при стрессе были обнаружены в корнях растений, максимальные - в листьях. Увеличение содержания пролина в корнях растений картофеля сорта Red Scarlett не превышало двухкратного вне зависимости от концентрации меди; содержание пролина в корневой системе растений картофеля сорта Жуковский не изменялось.

Таким образом, нами впервые выявлены генотипические особенности устойчивости микроклонов раннеспелых сортов картофеля к широкому диапазону концентрации ионов меди.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 16-16-04057.

Литература.
Куликова А.Л., Кузнецова Н.А., Бурмистрова Н.А. Изменение ростовых и физиологических параметров у проростков сои в ответ на токсическое действие меди // Физиология растений - 2015. - Т. 62, № 4. - С. 488-498.
Ефимова М.В., Головацкая И.Ф., Коломейчук Л.В. и др. // Солеустойчивость различных генотипов Solanum tuberosum L.: Сборник докл. VI Всерос. Симпоз. «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (Москва, 16-21 ноября 2016 г.). - Москва, 2016. - С. 230-232.

UDC 581. 522.4

RESISTANT OF EARLY RIPENING VARIETY SOLANUM TUBEROSUM L. TO COPPER IONS

Efimova M.V., Golovatskaya I.F., Kolomeychuk L.V., Boyko E.V., Murgan O.K., Malofiy M.K., Vidershpan A.N., Medvedeva Y.V., Plusnin A.N., Zacharova N.A., Veber E.I., Simon E.V., Kuznetsov V.V.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation
634050, Tomsk, Lenin av., 36.
E-mail: stevmv555@gmail.com

A specificity of physiological reactions of early potato varieties (cv Zhukovsky and cv Red Scarlett) to the effects of an excess of copper ions has been discovered.

Key words: potato microclones, osmotic and oxidative stress

Copper is a trace element which has a vital importance for stable plant growth and development (in small doses), while at high concentrations it has toxic and even lethal effects on plants (Kulikova et al., 2015). According to the «Decree of the President of Russia from 07.21.2016 of №350» potato farming is one of the priority directions of fundamental and exploratory research in agricultural field. Despite numerous potato varieties, it is critically important to identify perspective genotypes which combine high resistance to heavy metals with a low level of its accumulation for commercial cultivation.

Early ripening varieties of S. tuberosum - cv Zhukovsky and cv Red Scarlett, zoned in the central regions of Russia and in Siberia, have been studied. The influence of CuSO4 solution (10 to 200 μM) to growth and development of potato microclones under the conditions of hydroponic has been investigated. Detailed description of the experimental conditions is given in the article by M. Efimova et al. (2016). The degree of S. tuberosum plants resistance was evaluated by growth and physiological indicators. An accumulation of wet and dry biomass, linear dimensions of shoot and root, leaf area, number of stolons, photosynthetic pigments content, accumulation of copper ions in the above-ground and underground parts of plants, an intensity of the osmotic and oxidative stress have been taken into account.

The Zhukovsky variety has showed the greatest sensitivity to the negative impact of copper; at 25 μm root length and number of stolons have decreased by 20-25%, the content of photosynthetic pigments has declined. An increasing of CuSO4 concentration to 50 μM led to lower productivity (number of stolons, leaf surface area, wet and dry plants biomass) of plants. The maximum negative effect was noted for the Zhukovsky variety. The organ specific responses to heavy metal action was showed. Minimal fluctuations of proline content in the roots of plants

under stress conditions were found, the maximum - in the leaves. The increased proline content in the roots of potato plants of Red Scarlett varieties, regardless of the copper concentration, did not exceed a two-fold increase; proline content in the root system of the Zhukovsky varieties potato plants has not been changed.

As can be seen from the above, we were the first who identified genotypic characteristics of stability of microclones of early maturing potatoes varieties to a wide range of the copper ions concentration.

The investigation was performed with the financial support by the Russian Science Foundation (project no. 16-16-04057).

References:
Kulikova A.L., Kuznetsova N.A., Burmistrova N.A. Change in growth and physiological parameters in soybean seedlings in response to toxic action of copper // Russian Journal of Plant Physiology -2015. - Vol. 62, № 4. - C. 455-464.
Efimova M.V., Golovatskaya I.F., Kolomeychuk L.V., and etc. // Salt tolerance of different genotypes of Solanum tuberosum L.: Compilation of the reports. VI All-Russian Symposium «Transgenic plants: the technology of biological properties, applications, biosafety» (Moscow, November 16-21, 2016). - Moscow, 2016. - C. 230-232.

УДК 661.728.855

СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С АРОМАТИЧЕСКИМИ ОКСИКИСЛОТАМИ ИЗ ОТХОДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Протопопов А.В., Бобровская С.А., Ворошилова А.В., Клевцова М.В.

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия, 656038, пр. Ленина, 46
E-mail: a_protopopov@mail.ru

Получены сложных эфиров целлюлозы с орто- и метаоксибензойными кислотами в среде тионилхлорида путем ацилирования плодовой оболочки овса.

Ключевые слова: сложные эфиры целлюлозы, ацилирование, переработка отходов растительного сырья.

В данной работе исследуется химическая модификация предгидролизованной оболочки овса (лигно-целлюлозный материал) мета- и орто-оксибензойной кислотами с целью получения продуктов, пригодных для дальнейшей переработки в различных сферах строительной, энергетической промышленности, в производстве изделий из пластмасс и эластомеров, а также в медицине и экологии. Эффективность данного исследования заключается в том, что получение сложных эфиров целлюлозы позволит вовлечь получаемые отходы переработки овса в производственный цикл получения материалов различного назначения.

Для расчета количества прореагировавших гидроксильных групп в целлюлозе определялось содержание связанных кислот методом потенциометрического титрования. На основании содержания связанной кислоты в исследуемых продуктах была вычислена степень замещения в сложных эфирах целлюлозы.

Таблица 1. Степень замещения в продуктах взаимодействия предгидролизованной оболочки овса

Время, ч	Температура синтеза, °С							
	25	35	45	55	25	35	45	55
	Степень замещения по о-оксибензойной кислоте				Степень замещения по м-оксибензойной кислоте			
1	0,63	0,80	0,85	0,91	1,09	1,30	1,43	1,64
2	0,64	0,83	0,95	1,03	1,19	1,58	1,63	1,72
3	0,67	0,88	1,06	1,21	1,44	1,61	1,75	2,12
5	0,71	1,02	1,16	1,56	2,13	2,35	2,48	2,62

С увеличением продолжительности и с повышением температуры синтеза степень превращения в полученных продуктах увеличивается. Уже при продолжительности синтеза 1 час получается однозамещенный сложный эфир целлюлозы. При увеличении продолжительности до 5 часов позволяет получить полуторазамещенный сложный эфир целлюлозы по о-оксибензойной кислоте и более чем двухзамещенный сложный эфир по м-оксибензойной кислоте.

Исследования методом инфракрасной спектроскопии подтверждают образование сложноэфирной связи (полоса поглощения в области 1730-1750 см-1) в полученных продуктах.

Литература.
1. Протопопов А.В., Бобровская С.А., Ворошилова А.В., Клевцова М.В. Сложные эфиры целлюлозы с ароматическими оксикислотами из плодовой оболочки овса // Ползуновский вестник. – Барнаул: Изд-во Алт ГТУ, - 2016, - № 2 - С. 171-176.

UDC 661.728.855

CELLULOSE ESTER WITH AROMATIC HYDROXY ACIDS FROM WASTE PLANT RAW

Protopopov A.V., Bobrovskaya S.A., Voroshilova A.V., Klevtsova M.V.

Polzunov Altai State Technical University.
Barnaul, Russia, 656038, Lenin avenue, 46
E-mail: a_protopopov@mail.ru

Cellulose esters derived from acids metaoksibenzoynymi ortho- and thionyl chloride in a medium by acylation oat fruit shell.

Key words: cellulose esters, acylation, vegetable processing of waste raw material.

In this paper we investigate the chemical modification oats shell (ligno-cellulosic material) meta- and ortho-hydroxybenzoic acid in order to obtain products suitable for further processing in various areas of construction, energy industry, in the manufacture of plastics and elastomers, as well as medicine and ecology. The effectiveness of this study lies in the fact that the production of cellulose esters obtained will allow to involve oats processing waste in the production cycle to obtain materials for various purposes.

To calculate the amount of unreacted hydroxyl group in cellulose content was determined by potentiometric acid related titration. On the basis of the bound acid in the studied products the degree of substitution in cellulose ester was calculated.

Table 1. The degree of substitution in products shell interaction oats

Duration, h	Temperature of synthesis, °C							
	25	35	45	55	25	35	45	55
	The degree of substitution for o-hydroxybenzoic acid				The degree of substitution for m-hydroxybenzoic acid			
1	0,63	0,80	0,85	0,91	1,09	1,30	1,43	1,64
2	0,64	0,83	0,95	1,03	1,19	1,58	1,63	1,72
3	0,67	0,88	1,06	1,21	1,44	1,61	1,75	2,12
5	0,71	1,02	1,16	1,56	2,13	2,35	2,48	2,62

With increasing the duration of the synthesis and with increasing temperature the degree of conversion of synthesis products obtained in increased. Already during the duration of the synthesis of 1 hour of a monosubstituted cellulose ester. By increasing duration to 5 clock; you can get 1,5 substituted cellulose ester by o-hydroxybenzoic acid, and more than disubstituted by ester m-hydroxybenzoic acid.

Studies by infrared spectroscopy confirmed the formation of the ester bond (absorption band at 1730-1750 cm-1) in the obtained products.

References:
1. Protopopov A.V., Bobrovskaya S.A., Voroshilov A.V., Klevtsova M.V. Cellulose esters with aromatic hydroxy acids from fruit shell oats // Polzunovsky Vestnik. - Barnaul: Publishing House Alt STU, - 2016, - № 2 - pp 171-176.

УДК 661.728.855

ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВАТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ ПУТЕМ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ТОРФА

Протопопов А.В., Бобровская С.А., Ворошилова А.В.

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия, 656038, пр. Ленина, 46. E-mail: a_protopopov@mail.ru

Получены биологически активные производные торфа, представляющие собой продукты его взаимодействия с азотной кислотой, предлагаемые к использованию в сельском хозяйстве в качестве удобрений и ростостимулирующих добавок.
Ключевые слова: химическая модификация торфа, регуляторы роста растительного сырья.

Торфяные гуминовые удобрения и препараты на их основе ускоряют рост растений, сокращают период их развития, повышают урожайность, активизируют процессы синтеза белковых и фосфоросодержащих соединений, углеводов, дыхания и размножения клеток, накопления биомассы за счет интенсивного использования питательных элементов; положительно влияют на состояние животных, увеличивая их привесы и плодовитость, оказывают значительный эффект на размножение и рост белковых дрожжей. Многосторонняя физиологическая активность препаратов на основе органического вещества торфа позволяет успешно использовать их в самых различных областях: сельское хозяйство, животноводство, рыбоводство, птицеводство, медицина, техника. Основу органического вещества торфа составляют гуминовые кислоты, в которых сконцентрирован широкий набор индивидуальных соединений. Их природное сочетание и определяет высокую физиологическую активность и сорбционную способность по отношению к различным металлам исходных торфов и препаратов на основе торфа.

Химическая модификация торфа позволяет ввести новые функциональные группы и получить качественно новые материалы с улучшенными по сравнению с исходным сырьем свойствами. Предлагаемый нами способ химической модификации позволяет ввести нитрогруппу как в гуминовые кислоты, так и в углеводный остаток торфа, что, в свою очередь, усилит ростостимулирующие свойства и биологическую активность компонентов торфа.

Нами проведено нитрование торфа смесью азотной и серной кислот. В процессе нитрования был получен твердый остаток и жидкая часть с растворенными нитропроизводными гуминовых кислот. Анализ методом ИК-спектроскопии показал образование нитропроизводных как в твердом остатке, так и в растворимой части.

ИК-спектры исследуемых образцов модифицированного торфа содержат ряд характерных полос поглощения, отличающих их от исходного торфа. В ИК- спектрах модифицированного торфа наблюдается интенсивная полоса поглощения в области 1620-1700 см$^{-1}$, относящаяся к асимметричным колебаниям групп NO_2 (в связи O-NO_2). Полоса поглощения около 1270-1280 см$^{-1}$ связана с симметричными валентными колебаниями NO_2 и интенсивность ее зависит от степени замещения синтезированных продуктов, полоса поглощения при 812-818 см$^{-1}$ соответствует валентным колебаниям нитроэфирных групп.

UDC 661.728.855

THE ACTIVATOR PLANT GROWTH BY CHEMICAL MODIFICATION OF PEAT

Protopopov A.V., Bobrovskaya S.A., Voroshilova A.V.

Polzunov Altai State Technical University.
Barnaul, Russia, 656038, Lenin avenue, 46
E-mail: a_protopopov@mail.ru

Biologically active derivatives of peat was obtained, is a product of its interaction with nitric acid, proposed for use in agriculture as fertilizers and growth promoting supplements.

Key words: chemical modification of peat, growth regulators raw material of plant.

Peat humic fertilizer and their preparations accelerate plant growth, reduce the period of their development, increase productivity, stimulate the processes of synthesis of protein and phosphorus-containing compounds, carbohydrates, respiration and reproduction of cells, biomass accumulation due to the intensive use of nutrients; positive effect on the condition of the animals, increasing their weight gain and fertility, have a significant effect on reproduction and growth of the yeast protein. Multilateral physiological activity of preparations based on organic matter of peat can successfully use them in various fields of agriculture, animal husbandry, fish farming, poultry farming, medicine, engineering. The basis of the organic substance comprise peat humic acid, which is concentrated in a wide range of individual compounds. Their natural combination and determines the high physiological activity,

and sorption capacity with respect to different metals raw peat and peat-based preparations.

Chemical modification enables peat introduce new functional groups and obtain a qualitatively new materials with improved compared to the properties of the feedstock. Our proposed method allows chemical modification to introduce a nitro group in the humic acid and a carbohydrate residue of peat, which in turn will enhance growth promoting biological activity and properties of peat components.

We carried out the nitration of peat mixture of nitric and sulfuric acids. In the process of nitration was obtained solid residue and liquid part with the dissolved nitroderivatives humic acids. Analysis by IR spectroscopy showed the formation of nitro derivatives in the solid residue, and the soluble part.

IR spectra of the investigated modified peat samples contain a number of characteristic absorption bands that distinguish them from the original peat. The IR spectra of the modified peat observed intense absorption band at 1620-1700 cm^{-1} related to asymmetric vibrations of NO_2 groups (the O-NO_2). The absorption band around 1270-1280 cm^{-1} is associated with symmetric stretching vibrations of NO_2 and its intensity depends on the degree of substitution of the synthesized product, the absorption band at 812-818 cm^{-1} corresponds to the stretching vibrations of nitrate ester groups.

УДК 604

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА НА КОНИДИЕОБРАЗОВАНИЕ МИКРОМИЦЕТА TRICHODERMA ASPERELLUM OPF-19 В УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.

Зиганшин Д.Д., Захаров В.В, Сироткин А.С., Егоршина А.А., Лукьянцев М.А.

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68
e-mail: ziganshind@gmail.com

Изучена зависимость процесса конидиеобразования Trichoderma asperellum OPF-19 от использования различных источников углерода. Показано, что источник углерода и энергии достоверно влияет на способность культуры T. asperellum OPF-19 к конидиеобразованию и интенсивность этого процесса.

Ключевые слова: Trichoderma, конидиеобразование, глубинное культивирование

Грибы, относящиеся к роду Trichoderma, уже не одно десятилетие являются одним из центральных объектов сельскохозяйственной биотехнологии, поскольку эти микромицеты обладают рядом полезных свойств, позволяющих эффективно использовать их для обработки растений, посевного материала и почвы с целью борьбы с фитопатогенными микроорганизмами и повышения урожайности широкого спектра возделываемых культур. Существующие биологические препараты, созданные на основе различных видов и штаммов Trichoderma, в основном имеют сухую препаративную форму, например, Трихоцин СП, Глиокладин СП, Стернифаг СП [1]. Для получения культуральной жидкости, которую можно было бы использовать в качестве биопрепарата, после максимального накопления биомассы грибом необходимо индуцировать процесс образования конидий и/или хламидоспор, совмещенный с автолизом мицелия, и добиваться максимального конидиеобразования.

Формирование конидий у различных представителей рода Trichoderma хорошо изучено при культивировании их на плотных питательных средах, при этом известно, что индукторы этого процесса могут иметь различную эффективность в зависимости от условий культивирования [2]. Целью нашей работы было выявление влияния основных компонентов питательной среды (источников углерода и азота) на образование конидий грибом T. asperellum OPF-19 при культивировании на жидкой питательной среде.

Глубинное культивирование гриба осуществляли в качалочных колбах объемом 750 мл со 125 мл среды на качалке со скоростью перемешивания 200 об/мин при температуре 27°C в течение 96 часов. Культивирование T. asperellum OPF-19 осуществляли в среде Чапека-Докса с 0,7% дрожжевым экстрактом при использовании следующих источников углерода: глюкоза, сахароза, фруктоза, глицерин, крахмал, патока крахмальная карамельная, патока мальтозная солодовая, патока мальтозная ржаная (основной компонент патоки - мальтоза).

Показано, что при использовании в качестве источника углерода и энергии глюкозы и патоки крахмальной карамельной конидиеобразование в культуре гриба полностью подавлено. При использовании глицерина, крахмала и патоки мальтозной солодовой в среде обнаруживались лишь единичные конидии. Сахароза и

патока мальтозная ржаная позволили получить культуру с титром конидий, подсчитанном в камере Горяева, около 1×10^4 конидий/мл. Эффективнее всего оказалось использование в качестве источника углерода и энергии фруктозы, которая способствовала получению культуры с титром конидий 3×10^6 конидий/мл.

Таким образом, показано, что источник углерода и энергии достоверно влияет на способность культуры T. asperellum OPF-19 к конидиеобразованию и интенсивность этого процесса. При этом, в отсутствие каких-либо других индукторов этого процесса, возможно получение жидкой культуры гриба с титром конидий 3×10^6 конидий/мл.

Литература.
1. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации // Москва: Министерство сельского хозяйства РФ, 2013.
2. Steyaert, J. M., Weld, R. J. & Stewart, A. (2010). Isolate-specific conidiation in Trichoderma in response to different nitrogen sources. Fungal Biol 114, 179–188.

UDK 604

INFLUENCE OF VARIOUS SOURCES OF CARBON ON A MICROMYCETES TRICHODERMA ASPERELLUM OPF-19 CONIDIATION IN THE CONDITIONS OF SUBMERGED CULTIVATION.

Ziganshin D. D., Zakharov V.V, Sirotkin A.S, Egorshina A.A., Lukyantsev M. A.

Kazan national research technological university, Kazan, Russia.
420015, Kazan, K. Marks str, 68
e-mail: ziganshind@gmail.com

Dependence of process of a micromycetes Trichoderma asperellum OPF-19 conidiation from use of various sources of carbon has been studied. It is shown that the carbon and energy source authentically influences ability of culture of T. asperellum OPF-19 to a conidiation and intensity of this process.

Key words: Trichoderma, conidiation, submerged cultivation

The fungus relating to the Trichoderma species, any more one decade are one of the central objects of agricultural biotechnology as these micromycetes possess a number of the useful properties allowing effectively to use them for processing of plants, a sowing material and the soil for the purpose of fight against phytopathogenic microorganisms and increase of productivity of a wide range of cultivated cultures. The existing biological preparations created on the basis of different types and strains of Trichoderma, generally have a dry formulation, for example, Trikhotsin SP, Gliokladin SP, Sternifag SP [1]. For receiving cultural liquid which could be used as a biological product, after the maximum accumulation of a biomass by a mushroom it is necessary to induce process of formation of conidias and/or a hlamidospor combined with mycelium autolysis, and to achieve the maximum conidiation.

Formation of conidias at various representatives of the Trichoderma species is well studied at their cultivation on dense nutrient mediums, thus it is known that inductors of this process can have various efficiency depending on conditions of cultivation [2]. Identification of influence of the main components of a nutrient medium (carbon and nitrogen sources) on formation of conidias by Trichoderma asperellum OPF-19 fungus at cultivation on a liquid nutrient medium was the purpose of our work.

Submerged cultivation of a fungus carried out in Erlenmeyer flask in volume of 750 ml with 125 ml of the medium on a rocking chair with speed of hashing of 200 rpm at temperature 27°C within 96 hours. T. asperellum OPF-19 cultivation carried out among Czapek-Dox medium with 0,7% yeast extract when using the following sources of carbon: glucose, sucrose, fructose, glycerine, starch, treacle starched caramel, treacle maltoze malt, treacle maltoze rye (the main component of treacle - a maltose).

It is shown that when using as a source of carbon and energy of glucose and treacle starched caramel the conidiation in culture of a fungus is completely suppressed. Besides, the mycelium also has not been more or less evenly distributed in volume of a nutrient medium, but represented a dense clot. When using glycerine, starch and treacle maltoze malt in the medium individual conidia, and on a mycelium - conidiofores were found, but as a whole sporulation level in culture has appeared the lowest. Sucrose and treacle the maltoze rye have allowed to receive culture with a caption of the conidia, counted up in Goryaev's chamber, near 1×10^4 conidia/ml, but conidiofores met is only individual. Most effective there was use as a source of carbon and energy of fructose which promoted receiving culture with a caption of conidia 3×10^6 conidia/ml.

Thus, it is shown that the carbon and energy source authentically influences ability of culture of T. asperellum OPF-19 to a conidiation and intensity of this process. Thus, for lack of any other inductors of this process, receiving liquid culture of a fungus with a caption of conidia 3×10^6 conidia/ml is possible.

References:
1. The state catalogue of pesticides and the agrochemicals allowed for use in the territory of the Russian Federation// Moscow: Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 2013.
2. Steyaert, J. M., Weld, R. J. & Stewart, A. (2010). Isolate-specific conidiation in Trichoderma in response to different nitrogen sources. Fungal Biol 114, 179–188.

УДК 663.1

ПЕРЕРАБОТКА РАСТИТЕЛЬНЫХ ОТХОДОВ КАК ОСНОВА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА

Понкратов А.С., Ананьева О. В., Валеева Р.Т., Понкратова С.А., Мухачев С.Г.

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия
420015, Казань, ул. К. Маркса, 68. E-mail: studchemcyb@gmail.com

Рост использования объемов крахмало- и целлюлозосодержащего растительного сырья требует усовершенствования существующих и разработки новых технологий по их переработке и утилизации с целью обеспечения устойчивого развития сельского хозяйства, решения вопросов экологической и экономической безопасности АПК.

Ключевые слова: переработка растительного сырья; кислотный гидролиз; ферментолиз; биотопливо.

Использование сырьевой базы РФ с каждым годом увеличивается. Объем отходов агропромышленного комплекса и деревоперерабатывающей промышленности растет. Эти отходы – ценное сырье для создания отечественного промышленного потенциала по производству продуктов с помощью биотехнологических методов.

В лаборатории инженерных проблем биотехнологии КНИТУ ведутся экспериментальные исследования процессов гидролиза и ферментолиза крахмало- и целлюлозосодержащего растительного сырья с получением гидролизатов растительных материалов. Гидролизаты в дальнейшем могут быть использованы как компоненты сред при получении таких ценных продуктов, как биотопливо, кормовые дрожжи, ксилит, фурфурол, уксусная, масляная кислоты и др.

Процессы гидролиза растительного сырья – соломы, кукурузных кочерыжек, свекловичного жома – проводятся с использованием различных минеральных кислот при варьировании технологических параметров (температуры 150-190ºС, концентрации гидролизующих агентов 0,5-4% масс.) с целью получения максимальных значений редуцирующих веществ в полученных гидролизатах (более 5% масс.).

Полученные результаты проведенных экспериментальных исследований[1] свидетельствуют о возможности использования дешевых и перспективных вторичных сырьевых ресурсов и отходов агропромышленного комплекса в качестве углеводного питания в процессах культивирования спиртовых дрожжей с дальнейшим получением топливных спиртов и в процессах получения других продуктов.

Литература.
1. Валеева Р.Т., Шурбина М.Ю., Нуретдинова Э.И., Понкратов А.С., Красильникова О.В. Сравнительная оценка процессов роста спиртовых и кормовых дрожжей на сернокислотных и сернистокислотных гидролизатах растительного сырья// Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18, №. 21. – С. 152-154.

UDC 663.1

RECYCLING OF RAW PLANT WASTE AS THE ENVIRONMENTAL SAFETY BASE OF THE AGRICULTURAL SECTOR

Ponkratov A.S., Ananeva O.V., Valeeva R.T., Ponkratova S.A., Mukhachev S.G.

Kazan National Research Technological University, Department of Chemical Cybernetics, Kazan, Russia
Karl-Marx-Str. 68, 420015
e-mail: studchemcyb @gmail.com

Increase of use of the volume of starch and cellulose-containing vegetable raw materials requires improvement of existing technologies and development of new technologies for the recycling, in order to ensure sustainable agricultural development and resolving the issues of the environmental and economic security of the agricultural sector.

Key words: recycling of raw plant waste, acidic hydrolysis, fermentolysis, biofuel.

The usage of raw plant resources is increasing every year in Russian Federation. The volume of waste in the agricultural sector and wood processing industry is also increasing. The waste is valuable resource for production with biotechnology methods.

The hydrolysis and fermentolysis experiments of starch and cellulose-containing vegetable raw materials are carried out in the engineering problems laboratory in the Kazan National Research Technological University. Obtained plant raw materials hydrolysates can be used as medium components in the production processes of biofuel, feeding yeast, xylitol, furfurol, acetic and oleic acids, and others products.

The starch and cellulose-containing vegetable raw materials hydrolysis processes are conducted with different mineral acids at changing parameters (temperature of 150-190° C, concentration of hydrolyzing agent 0,5-4% wt) in order to achieve the maximum value of reducing substances in obtained hydrolysates (more 5% wt).

The results of experiments show the possibility of use cheap and perspective recycled resources and agriculture waste as the carbohydrate nutrition in such processes like alcohol yeast cultivation (for obtain fuel alcohol) and in other processes [1].

References:
1. Valeeva R.T., Shurbina M.Yu., Nuretdinova E.I., Ponkratov A.S., Krasilnikova O.V. Comparative evaluation the processes of growth nutrient and alcohol yeasts in vegetable raw hydrolysates of sulfuric and sulfurous acids // Herald of technological university. – 2015. – V. 18, №. 21. – P. 152-154.

УДК 58.071 : 58.084.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ АДАПТАЦИИ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА КЛЮКВЫ

Стручкова И.В., Березина Е.В., Юдинцев А.В., Брилкина А.А., Веселов А.П.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
"Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского",
Нижний Новгород, Россия
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23
struchkova65@inbox.ru

Для адаптации полученных in vitro растений клюквы крупноплодной к почвенным условиям их выращивали совместно с микроскопическими грибами Phialocephala fortinii и Trichoderma virens. Показано, что сокультвирование с микромицетами увеличило прирост биомассы клюквы по сравнению с контролем.

Ключевые слова: Oxycoccus; клональное микроразмножение; ex vitro; Phialocephala; Trichoderma.

В биотехнологии растений при микроклональном размножении критическим этапом является перевод растений из условий in vitro в условия ex vitro, что может повлечь за собой гибель посадочного материала (Кутас, 2009). Нами исследована возможность повышения адаптационного потенциала (ускорения роста и развития) растений клюквы крупноплодной Oxycoccus macrocarpus (Ait.) Pers. на этапе ex vitro с помощью сокультивирования с грибом-микоризообразователем эрикоидных растений Phialocephala fortinii и с сапротрофным микромицетом Trichoderma virens. Изолят P. fortinii выделен из корней клюквы, произрастающей в Нижегородской области; штамм T. virens ВКМ F-1117 получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

Выращенные в условиях in vitro растения O. macrocarpus (сорта Стивенс и Ховес) высаживали в емкости со стерильным торфяным грунтом, в который также вносили мицелий одного из грибов. Спустя 5 и 10 месяцев культивирования определяли биомассу листьев, стеблей и корней растений, длину и количество

побегов. Проникновение мицелия в корни растений подтверждали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Zeiss, Германия).

Инокуляция грибами P. fortinii и T. virens увеличила все исследуемые показатели; степень выраженности эффекта зависела от микромицета, времени сокультивирования, органа, а также сорта растений. Пятимесячное сокультивирование с грибом P. fortinii увеличило по сравнению с контролем сырую и сухую биомассу стеблей у обоих сортов. В присутствии T. virens у клюквы сорта Ховес возросла сырая и сухая биомасса листьев. Через 10 месяцев увеличение биомассы зафиксировано в присутствии обоих грибов. Обнаруженный эффект может быть полезен для стимуляции роста растений клюквы, полученных методом клонального микроразмножения, при адаптации к почвенному субстрату.

Литература.
Кутас Е.Н. Клональное микроразмножение рододендронов и их практическое использование. Минск: Беларус. навука, 2009. 188 с.

MICROSCOPIC FUNGI USAGE FOR CRANBERRY PLANTSTOCK ADAPTATION

Struchkova I.V., Berezina E.V., Yudintsev A.V., Brilkina A.A., Veselov A.P.

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhni Novgorod, Russia
603950, Nizhni Novgorod, Gagarin avenue, 23
struchkova65@inbox.ru

For successful adaptation of in vitro derived American cranberry plants towards soil conditions they were cultivated with microscopic fungi Phialocephala fortinii and Trichoderma virens. It was shown that in contrast to control, cocultivation with micromycetes increased cranberry biomass production.

Key words: Oxycoccus; micropropagation; ex vitro; Phialocephala; Trichoderma.

In plant biotechnology while micropropagation there is a crucial stage of plant transfer from in vitro conditions to ex vitro conditions which may lead to seedlings loss (Kutas, 2009). We studied possibility of enhanced adaptation potential (growth and development stimulation) of American cranberry (Oxycoccus macrocarpus (Ait.) Pers.) plants in ex vitro conditions with ericoid mycorrhizal (Phialocephala fortinii) and saprotrophic (Trchoderma virens) fungi co-cultivation. P. fortinii isolate was obtained from cranberry roots in Nizhegorodsky region, T. virens VKM F-1117 strain – in All-Russian Collection of Microorganisms.

In vitro derived O. macrocarpus plants (cv. Stevens and Howes) were placed in pots with sterile peat and fungus mycelium. Since 5 and 10 months of cultivation there were measured leaves, stems and roots biomass, shoots length and number. Mycelium penetration into roots was demonstrated with LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Germany).

P. fortinii and T. virens inoculation increased all the parameters; effect intensity depended on fungus species, co-cultivation time, plant cultivar and organ. 5-months co-cultivation with P. fortinii increased fresh and dry stem biomass of both cultivars compared to control. Cv. Howes was characterized with increase in leaves fresh and dry biomass in the presence of T. virens. After 10 months enhanced biomass accumulation was shown in the presence of both micromycetes. This effect may be useful for growth stimulation of micropropagated cranberry plants while adaptation to soil.

Reference:
Kutas E.N. Micropropagation and practical usage of rhododendrons. Minsk: Belarus. navuka, 2009. 188 p.

УДК 579.64

РОЛЬ BACILLUS SUBTILIS В ИНДУКЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ (TRITICUM AESTIVUM L.) К ДЕФИЦИТУ ВЛАГИ

О.В. Ласточкина[1], Р.А. Юлдашев[2], М.С. Бабаев[3], Л.И. Пусенкова[1]

[1]ФГБНУ Башкирский НИИСХ, Уфа, Россия
450059, Уфа, ул. Р. Зорге, д. 19
e-mail: oksanaibg@gmail.com

[2] ФГБУН Институт биохимии и генетики, Уфа, Россия
450054, Уфа, пр. Октября, д. 71
[3]ООО НВП «БашИнком», Уфа, Россия
450015, Уфа, ул. К. Маркса, д. 37, к. 1

Выявлено, что проявление защитного действия B. subtilis 10-4 на рост растений пшеницы в условиях дефицита влаги связано с их способностью воздействовать на про-/антиоксидантый статус растений, поддерживать целостность мембранных структур клеток и повышать водоудерживающую способность листьев.

Ключевые слова: Bacillus subtilis, устойчивость, дефицит влаги, про-/антиоксидантый статус, МДА, водоудерживающая способность, Triticum aestivum L.

Засоление является повреждающим фактором, ограничивающим рост и продуктивность растений, главным образом, за счет развития окислительного стресса и нарушения водного режима. Ранее было показано, что Bacillus subtilis (B. subtilis) 10-4 оказывает защитный эффект на рост растений пшеницы в условиях засоления (NaCl). В данной работе проанализировано влияние B. subtilis 10-4 на про-/антиоксидантный статус, содержание малонового диальдегида (МДА) (конечного продукта перекисного окисления липидов) и водоудерживающую способность пшеницы в условиях дефицита влаги. Обнаружено, что B. subtilis 10-4 снижает уровень стресс-индуцированной генерации O2 и H2O2 в проростках и повышает активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и пероксидазы (ПА) в них. Также получены данные о снижении под влиянием B. subtilis 10-4 уровня стресс-индуцированного перекисного окисления липидов, что говорит об ослаблении развития окислительного стресса, и, вероятно вносит существенный вклад в реализацию защитного действия B. subtilis 10-4 на растения при засолении и проявляется в повышении водоудерживающей способности листьев.

ROLE OF BACILLUS SUBTILIS IN INDUCTION OF WHEAT (TRITICUM AESTIVUM L.) RESISTANCE TO WATER DEFICIT

O.V. Lastochkina[1], R.A. Yuldashev[1], M.S. Babaev[3], L.I. Pusenkova[1]

[1] FSBSI Bashkir Scientific Research Institute of Agriculture, Ufa, Russia
450059, Ufa, R. Zorge St., 19
e-mail: oksanaibg@gmail.com
[2] FSBIS Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Russia
450054, Ufa, pr. Oktyabrya, 71
[3] SIE «BashInkom», Ufa, Russia
450015 K. Marx St., 37, b. 1

It was revealed that protective effect of B. subtilis 10-4 on wheat growth under water deficit stress is related to their ability to influence on pro-/antioxidant status of plants, maintains the structural integrity of the cells and increases the water holding capacity of leaves.

Key words: Bacillus subtilis, resistance, salinity, pro-/antioxidant status, MDA, water holding capacity, Triticum aestivum L.

Salinity is a strong damaging factor limits growth and productivity of plants mainly by developing oxidative stress and water regime disturbance. Earlier we found that Bacillus subtilis (B. subtilis) 10-4 exerts protective effect on wheat (Triticum aestivum L.) seedlings growth under salinity (2%NaCl). In this work we analyzed the effect of seed inoculation with B. subtilis 10-4 on pro-/antioxidant status, the content of malondialdehyde (MDA), which are the end product of lipid peroxidation, and the water holding capacity in wheat plants under water deficit caused by salinity. It was found that B. subtilis 10-4 decreased the level of stress-induced O2 and H2O2 generation in seedlings and increased the activity of antioxidant enzymes - superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (PA) in them. Also, the obtained data showed B. subtilis 10-4 reduced the level of stress-induced lipid peroxidation, which in turn, says about weakening of oxidative stress that probably makes a significant contribution to realization by B. subtilis protective effect on wheat plants under salinity and manifested in the increase the water-holding capacity of leaves.

УДК 636.085

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЗРЫВНОГО АВТОГИДРОЛИЗА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА КОРМОВ ИЗ ОТХОДОВ РАСТЕНИЕВОДСТВА

Бояринцева А.В., Калюта Е.В., Афаньков А.Н., Коньшин В.В.

Алтайский государственный аграрный университет, Барнаул, Россия
656049, Алтайский край, Барнаул, пр. Красноармейский, 98
e-mail: boyar1972@mail.ru
Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия
656038, Алтайский край, Барнаул, пр. Ленина, 46
e-mail: vadandral@mail.ru

С использованием метода взрывного автогидролиза проведена обработка отходов растительного происхождения - половы овса, лузги гречихи и подсолнечника. Показано, что обработанные продукты по химическому составу, значениям кормовых единиц и обменной энергии превосходят исходные материалы.

Ключевые слова: взрывной автогидролиз; корма; отходы растительного происхождения.

Грубые корма – сено, солома и мякина полевых культур (соевая, овсяная, гречишная, и др.) – содержат много клетчатки и необходимы жвачным животным для нормального пищеварения [1]. Низкая перевариваемость клетчатки в растительных остатках объясняется ее лигнификацией [2]. Существующие способы повышения питательной ценности грубых кормов основаны на использовании химических реагентов: азотистых и углеводных добавок; дрожжевых заквасок; извести с мочевиной и NaCl; NaOH и др.[3].

Нами предлагается способ улучшения качества кормов путем гидробарометрической обработки растительного материала с использованием метода взрывного автогидролиза (ВАГ). В условиях взрывного автогидролиза происходит не только механическое разрушение стенки клетки, но и протекают механохимические процессы, ведущие к разрушению лигнинового сетчатого полимера и целлюлозных структур. Целлюлоза после расщепления лигноцеллюлозного комплекса практически полностью может перевариваться жвачными животными.

В ходе проделанной работы были получены продукты баротермической переработки половы овса, лузги гречихи и подсолнечника. Обработку растительного сырья проводили в реакторе при давлении 1,52 МПа в течение 10 минут, с последующей декомпрессией. Результаты химического состава и питательной ценности кормового продукта и исходного сырья приведены в таблице:

Таблица. Химический состав и питательность исходных (числитель) и модифицированных (знаменатель) продуктов растительного происхождения

Показатель качества	Кормовой продукт		
	Полова овса	Лузга подсолнечника	Лузга гречихи
Влага,%	4,6/4,5	4,3/4,1	5,0/5,2
Сырой протеин, %	6,3/6,5	8,4/8,2	4,9/5,1
Сырая клетчатка, %	33,1/28,8	39,8/36,1	32,4/30,9
Сырой жир, %	6,0/6,3	10,7/10,3	2,2/2,7
Безазотистые экстрактивные вещества, %	47,4/51,3	36,8/41,4	56,5/58,3
сырая зола, %	7,3/7,1	4,3/4,0	4,0/3,0
Кормовые единицы, кг/кг	0,26/0,32	0,20/0,24	0,25/0,27
Обменная энергия (КРС), МДж	5,4/6,3	4,9/5,4	5,5/5,8

Как следует из представленных данных, содержание сырой клетчатки в обработанном продукте по сравнению с исходным уменьшается. Одновременно с этим наблюдается увеличение количества безазотистых экстрактивных веществ, кормовых единиц и обменной энергии для крупного рогатого скота.

Таким образом, баротермическая обработка отходов растительного происхождения методом ВАГ способствует улучшению зоотехнических параметров отходов растительного происхождения.

Литература.
1. Макарцев, Н.Г. Кормление сельскохозяйственных животных. – К.: Калуга, Изд-во «Ноосфера», 2012. - 640 с.
2. Рядчиков, В.Г. Основы питания и кормления сельскохозяйственных животных: учебник. - СПб.: Лань, 2015. - 645 с.
3. Горлов, И.Ф. Новые тенденции в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы. – Волгоград: Волгоградское научное издательство, 2014. – 224 с.

UDC 636.085

USE OF EXPLOSIVE AUTOHYDROLYSIS METHOD FOR QUALITY IMPROVEMENT OF FEEDSTUFFS, MADE OF PHITOGENIC WASTE

A.V. Boyarintseva, E.V. Kalyuta, A.N. Afankov, V.V. Konshin

Altai State Agricultural University, Barnaul, Russia
98 Krasnoarmeyskiy ave., Barnaul, Altai Territory, 656049
e-mail: boyar1972@mail.ru
Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russia
46 Lenina ave., Barnaul, Altai Territory, 656038
e-mail: vadandral@mail.ru

The method of explosive autohydrolysis was used for processing of phytogenic waste, namely: oat chaffs, buckwheat and sunflower seed peelings. It was shown that the processes products surpass the source materials as to their chemical composition, values of feed units and metabolic energy.

Key words: explosive autohydrolysis, feedstuffs, phytogenic waste.

Coarse feed such as hay, straw and cavings of field crops (soybean, oat, buckwheat, etc.) contain much fibre and are essential for normal digestion of ruminant animals [1]. Poor digestibility of fibre in phytogenic waste is explained by its lignification [2]. The existing methods for improvement of coarse feed nutritive value are based on the use of chemical agents: nitrous and carbohydrate additives, yeast starters, lime with urea and NaCl, NaOH and others [3].

We propose the method of feedstuffs quality improvement by hydro-barometric processing of phytogenic materials with the use of the method of explosive autohydrolysis (EAH). In the presence of explosive autohydrolysis along with mechanical destruction of the cell wall definite mechano-chemical processes take place, which result in destruction of the cross-linked lignin polymer and the cellulose fibre structures. After breakage of the lignocellulosic complex, the cellulose fibre can be digested by ruminant animals almost completely.

During the works performed, the products of barothermal processing of oat chaffs, buckwheat and sunflower seed peelings were obtained. The phytogenic raw materials were processes in the reactor under the pressure of 1.52 MPa during 10 minutes with further decompression. The outcomes as to chemical composition and nutritive value of the feed products and the source raw materials are shown in the Table:

Table. Chemical composition and nutritive value of source (numerator) and modified (denominator) phytogenic products

Quality indicator	Feedstuff		
	Oat chaffs	Sunflower seed peelings	Buckwheat seed peelings
Moisture, %	4.6/4.5	4.3/4.1	5.0/5.2
Crude protein, %	6.3/6.5	8.4/8.2	4.9/5.1
Crude fibre, %	33.1/28.8	39.8/36.1	32.4/30.9
Crude fat, %	6.0/6.3	10.7/10.3	2.2/2.7
Nitrogen-free extractive substances, %	47.4/51.3	36.8/41.4	56.5/58.3
Crude ash, %	7.3/7.1	4.3/4.0	4.0/3.0
Feed units, kg/kg	0.26/0.32	0.20/0.24	0.25/0.27
Metabolic energy (cattle), MJ	5.4/6.3	4.9/5.4	5.5/5.8

As the presented data show, the content of crude fibre in the processed product is reduced compared to the source product. At the same time, the increase in the quantity of nitrogen-free extractive substances, feed units and metabolic energy is observed for cattle.

Thus, the barothermal processing of phytogenic waste with the use of the method of explosive autohydrolysis (EAH) contribute to improvement of zootechnic parameters of phytogenic waste.

References:
1. Makartsev N.G. Farm Livestock Feeding. K.: Kaluga, "Noosphera" Publ., 2012, 640 p.
2. Ryadchikov V.G. Basics of Nutrition and Feeding of Farm Livestock: manual / V.G. Ryadchikov, St. Petersburg: Lan, 2015, 645 p.
3. Gorlov I.F. New Trends in Farm Livestock Feeding. Volgograd: Volgograd Scientific Publishing House, 2014, 224 p.

УДК 631.87:633.111.1 «321»:581.14:631.559 (571.1)

ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ БИОПРЕПАРАТА РИЗОАГРИН НА РОСТ, РАЗВИТИЕ И УРОЖАЙНОСТЬ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В АГРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ЮЖНОЙ ЛЕСОСТЕПИ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Сейтуарова А.Д., Поползухина Н.А .

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Омск, Россия.
644008, Омск, Институтская площадь. 1; 644012, Омск, проспект Королева,26.
email: asargusha@mail.ru

В работе представлены результаты опытных данных по изучению действия диазотрофной бактеризации на сорта яровой мягкой пшеницы в агроэкологических условиях южной лесостепи Западной Сибири. Для инокуляции семян был использован биопрепарат Ризоагрин. Выявлено влияние инокуляции на рост, развитие и урожайность зерна яровой мягкой пшеницы.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, ассоциативная азотфиксация, диазотрофы, Ризоагрин, рисофера, сорт, инокуляция.

Одним из возможных путей снижения расходования азотных удобрений, а также повышения коэффициента их использования является применение микробиологических препаратов, способствующих сохранению природных экологических систем и реализации потенциальной продуктивности растений за счет адаптивных свойств.

В проведенных ранее исследованиях [1] нами было выявлено действие биопрепарата на основе ассоциативных азотфиксаторов на продуктивность генотипов яровой мягкой пшеницы.

Целью данной работы явилось изучение действия ассоциативных диазотрофов на рост, развитие и урожайность яровой мягкой пшеницы в условиях южной лесостепи Западной Сибири.

Объект исследований - 9 сортообразцов яровой мягкой пшеницы селекции 3-х групп спелости; почва опытного участка: лугово-черноземная среднемощная среднегумусовая тяжелосуглинистая, с содержанием гумуса 6,4 – 6,6% (по Тюрину); pHсол – 6,5 – 6,7.

Исследования проводились на опытных полях отдела семеноводства ФГБНУ СибНИИСХ в 2011 - 2013 гг. Площадь делянок 3 м2, повторность опыта 5-ти кратная. Норма высева – 5 млн. всхожих зерен на га. Предшественник - зерновые (вторая культура после пара). В опыте два варианта: сорта без инокуляции (К) и с инокуляцией (И) ризоагрином. Годы проведения исследований были контрастными.

Действие биопрепарата в большей степени отразилось на показателях энергия прорастания и лабораторная всхожесть семян, превышение над контролем варьировало от 4,5 до 23,0% и от 2,0 до 4,7% соответственно.

На полевую всхожесть и выживаемость изучаемых сортообразцов существенное влияние оказывали почвенно-климатические условия. В 2011 г. высокими значениями полевой всхожести при инокуляции характеризовались сорта: Дуэт и Серебристая. В 2012 г. у сортообразцов Памяти Азиева, Г540/05 изучаемый показатель был выше в сравнении с контролем на 4,0% и 12% соответственно.

В 2013 г. наиболее высокие значения полевой всхожести при обработке биопрепаратом имели сорта: Памяти Азиева, Мелодия, Светланка. В среднем за годы изучения при инокуляции с наибольшими значениями полевой всхожести выделились все сорта среднеспелой группы и среднеранний сорт Памяти Азиева.

Наиболее благоприятными для формирования урожайности сортов яровой мягкой пшеницы (в среднем по опыту равной 2,58 т/га – в контрольном варианте и 2,64 т/га – на варианте инокуляции) были условия 2012 г., напротив, в условиях 2011 г. была отмечена самая низкая за годы исследований урожайность – 1,73 т/га и 1,79 т/га, соответственно. Наибольшую урожайность формировали сортообразцы среднеспелой и среднепоздней групп спелости. Лидерами по этому показателю были сортообразцы: Памяти Азиева, Дуэт, Светланка, Серебристая, Г 540/05. Обработка семян ризоагрином оказала неоднозначное влияние на отдельные генотипы пшеницы. В среднем за годы изучения наибольшую прибавку от инокуляции обеспечили сорта Памяти Азиева (от +0,10 до + 0,39 т/га в зависимости от года выращивания) и Дуэт (от + 0,01 до +0,47 т/га). Превышение по урожайности было обусловлено увеличением таких элементов структуры, как высота растений, продуктивная кустистость, продуктивность колоса и масса 1000 зерен.

Литература.
1. Аужанова А. Д. Поползухина Н. А. Формирование продуктивности генотипов яровой мягкой пшеницы под действием биопрепарата ассоциативных диазотрофов в агроэкологических условиях южной лесостепи Западной Сибири // Омский научный вестник. – 2014 - № 1. – С. 90-92.

UDK 631.87:633.111.1 «321»:581.14:631.559 (571.1)

TO EVALUATE THE EFFECT OF BIOPREPARATION RISOGRIN ON THE GROWTH, DEVELOPMENT AND YIELD OF SPRING WHEAT IN AGRO-ECOLOGICAL CONDITIONS OF SOUTHERN FOREST-STEPPE OF WESTERN SIBERIA

Sejtuarova A.D., Popolzuhina N.A.

Omsk state agrarian University named after P. A. Stolypin, Siberian research Institute of agriculture, Omsk, Russia. 644008, Omsk, Institutskaya ploshchad' 1; 644012, Omsk, prospekt Koroleva, 26.
email: asargusha@mail.ru

The paper presents the results of experimental data on studying the effect of diazotrophic bacterization on varieties of spring soft wheat in agro-ecological conditions of southern forest-steppe of Western Siberia. For seed inoculation was used biopreparation Risogrin. The effect of inoculation on the growth, development and grain yield of spring wheat.
Key words: spring soft wheat, associative nitrogen fixation, diazotrophy, Risogrin, recover, variety, inoculation.

One of the possible ways of reducing the expenditure of nitrogen fertilizer, and improve the efficiency of their use is the application of microbiological preparations, contributing to the preservation of natural ecological systems and the realization of potential productivity of plants due to adaptive properties.

In previous studies [1] we have identified the effect of biopreparation on the basis of associative nitrogen-fixing bacteria on productivity of spring soft wheat genotypes.

The aim of this work was to study the associative action of diazotrophs on the growth, development and yield of spring wheat in the conditions of southern forest-steppe of Western Siberia.

Object of research - 9 varieties of spring soft wheat breeding 3 maturity groups; the soil of experimental plot: meadow-Chernozem medium srednesadovaya loam, with a humus content of 6.4 – 6.6 percent (according to Tyurin); rsol – 6,5 – 6,7.

The research was conducted on experimental fields of the Department of seed growing of FSBSI SibSRIA. in 2011 - 2036 Square plots of 3 m 2, repeated experience 5-fold. Seeding rate – 5 million germinating grains per hectare. Predecessor - corn (second crop after pair). In the experiment two options: variety without inoculation (C) and with inoculation (I) risogrin.

Years of research were contrasting.

The action of the biological product to a greater extent impact on the germination energy and laboratory seed germination, the excess over the control ranged from 4.5 to 23.0% and from 2.0 to 4.7%, respectively.

On field germination and survival of the studied genotypes, significant influence of soil and climatic conditions. In 2011, the high values of germination by inoculation was characterized by classes: Duet and Serebristaya. In 2012 the variety samples to the Pamyati Azieva, G540/05 the studied parameters were higher in comparison with the control by 4.0% and 12% respectively.

In 2013 the highest values of germination when treated with the biopreparation had a grades: in Pamyati Azieva,

Melodiya, Svetlanka. In average years of study by inoculation with the highest values of germination was allocated all of the varieties of the mid group and mid-season variety in Pamyati Azieva.

The most favorable for the formation of the yield of modern varieties of spring soft wheat (average experience is equal to 2.58 t/ha in the control variant and 2.64 t/ha on the variant with inoculation) were the conditions of 2012, on the contrary, in the conditions of 2011 were marked the lowest for the study years, the yield was 1.73 t/ha and 1.79 t/ha, respectively. The highest yield was formed by cultivars of mid-season and medium-maturity groups. Leaders for this indicator were varieties of: in Pamyati Azieva, Duet, Svetlanka, Serebristaya, G 540/05.

Treatment of seed with risogrin had mixed effects on individual wheat genotypes. In average years studying the greatest increase from inoculation has provided a variety Pamyati Azieva (from +0.10 to + 0,39 t/ha depending on the crop year) and Duet (from + 0.01 to +0,47 t/ha). The excess of yield was due to the increase of such structure elements like plant height, productive tillering, spike productivity and weight of 1000 grains.

References:
1. Auzhanova A. D., Popolzuhina N. A. The formation of productivity genotypes of spring wheat under the influence of biological preparations of associative diazotrophs in agro-ecological conditions of southern forest-steppe of Western Siberia // Omsk scientific Bulletin. 2014. № 1. P. 90-92.

УДК 633.12:581.192

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ГРЕЧИХИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Бобков С. В., Зотиков В. И., Наумкина Т. С., Сидоренко В. С., Уварова О. В.

Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур, Орел, Россия
302502, Орловская область, Орловский район, пос. Стрелецкий, ул. Молодежная, д. 10, корп. 1
E-mail: svbobkov@gmail.com

Исследовали процесс получения изолированных белков из целых плодов гречихи и продуктов технологической переработки (крупа, продел, мучка). В опыте выявлена положительная связь между содержанием сырого протеина в зерне и в изолированных белках гречихи. Изолированные белки с меньшим содержанием сырого протеина накапливали больше жира.

Ключевые слова: гречиха, Fagopyrum esculentum Moench, крупа, мука, изолированный белок, жир.

Гречиха (Fagopyrum esculentum Moench) является важной сельскохозяйственной культурой умеренного климата. В 2014 году в России гречиху выращивали на площади 712 тыс. га и получили 661,8 тыс. тонн зерна при средней урожайности 0,9 тонн/га (FAOSTAT 2016).

В России основным продуктом технологической переработки гречихи является крупа ядрица. Разработка методов глубокой переработки зерна гречихи является перспективным направлением исследований (Bobkov, 2016). Содержание белка в крупе современных сортов гречихи достигает 18% (Бобков и др., 2015). Белки гречихи характеризуются высоким содержанием незаменимых аминокислот треонина и лизина, дефицитных для злаковых культур. Вследствие низкого содержания проламинов белки гречихи можно использовать в качестве компонента диетических продуктов при глютеновой энтеропатии.

Проведены исследования по разработке методов получения изолированных белков из целых плодов и продуктов технологической переработка зерна гречихи (крупа, продел, мучка). В муке, полученной из крупы сортов гречихи Дикуль, Девятка и Темп, содержание сырого протеина составило 10,9-12,9%. Его наибольшее содержание (12,9%) имела крупа сорта гречихи Дикуль. Сорта Девятка и Темп содержали в крупе 11,5 и 10,9% сырого протеина, соответственно. По содержанию крахмала наблюдалась обратная зависимость. Для крупы сорта Дикуль было характерно наименьшее содержание крахмала (62,6%). Сорта Девятка и Темп по содержанию крахмала в крупе (64,6 и 65,0%, соответственно) существенно превышали сорт Дикуль. Исследуемые сорта гречихи не различались по содержанию жира (2,9%) в крупе.

Экстракцию белков проводили при комнатной температуре в щелочных условиях, непрерывно перемешивая суспензию на шейкере. Суспензию центрифугировали, а в полученный супернатант добавляли соляную кислоту, pH суспензии доводили до значения изоэлектрической точки белков гречихи. Раствор с осаждающимися белками центрифугировали. Для более полного выделения белков проводили второй цикл экстракции и осаждения. Полученные изолированные белки высушивали при температуре не более 50°C.

Изолированные белки гречихи содержали 74,2-81,4% сырого протеина. Его наименьшее содержание

(74,2%) было характерно для изолятов сорта Девятка. Изолированные белки сорта Темп содержали 74,2% сырого протеина. Изоляты белков сорта Дикуль характеризовались наибольшим значением признака (81,4%). Изолированные белки обладали способностью концентрировать жир. Его концентрация возрастала в 1,9-2,7 раза от первоначального уровня (2,9%). Содержание жира в изолированных белках сортов Дикуль, Темп и Девятка составило 5,4, 7,2 и 7,8% соответственно. Между содержанием сырого протеина и жира в изолированных белках гречихи отмечена сильная отрицательная корреляционная зависимость. Установлено, что изолированные белки с меньшим содержанием сырого протеина накапливали больше жира.

Литература.
1. Bobkov S. Biochemical and technological properties of buckwheat grains. Chapter 34 // In: M. Zhou, I. Kreft, S.-H. Woo, N. Chrungoo, G. Wieslander (editors) // Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat. Oxford: Academic Press, 2016, p. 423-440.
2. Бобков С. В., Зотиков В. И., Михайлова И. М., Уварова О. В. Биохимическая характеристика белков семян современных сортов гречихи // Земледелие. 2015. № 5. С. 42-43.

UDK 633.12:581.192

OBTAINING BUCKWHEAT ISOLATED PROTEINS FOR USE IN FOOD INDUSTRY

Bobkov S. V., Zotikov V. I., Naumkina T. S., Sidorenko V. S., Uvarova O. V.

All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops, Orel, Russia
302502, Orlovskaya oblast, Orlovskiy rayon, pos. Streletskiy, Molodezhnaya street, h. 10, build. 1
E-mail: svbobkov@gmail.com

Obtaining buckwheat isolated proteins from whole seeds and products of their technological processing (groat, grits, and flour) is studied. Positive correlation between crude protein content in seeds and isolated proteins was determined. Isolated proteins with lower crude protein content accumulated more fat.

Key words: buckwheat, Fagopyrum esculentum Moench, groat, flour, isolated protein, fat.

Buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) is an important agriculture of moderate climate. In 2014 buckwheat occupied 712 thousand ha, its yield was 0.9 ton/ha, and 661.8 thousand ton of grain was harvested (FAOSTAT 2016).

In Russia groat is a main product of buckwheat processing. Production of isolated protein from buckwheat seeds and products of their technological processing (groat, grits, and flour) is a perspective direction of investigation (Bobkov, 2016). In groat of modern buckwheat varieties protein content reaches 18% (Bobkov et al., 2015). Buckwheat proteins have high content of essential amino acids lysine and threonine, deficient for cereals. Low level of prolamines enables using buckwheat proteins at celiac disease.

Obtaining isolated proteins from whole buckwheat seeds and products of their technological processing (groat, grits and flour) were studied. In flour, derived from groat of varieties Dikul, Devyatka, and Temp, crude protein content was 10.9-12.9%. The highest content of crude protein (12.9%) was in groat of variety Dikul. Variety Devyatka and Temp contain 11.5 и 10.9% crude protein, respectively. In this study reverse relationship between starch and crude protein content was observed. In groat of varieties Devyatka and Temp starch content was 64.6 и 65.0%, respectively. The lowest content of starch (62.6%) was in groat of variety Dikul. All studied buckwheat varieties contain an equal amount (2.9%) of fat.

Extraction of proteins from buckwheat flour conducted in alkaline condition at room temperature. Precipitation of proteins was observed after centrifugation of flour suspension and adjusting pH to mean of buckwheat protein isoelectric point. Solution with precipitating proteins was centrifuged. For more complete production of buckwheat proteins second cycle of extraction and precipitation was conducted. Isolated proteins were dried at 50°C.

Protein isolates contained 74.2-81.4% crude protein. The lowest content of crude protein was observed in isolates of variety Devyatka. Crude protein content in isolates of varieties Temp and Dikul was 74.2 and 81.4%, respectively. Buckwheat isolated proteins had an ability to concentrate fat. Concentration of fat in isolated proteins increased in 1.9-2.7 folds comparing to initial content (2.9%) in buckwheat groat. Isolated proteins of varieties Dikul, Temp, Devyatka contained 5.4, 7.2 и 7.8% fat, respectively. Strong negative correlation was observed between crude protein content and fat concentration. It was determined that isolated proteins with lower crude protein content accumulated more amount of fat.

References:
1. Bobkov S. Biochemical and technological properties of buckwheat grains. Chapter 34 // In: M. Zhou, I. Kreft, S.-H. Woo, N. Chrungoo, G. Wieslander (editors) // Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat. Oxford: Academic Press, 2016, p. 423-440.
2. Bobkov S. V., Zotikov V. I., Mihajlova I. M., Uvarova O. V. Biohimicheskaja harakteristika belkov semjan sovremennyh sortov grechihi // Zemledelie. 2015. № 5. S. 42-43.

УДК 582.477:581.165.1

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА АДВЕНТИВНЫЙ ОРГАНОГЕНЕЗ JUNIPERUS SIBIRICA B.

Аёшина Е.Н.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный аэрокосмический университет им. академика М.Ф. Решетнева » г. Красноярск, Россия 660049, ул. Мира 82, e-mail: enaesh@mail.ru

Установлен оптимальный минеральный состав питательной среды для культивирования семян Juniperus sibirica B. в условиях in vitro. Подобрано сочетание регуляторов роста для проявления морфогенетической реакции эксплантов.

Ключевые слова: in vitro, интродукции адвентивных почек, агаризованные питательные среды, регуляторы роста.

Наиболее генетически консервативным методом размножения в культуре тканей in vitro является культивирование апикальных и латеральных почек. Развитие растений из почек короче, чем при использовании других методов. Значительный интерес представляют адвентивные почки, которые возникают de novo прямо из эксплантов или косвенно, через промежуточный каллус [1].

Стандартный метод интродукции адвентивных почек заключается во включении цитокининов в культуральную среду. Регуляторы роста цитокининого типа действия, являясь индукторами процессов дедифференцировки тканей и формирования адвентивных почек de novo, в разной степени влияют на эти процессы [2]. Для индукции адвентивных почек широко используются цитокинии – 6- бензиламинопурин (6-БАП), а также смесь различных цитокининов.

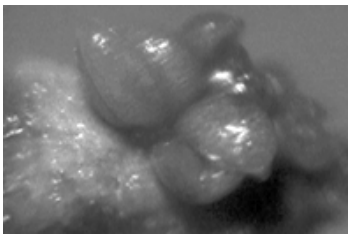
Из анализа литературных источников следует, что не существует единого разработанного протокола in vitro для индукции адвентивных почек у эксплантов хвойных растений.

На начальном этапе исследования важно было подобрать питательную среду с стандартным минеральным составам. Стерильные семена Juniperus sibirica, освобожденные от наружной кожуры, вводили на агаризованные питательные среды с минеральным составом по Murashige and Skoog, Уайту, Гамборгу, Литвай, Шенке-Хильдебрандту, N6 без добавления регуляторов роста. Всего на этом этапе было отобрано и введено в культуру in vitro по 40 эксплантов на каждую среду. Полученные результаты показали, что наиболее оптимальной средой для культивирования семян Juniperus sibirica B. являлась агаризованная среда с минеральным составом по Murashige and Skoog. Количество жизнеспособных эксплантов составило 62,6%.

Культивирование семян на безгормональной питательной среде Мурасиге-Скуга не способствовало проявлению морфогенетической реакции эксплантов. На модифицированной среде Мурасиге-Скуга (MS), дополненной α-НУК (0,4 мг/л), 6-БАП (4 мг/л), тиамином (1 мг/л), пиридоксином (10 мг/л), ниацином (10 мг/л), казеином (400 мг/л), мезоинозитом (400 мг/л) получены микропочки ярко-зеленого цвета, четко дифференцированные. На 20-23 сутки культивирования семян на среде наблюдается выход зеленых семядолей наружу через эндосперм в 10% . На 30 день культивирования наблюдали образование четко дифференцированных ярко-зеленых микропочек на семядолях и незначительное образование каллуса (рис 1.)

На 109 сутки культивирования, полученные микропочки, были помещены на безгормональную питательную среду MS. Далее наблюдали замедление и прекращение роста и развития.

Рис.1. Микропочки на 57 сутки культивирования



Литература.
1. Tigabu M, Fjellström J, Odén PC, Teketay D. Germination of Juniperus procera seeds in response to stratification and smoke treatments, and detection of insect-damaged seeds with VIS + NIR spectroscopy // New Forest. 2007. V. 33. P. 155-169.
2. Al-Ramamneh Ezz AL-Dein, Dura S., Daradkeh N. Propagation physiology of Juniperus phoenicea L. from Jordan using seeds and in vitro culture techniques // African Journal of Biotechnology. 2012. V. 11(30). P. 7684-7692.

UDC 582.477:581.165.1

GROWTH REGULATORS INFLUENCE ON JUNIPERUS SIBIRICA B. ADVENTITIOUS ORGANOGENESIS

Aeshina E.N.

FGBOU VO «Siberian State Aerospace University named after Academician M.F. Reshetnev » Krasnoyarsk, Russia 660049, Mira Street 82, e-mail: enaesh@mail.ru

A tailored mineral composition of nutrient medium for Juniperus sibirica B. seeds in vitro culture has been determined. A combination of growth regulators for manifestation of explants morphogenetic reaction has been selected.

Key words: in vitro, introduction of adventives buds, agar nutrient media, growth regulators.

The most genetically conservative proliferation method in a tissue in vitro culture is cultivation of apical and lateral buds. Plant growth from seeds is shorter than when the other methods are used. Adventitious buds appearing de novo either directly from explants or indirectly through an intermediate callus are of considerable interest [1].

Standard method of adventitious buds introduction lies in inclusion of cytokinins in culture medium. The growth regulators of cytokinin action type, being the inducers of tissue dedifferentiation and adventitious buds formation processes de novo, influence differently these processes [2]. Cytokinin – 6- benzyl aminopurine (6-BAP), and also various cytokinins composite is widely used for adventitious buds induction.

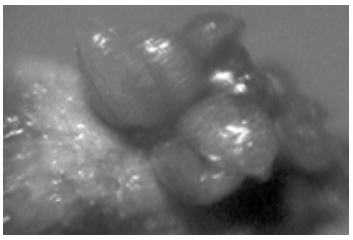
It follows from the analysis of the reference, that there is no unified developed protocol in vitro for adventitious buds induction from coniferous explants.

It was important to select the nutrient medium with standard mineral composition at the initial stage of research. Axenic seeds of Juniperus sibirica, with removed skin, were put into agar nutrient media having mineral composition by Murashige and Skoog, White, Hamborg, Liteway, Shenke-Hildebrandt N6 without adding any growth regulators. Totally at this stage it was selected and introduced in vitro culture by 40 explants for each medium. The results obtained have shown that optimal medium for Juniperus sibirica B. seeds culture is agar nutrient medium having mineral composition by Murashige and Skoog. The quantity of viable explants amounted 62,6%.

Seeds culture in hormones-free nutrient medium by Murashige-Skoog didn't contribute to manifestation of explants morphogenetic reaction. In modified medium by Murashige and Skoog (MS), supplemented by α-НУК (0,4 mg/l), 6-БАП (4 mg/l), thiamine (1 mg/l), pyridoxine (10 mg/l), niacin (10 mg/l), casein (400 mg/l), mesoinosite (400 mg/l), clear differentiated micro-buds of bright green color were obtained. On the 20-23rd day following seeds culture, there in the medium the appearance of green seed-lobes through endosperm by 10% can be observed. On the 30th day following seeds culture, the formation of clear differentiated micro-buds of bright green color and minor formation of callus on seed-lobes was obtained (Fig. 1.)

On 109 day following seeds culture, the resultant micro-buds were put in hormones-free nutrient medium MS. Further growth and development slowing down and stopping was observed.

Fig.1. Micro-buds on the 57th day of seeds culture.



References:
1. Tigabu M, Fjellström J, Odén PC, Teketay D. Germination of Juniperus procera seeds in response to stratification and smoke treatments, and detection of insect-damaged seeds with VIS + NIR spectroscopy // New Forest. 2007. V. 33. P. 155-169.
2. Al-Ramamneh Ezz AL-Dein, Dura S., Daradkeh N. Propagation physiology of Juniperus phoenicea L. from Jordan using seeds and in vitro culture techniques // African Journal of Biotechnology. 2012. V. 11(30). P. 7684-7692.

УДК 661,471.2:577.15

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ОБРАБОТКЕ САХАРИНЫ ЯПОНСКОЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ЕЁ В КОРМАХ ДЛЯ МОЛОДИ ТРЕПАНГА

Рогов А.М., Кадникова И.А., Аминина Н.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр», Владивосток, Россия
690950, Владивосток, пер. Шевченко д.4.
e-mail: aleksandr.rogov@tinro-center.ru

Проведено исследование возможности обработки сахарины японской ферментными препаратами. Полученные данные показали перспективность использования ферментированных водорослей в биотехнологии кормов, в частности в для молоди трепанга.

Ключевые слова: Saccharina japonica, ферментный препарат, марикультура, химический состав, корма.

При разработке кормовой продукции из ламинариевых водорослей, в частности сахарины японской, возникает проблема потребления и усвоения её питательных веществ молодью трепанга. Корма на основе натуральной сахарины по сравнению с другими видами водорослей дают низкий прирост и выживаемость молоди трепанга. Для решения этой проблемы актуальным является использование в составе кормов обработанной сахарины. В этих целях перспективным направлением является ферментная обработка водорослей [1,2,3,4,5].

Коммерческих ферментных препаратов, специально разработанных, для гидролиза водорослевого сырья не выпускается. Поэтому, для работы были взяты препараты, используемые для обработки наземного растительного сырья с высоким содержанием сложных углеводов.

Целью настоящей работы является исследование влияния обработки Saccharina japonica ферментными препаратами на её химический состав и определения перспективности её использования в кормах для молоди трепанга.

В качестве объектов исследований использовали: промысловую бурую водоросль- сахарину японскую (Saccharina japonica) и пять коммерческих ферментных препаратов (Целлолюкс-F, Вискофло MG, Оллзайм BG, Оллзайм PT и Оллзайм ВегПро). Параметры обработки сахарины подбирались исходя из рекомендуемых режимов обработки сырья производителями препаратов.

Анализ химического состава сахарины показал, что основным субстратом для действия ферментов являются углеводы, и в первую очередь альгиновая кислота (35,5%) и клетчатка (17,4%). После обработки водорослей ферментными препаратами основные изменения происходят в количественном составе углеводов, в первую очередь в соотношении высокомекулярных и легкогидролизуемых полисахаридов (ЛГП).

Целлолюкс-F и Вискофло MG одинаково влияют на содержание альгиновой кислоты и снижают её количество с 35,5% до 28,2% 28,0% соответственно При этом препарат Целлолюкс более активно воздействует на клетчатку в сахарине по сравнению с препаратом Вискофло, снижая её содержание с 17,4% до 5,9 и 10,7%, соответственно. Закономерно увеличивается содержание ЛГП до 16,7% и 14,4%за счёт перехода в эту категорию доли клетчатки и альгиновой кислоты после гидролиза.

Препараты группы Оллзайм так же меняют соотношение углеводов, усиливая гидролиз альгиновой кислоты и клетчатки. При обработке сахарины в ней снижается содержание альгиновой кислоты до уровня 26,5-29,4%, а клетчатки в 2,5-3,9 раз (до 4,5-6,8%). Соответственно, увеличивается доля ЛГП до 16,7-20,9%. Количество белка во всех образцах обработанной сахарины незначительно уменьшается с 7,4% до 6,8-7,0%.

Таким образом, обработка водорослей ферментными препаратами способствует снижению в них количества альгиновой кислоты и клетчатки, и как следствие, увеличения ЛГП. Под действием комплекса ферментов активно протекает гидролиз высокомолекулярных полисахаридов, в результате снижается их вязкость при

растворении кормов в воде, облегчая доступность корма молоди трепанга.

Обработанные водоросли были введены в рецептуру кормов по ТУ 9283-366-00472012-2015. Проведены биологические испытания кормов на молоди трепанга В качестве контроля служил корм на основе саргассума. Эффективность кормов оценивали по абсолютному приросту массы тела особей за 18 дней. Показано, что эффективность корма зависит от типа ферментного препарата, используемого для обработки водорослей. Максимальное значение абсолютного прироста особей (73,3мг) даже превышает таковое у контрольной группы (70,3мг). Проведенные исследования показали возможность использования ферментированных водорослей в биотехнологии кормов для молоди трепанга.

Литература.
1. Перспектива использования морских водорослей в биотехнологии кормов для марикультуры/ А.М. Рогов, И.А. Кадникова, Н.М. Аминина, Н.Д. Мокрецова// Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VII московского междунар. конгресса/ ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РГТУ.- М.,2015. С. 122-123.
2. Ферменты из морских организмов. Основные свойства и перспективы использования /Рассказов В.А. [и др].// Вестник ДВОРАН 1991№4 С.34-40.
3. Поиск фукоидан-гидролаз среди морских микроорганизмов/ Бакунина И.Ю. [и др].// Микробиология. 2000. №3. С. 370-376
4. Титлянов Э.А., Титлянова Т.В. Морские растения стран Азиатско–Тихоокеанского региона, их использование и культивирование/ Владивосток: Дальнаука, 2012. 377с.
5. Полиферментативный гидролиз полисахаридов водорослей LAMINARIA SACCHARINA/ Алексеева З.Ю. [и др.]// Известия Санкт-Петербургского Государственного Технологического Института (технического университета).2009. № 6. С. 50-53

USE OF THE ENZYME PREPARATIONS AT THE SACCHARINA JAPONICA PROCESSING FOR THE SEA CUCUMBER JUVENILES FEEDS

Rogov A.M., Kadnikova I.A., Aminina N.M.

Federal State Budgetary Scientific Institution "Pacific Scientific Research Fisheries Center" (FSBSI "TINRO-Center"), Vladivostok, Russia
690950, 4, Shevchenko alley, Vladivostok city.
e-mail: aleksandr.rogov@tinro-center.ru

Ability of the Saccharina japonica processing by enzyme preparations is studied. Obtained data have shown perspectivity of use of the fermented algae in feed biotechnology in particular for the sea cucumber juveniles.

Key words: enzyme preparation, mariculture, chemical composition, feed.

In developing feed products from laminarian algae in particular Saccharina japonica, there is a problem of their nutrients consumption and assimilation by the sea cucumber juveniles.

Feed based on natural saccharins compared to other algae species allowed a low growth and survival of the sea cucumber juveniles. To solve this problem is the use of processed saccharine in feed composition. In this connection a perspective direction is the algae enzyme processing. Commercial enzyme preparations specially developed for the algal raw material hydrolysis are not produced. As a result, preparations used for the processing of ground plant raw materials with a high content of complex carbohydrates were taken for this work. The aim of this paper is to study the impact of Saccharina japonica processing by enzyme preparations on her chemical composition and definition of perspectivity for using in the sea cucumber juveniles feed. As objects of research, the commercial brown alga - saccharine Japanese (Sascharina japonica) and five commercial enzyme preparations (Tsellolyuks-F, Viscoflow MG, Allzyme BG, Allzyme PT и Allzyme VEGPRO) were used. Saccharine processing parameters were chosen on the basis of raw processing regimes recommended by the preparations manufacturers.

Analysis of the saccharine chemical composition showed that the main substrate for enzyme action are carbohydrates and especially alginic acid (35.5%) and cellulose (17.4%). After algae processing by the enzyme preparations, major changes occur in the quantitative composition of carbohydrates in the first place in the ratio of high molecular and easy hydrolysable polysaccharides (EHP). Tsellolyuks -F and Viscoflow MG affect the alginic acid content identically and reduce her quantity from 35.5% to 28.2% -28.0% respectively. In this case, Tsellolyuks preparation affects the saccharine fiber more actively compared to Viscoflow one reducing her content from 5.9 to 17.4% and 10.7% respectively. Naturally, EHP content increases to 16.7% and 14.4% due to transition to this category the fiber and alginic acid share after hydrolysis. Allzyme group preparations also change the carbohydrates ratio reinforcing the alginic acid and fiber hydrolysis. In saccharine processing, the alginic acid content declines to a level

of 26,5-29,4% and the fiber one in 2.5-3.9 times (to 4.5-6.8%). Accordingly, the EHP share increases to 16,7-20,9%. The protein amount in all processed saccharine samples decreases slightly from 7.4% to 6.8-7.0%. Thus, algae processing by enzyme preparations helps to reduce their alginic acid and fiber amount and as a result increase the EHP. Under the influence of enzyme complex, the high molecular polysaccharides hydrolysis runs actively, when feed dissolved in water, their viscosity declines making it easier the feed assimilation by the sea cucumber juveniles.

Processed algae were introduced into the feed formulation in accordance with TC 9283-366-00472012-2015. Biological tests of feed were carried out on the sea cucumber juveniles. As a control, the feed based on Sargassum was used. Feed efficiency was estimated by the absolute individuals body mass growth for 18 days. Shown that the feed efficiency depends on the type of enzyme preparation used for the algae processing. The maximum value of the absolute individuals growth (73,3mg) even exceeds that in the control group (70,3mg). Studies have shown the possibility of using of the fermented algae in feed biotechnology for the sea cucumber juveniles.

References:
1. Use of algae in the feed biotechnology for mariculture/ Rogov A.M., Kadnikova I.A., Aminina N.M., Mokretsova N.D.// Proceedings of the VIII Moscow International Congress "Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development"/ JSC "Expo-biochem-technologies", D.I. Mendeleyev University of Chemistry and Technology of Russia Moscow: 2015 P.122-123
2. Enzymes from marine organisms. Basic properties and prospects of using/ Rasskazov V.A. [and etc]// Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences .1991 №4 P.34-40.
3.Search for the fucoidan hydrolases among marine organisms/ Bakunina I.Yu [and etc]// microbiology. 2000. №3. P. 370-376
4. Titlyanov E.A., Titlyanova T.V. Marine plants of the asian pacific region countres, their use and cultivation/ Vladivostok: Dalnauka, 2012. 377p.
5. Polyenzymatic hydrolysis of the Laminaria saccharina polysaccharides/ Alekseeva Z.Yu [and etc]// //Bulletin of the Saint Petersburg State Institute of Technology.2009.№6. P 50-53

УДК 619:636.59:616.2

МОНИТОРИНГ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ ПО РЕСПИРАТОРНЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ ПТИЦ В ЗАПАДНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

Гофман А.А., Лыско С.Б., Красиков А.П.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Сибирский научно-исследовательский институт птицеводства», Россия, Омская область с. Морозовка
644555 Омская область с. Морозовка, ул. 60 лет Победы, 1.
e-mail: vet@sibniip.ru

Изучена эпизоотическая ситуация по респираторным инфекционным болезням птиц на птицефабриках Западно-Сибирского региона. Установлено, что применение живых вакцин на промышленных птицефабриках не создаёт полноценной специфической защиты у вакцинированного поголовья. Получены данные о этиологически значимых возбудителях инфекционного процесса, в сравнительном аспекте изучена их чувствительность к антибиотикам и настойке прополиса.

Ключевые слова: респираторные инфекции, птица, микроорганизмы, прополис, антибактериальные препараты.

Цель работы — изучить эпизоотическую обстановку по респираторным инфекционным болезням птиц в Западно-Сибирском регионе; выявить возбудителей, участвующих в инфекционном процессе, и определить их чувствительность к антибактериальным препаратам и настойке прополиса.

Объекты исследования: сыворотка крови, соскобы со слизистой оболочки гортани, патологический материал от различных видов птиц.

Применение живых вакцин против вируса НБ и ИБК на промышленных птицефабриках не создаёт полноценной специфической защиты у вакцинированного поголовья, что подтвердилось отсутствием иммунитета у 25,0 — 47,2% птиц к вирусу НБ и у 11,0 — 34,5% к вирусу ИБК. Наличие высоких титров антител (максимальный титр от 8200 до 24581) к метапневмовирусной инфекции, на не вакцинированном поголовье, у более 80% птицы свидетельствует о циркуляции данного возбудителя во всех исследованных хозяйствах. Присутствие в стаде скрытых инфекций оказывает иммунодепрессивное действие на организм птиц, создает условия для развития заболеваний вторичной этиологии.

При прижизненной диагностике в соскобах со слизистой оболочки гортани у птиц с клиническими признаками респираторных инфекций преобладал стрептококк (Streptococcus faecalis — 33,4%, Streptococcus faecium — 22,2%), при этом его всегда изолировали в ассоциациях с Escherichia coli, Enterobacter agglomerans и Citrobacter freundii.

При бактериологическом исследовании патологического материала от погибшей птицы с признаками поражения респираторного тракта выделено 11 видов микроорганизмов. Ведущее место среди них занимают Escherichia coli (36,5%) и Staphylococcus subspecies (18,3%). В 55,4% случаев возбудители выделены в ассоциациях, а в 44,6% — в виде моноинфекций. Наибольшее количество (16,1%) в ассоциациях занимает Escherichia coli + Staphylococcus subspecies.

В отношении выделенные культуры микроорганизмов исследована активность 32-х антибактериальных препаратов из различных фармакологических групп. Полученные данные свидетельствуют о наличии большого количества антибиотикорезистентных штаммов. Так, количество резистентных культур кишечной палочки к фторхинолонам составляло от 27 до 50%, тетрациклинам — от 18 до 29%, левомицетину — 55%, пенициллинам — 50 — 69%, аминогликозидам — 56%, полимиксинам — 29 — 38%, нитрофурану — 83,3%. Регистрируются микроорганизмы, резистентные к некоторым комплексным препаратам (Трифлон, Ципроген, Энрофлон-К, Квиноприм), — от 24 до 50%.

На микроорганизмы, выделенные от птиц с признаками поражения респираторного тракта (Escherichia coli, Enterobacter agglomerans, Citrobacter freundii, Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium, Staphylococcus subspecies) исследована активность прополиса in vitro. Установлено, что настойка прополиса проявляет высокую антибактериальную активность в отношении всех исследованных возбудителей, вызывая их гибель уже через шесть часов взаимодействия, в том числе и в отношении культур, резистентных к антибиотикам. Это позволяет считать его одним из перспективных и эффективных средств для лечения и профилактики респираторных инфекций птиц как в виде монопрепарата, так и в сочетании с антибиотиками.

UDC 619:636.59:616.2

MONITORING OF AN EPIZOOTIC SITUATION ON RESPIRATORY INFECTIOUS DISEASES OF BIRDS IN THE WEST SIBERIAN REGION

Hoffman Alena A., Lysko Svetlana B., Krasikov Alexander P.

Federal State Scientific Institution «Siberian Research Institute for Poultry», Russian, Omsk region, Morozovka
644555 Omsk oblast, 1, 60 Let Pobedy Street, Morozovka
e-mail: vet@sibniip.ru

Epizootic situation on respiratory infectious diseases of birds on the poultry farms of the West Siberian region was studied. It was established that application of live vaccines on industrial poultry farms doesn't create full specific protection at the vaccinated live-stock. Data about etiological significant activators of infectious process were obtained. In comparative aspect their sensitivity to antibiotics and tincture of propolis was studied.

Key words: respiratory infections, birds, microorganisms, propolis, antibacterial preparations.

The work purpose is to study an epizootic situation on respiratory infectious diseases of birds in the West Siberian region, to reveal the activators participating in infectious process and to define their sensitivity to antibacterial preparations and tincture of propolis.

The objects of research are blood serum, scrapes from a mucous membrane of a throat, pathological material from different types of birds.

Application of live vaccines against the NDV and IBV virus on industrial poultry farms doesn't create full specific protection at the vaccinated live-stock that was confirmed by lack of immunity at 25,0 – 47,2% of birds to the NDV virus and at 11,0 – 34,5% to the IBV virus. Existence of high titres of antibodies (the maximum titre from 8200 to 24581) to a metapneumoviral infection at more than 80% not vaccinated live-stock of birds witnesses circulation of this activator in all studied farms. Presence of latent infections at flock has immunosuppressive effect on an organism of birds and creates conditions for development of diseases of the secondary etiology.

Streptococcus (Streptococcus faecalis – 33,4%, Streptococcus faecium – 22,2%) prevailed at lifetime diagnostics in scrapes from a mucous membrane of a throat at birds with clinical signs of respiratory infections, at the same time it was always isolated in associations with Escherichia coli, Enterobacter agglomerans and Citrobacter freundii.

At a bacteriological research of pathological material from the death bird with signs of lesion of a respiratory canal it was excreted 11 species of microorganisms. Escherichia coli (36,5%) and Staphylococcus subspecies (18,3%) take the leading place among them. In 55,4% of cases activators were excreted in associations and in 44,6% - in the form of monoinfections. Escherichia coli + Staphylococcus subspecies occupies the greatest number

(16,1%) in associations.

Activity of 32 antibacterial preparations from various pharmacological groups was investigated in the relation of the marked – out cultures of microorganisms. The obtained data witness about existence of a large number of antibioticoresistant strains. So, the number of resistant cultures of colibacillus to ftorkhinolona made from 27 to 50%, to tetratsiklina – from 18 to 29%, to levomitsetin – 55%, to penicillin – 50 – 69%, aminoglycosides – 56%, to polimiksina – 29 – 38%, to nitrofuran – 83,3%. Microorganisms which are resistant to some complex preparation (Triflon, Ciprogen, Enroflon – K, Kvinoprim) are registered from 24 to 50%.

It was investigated activity of propolis in vitro on microorganisms excreted from birds with signs of lesion of a respiratory canal (Escherichia coli, Enterobacter agglomerans, Citrobacter freundii, Streptococcus faecalis, Streptococcus faecium, Staphylococcus subspecies). It was established that tincture of propolis has high antibacterial activity concerning all studied activators causing their death in six hours of interaction including concerning cultures which are resistant to antibiotics. It allows to consider that it is one of the perspective and effective remedies for treatment and prophylaxis of respiratory infections of birds both in the form of monopreparation and in combination with antibiotics.

УДК 581.1

РЕГУЛЯЦИЯ МЕЛАТОНИНОМ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА К АТМОСФЕРНОЙ ЗАСУХЕ

Бойко Е.В., Симон Е.В., Видершпан А.Н., Головацкая И.Ф.

Национальный исследовательский Томский государственный университет,
Россия, г. Томск, 634050, пр. Ленина, 36
e-mail: CaterinaSoloveva@gmail.com

Установлено, что введение мелатонина в питательную среду ускорило прорастание семян и обеспечило повышение устойчивости растений огурца при атмосферной засухе.

Ключевые слова: мелатонин; атмосферная засуха; Cucumis sativus L, устойчивость.

В настоящее время показано широкое распространение мелатонина (Мел) в растительном царстве. Также установлено, что мелатонин повышает жизнеспособность клеток моркови при холодовом стрессе, устойчивость водного гиацинта при воздействии тяжелыми металлами. Мел усиливает деятельность ферментов антиоксидантной системы (Li C. et al., 2015) и влияет на уровень экспрессии большого числа генов Arabidopsis, отвечающих за реакции в ответ на стресс в растениях (Weeda S. et al., 2014). Однако механизм защитного действия Мел при стрессе до настоящего времени полностью не изучен. В сельском хозяйстве при выращивании овощных культур часто сталкиваются с проблемой негативного действия абиотических факторов. Засуха оказывает вредное влияние на рост и развитие растений. Огурец Cucumis sativus L. является широко распространенной сельскохозяйственной культурой, выращиваемой в закрытом грунте и требующей высокую атмосферную влажность в агроценозе. В связи с тем, что влияние мелатонина на рост и развитие растении в условиях засухи мало изучено, целью наших исследований явилось изучение роли мелатонина в регуляции устойчивости C. sativus сорта Изящный к действию атмосферой засухи.

Объектами исследования служили 48-дневные растения C. sativus раннеспелого сорта Изящный. Семена огурца проращивали на безгормональной 50% жидкой среде МС (Мурасиге-Скуга) (контроль) и на среде с Мел разных концентраций (опыт). Исследовали мелатонин в диапазоне концентраций от 0,1 пМ до 10 мМ. Растения помещали в гидропонные сосуды и выращивали в фитокамере «Биотрон-5» с потоком воздуха при 35%-ной влажности. В ходе культивирования проводили фенологические наблюдения, оценивали ростовые параметры растений. Определяли сумму хлорофиллов (a + b) в листьях разных ярусов без их отделения от растения с помощью Chlorophyll Content Meter CL-01 (Hansatech Instruments, Великобритания).

В результате исследований показали, что при низкой концентрации Мел ускорял прорастание семян и растяжение проростков. С увеличением концентрации уменьшались длина побега, количество ярусов и усов. При равной закладке примордиев цветов, их распускание тормозилось высокими концентрациями, но ускорялось низкими и средними концентрациями Мел. Цветение отмечали в более низких узлах побега огурца, чем у контроля. Низкие концентрации Мел увеличивали содержание пигментов в листьях, начиная со 2 яруса, тогда как высокие концентрации – начиная с первого по 9–7 ярусы, по сравнению с контролем. Обработка Мел увеличивала содержание зеленых пигментов фотосинтеза в листьях нижних и средних

ярусов на 50% и в 2–4 раза, соответственно.

Таким образом, показано, что Мел повышал устойчивость растений C. sativus сорта Изящный к атмосферной засухе, изменяя уровень фотосинтетических пигментов и ритмику процессов роста и развития.

Литература:
Li C., Tan D.X., Liang D., Chang C., Jia D., Ma F. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two Malus species under drought stress // J. Exp Bot. 2015. Vol. 66, №. 3. P. 669-680.
Weeda S., Zhang N., Zhao X. Ndip G., Guo Y., Buck G.A., Fu C., Ren S. Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems // PLoS ONE. 2014. Vol. 9(3): e93462.

UDC 581.1

REGULATION OF CUCUMBER PLANT RESISTANCE TO ATMOSPHERIC DROUGHT BY MELATONIN

Boyko E.V., Simon E.V., Vidershpan A.N., Golovatskaya I.F.
National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation
634050, Tomsk, Lenin av., 36.
e-mail: CaterinaSoloveva@gmail.com

It has been established that the administration of melatonin in the culture medium has accelerated the seeds germination and has provided an increase the cucumber plant resistance in the atmospheric drought.

Key words: melatonin; atmospheric drought; Cucumis sativus L, resistance.

Nowadays a widespread of melatonin (Mel) in the vegetable kingdom is shown. Also it was shown that melatonin improves the viability of carrot cells during cold stress, water hyacinth stability while heavy metals exposing. Mel increased the activity of antioxidant enzymes system (Li C. et al., 2015). Moreover, it is shown that Mel affects the expression level of a large number of Arabidopsis genes which are responsible for reactions in response to stress in plants (Weeda S. et al., 2014). However, the mechanism of the protective action of Mel at the stress has not yet been fully explored. In agriculture, the problem of the negative effect of abiotic factors while growing vegetables is widespread. Drought has a detrimental effect on the growth and development of plants. Cucumber Cucumis sativus L. is a widespread crop which is grown under coverage requires a high atmospheric humidity in agrotcenoze. Due to the fact that the influence of melatonin on the growth and development of plants under drought conditions has been studied poorly, the aim of our research was to investigate the role of melatonin in the regulation of the resistance of C. sativus Elegant variety to the drought atmosphere impact.

The objects of study were 48-day-old plants of C. sativus the early-maturing Elegant variety. The cucumber seeds were germinated in hormone-free Murashige and Skoog 50% liquid medium (control) and in the medium with different concentrations of Mel (experience). Melatonin was studied within the concentrations from 0.1 pmol to 10 mmol. Plants were placed in hydroponic vessels and were grown in phyto-camera «Biotron-5» with an air flow at 35% humidity.

Phenological observations were taken during the cultivation, videlicet plant growth parameters were evaluated. The amount of chlorophyll (a + b) in the leaves of different layers without separating from the plant with the help of Chlorophyll Content Meter CL-01 (Hansatech Instruments, UK) was determined.

As a result, studies have shown that low concentrations of Mel accelerated seed germination and seedling stretching. As the concentration increased the length of sprout, number of layers and creeping stems decreased. At equal setting up of flowers primordia, their blooming deaccelerated by high concentrations, but on the contrary it accelerated by low and medium concentrations of Mel. Flowering was observed at lower cucumber sprout nodes than at the control one.

Low concentrations of Mel increased pigment content in leaves starting from the second layer, while high concentrations – starting from the first up to the 9th–7th, compared with the control one. Processing of Mel increased content of green pigments of photosynthesis in leaves of the lower and middle layers by 50% and by 2–4 times respectively.

Thus, it is shown that Mel increased C. sativus plant resistance to atmospheric drought, changing the level of photosynthetic pigments and the rhythm of growth and development processes.

References:
Li C., Tan D.X., Liang D., Chang C., Jia D., Ma F. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical

scavenging, and stomatal behaviour in two Malus species under drought stress // J. Exp Bot. 2015. Vol. 66, № 3. P. 669-680.
Weeda S., Zhang N., Zhao X. Ndip G., Guo Y., Buck G.A., Fu C., Ren S. Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems // PLoS ONE. 2014. Vol. 9(3): e93462.

УДК 573.6:636.52/.58

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ СПЕРМИЕВ ПЕТУХА С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕНЕЗА

Коршунова Л.Г., Карапетян Р.В., Зиадинова О.Ф., Фисинин В.И.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук
Сергиев Посад, Россия
141311, Московская обл., г. Сергиев Посад, ул. Птицеградская, 10
E-mail: lg@vnitip.ru

Анонс. Изучалась возможность электропорации спермиев петухов с целью использования их в качестве векторов для получения трансгенной птицы.

Ключевые слова: куры, сперматозоид, электропорация, трансгенез

Получение трансгенной птицы с использованием спермиев в качестве векторов переноса выглядит очень привлекательно, поскольку не требует больших финансовых ресурсов, а искусственное осеменение - широко используемый в птицеводстве прием. Впервые применение сперматозоидов млекопитающих, как векторов для генетической трансформации было показано в 1971 г. [1], затем в 1989 г. [2], позже было значительное количество работ на разных видах животных, в том числе птиц [3-5]. Эти результаты обнадёживают и свидетельствуют о перспективности дальнейшей научной проработки проблемы. До недавнего времени метод электропорации использовался в генетической инженерии достаточно ограниченно [6; 7]. Кроме того, электропорация – это физический, а не биохимический метод. Поэтому от него можно ожидать высокой воспроизводимости.

Работа проведена на сперме петухов породы белый леггорн, содержащихся на виварии в индивидуальных клетках. В работе использовали свежеполученную смешанную сперму от 2–4 петухов. Сперму разбавляли в 10 раз стерильным физраствором, и после осаждения центрифугированием суспендировали в гипоосмолярном буфере для электропорации фирмы Эппендорф. Электропорацию проводили в Мультипораторе фирмы Эппендорф, в кюветах объёмом 400 мкл и эффективной толщиной 2 мм. Использовали следующий режим: напряжение 600 вольт (3000 вольт/см), длина импульса 50 мксек, количество импульсов на пробу от 1 до 4. О потере качества спермы в процессе электропорации судили по ее подвижности.

Для оценки порообразования использовали трипановый синий для микроскопии фирмы MERCK, не проникающий через неповрежденные клеточные мембраны, в концентрации 0,5 и 0,25 мг/мл суспензии. После проведения электрического импульса спермии очищали от несвязанного красителя центрифугированием через слой 5% сахарозы. Осадок ресуспендировали в воде и добавляли SDS до 1% для получения прозрачного раствора. Растворы фотометрировали на спектрофотометре NanoDrop 2000. Об эффективности элекропорации судили по отношению оптических плотностей при 600 и 260 нм растворов спермы, с учётом поглощения трипанового синего при 260 нм.

Количество красителя, осаждаемого совместно со спермиями, линейно возрастало с увеличением числа электрических импульсов. Увеличение концентрации красителя в 2 раза приводило к пропорциональному увеличению его соосаждения со спермиями. Таким образом, в рамках разработки метода переноса генов в геном с целью трансгеноза у птицы, с использованием спермиев в качестве вектора переноса, определен диапазон физико-химического воздействия на спермии петухов, в пределах которого наблюдается образование пор в оболочке спермиев, и спермии сохраняют подвижность.

Литература.
1. Brackett B.G., Baranska W., Sawicki W., Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1971. – V. 68. – N 2. – P. 353-357.
2. Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V.M., Dolci S., Farace M.G., Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice // Cell. – 1989. – V. 57. – N 5. – P. 717-723.
3. Nakanishi A., Iritani A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods // Mol Reprod Dev. – 1993. – V. 36.

– N 2. – P. 258-261.
4. Фисинин В.И., Карапетян Р.В., Коршунова Л.Г. Использование спермиев в качестве вектора переноса чужеродной ДНК в яйцеклетки кур // Достижения в современном птицеводстве. Исследования и инновации: материалы XVI конференции Российского отделения Всемирной научной ассоциации по птицеводству. – Сергиев Посад, 2009. – С. 67-68.
5. Коршунова Л.Г., Карапетян Р.В., Фисинин В.И. Методы генетической модификации и селекция сельскохозяйственной птицы // Сельскохозяйственная биология. – 2013. – № 6. – С. 3-15.
6. Gagne M.B., Pothier F., Sirard M.A. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes // Mol Reprod Dev. – 1991. – V. 29. – N 1. – P. 6-15.
7. Rieth A., Pothier F., Sirard M.A. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events // Mol Reprod Dev. – 2000. – V. 57. – N 4. – P. 338-345.

UDC 573.6:636.52/.58

THE EFFECT OF ELECTROPORATION OF COCKEREL SPERM CELLS ON INDUCTION OF TRANSGENESIS IN CHICKEN

Korshunova L.G., Karapetyan R.V., Ziadinova O.F., FisininV.I.

Federal State Budget Scientific Institution Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute" of Russian Academy of Sciences
Sergiev Posad, Russia
Ptitsegradskaya Str., 10, Sergiev Posad, Moscow Province, 141311 Russia
E-mail: lg@vnitip.ru

Summary. The efficiency of the electroporation of sperm cells of cockerels for subsequent use as a vector for introduction of the transgenesis in poultry was studied.

Key words: chicken, sperm cell, electroporation, transgenesis.

The induction of trangenesis in poultry using sperm cells as transgenic vectors is a promising technology since it is cost effective and based on standard and widely spread technique of artificial insemination. Mammal sperm cells as vectors for genetic transformation have been used in pioneer studies back in 1971 [1], then in 1989 [2]; in the later body of research different animal and poultry species were involved [3-5]. These results seem prospective and promote further investigations on this technology. Electroporation is a relatively new method in genetic engineering [6; 7]. Moreover, it's rather physical than biochemical method and hence can be more reproducible.

The study was performed on sperm of white leghorn cockerels housed individually in the Institute's vivarium. Fresh sperm samples collected from 2-4 cockerels were mixed and diluted (x10) with sterile normal saline; sperm cells were centrifuged and suspended in hypoosmolar electroporation buffer (Eppendorf). Electroporation was performed on Eppendorf Multiporator in 400 µl cuvettes with 0.2 cm gap. The regime: voltage 600 V (3000 V/cm), pulse spatial length 50 µsec, from 1 to 4 pulses per sample. Sperm cell motility after the treatment was controlled to check sperm viability.

Pore formation was controlled using Trypan Blue for microscopy (Merck Millipore) which cannot diffuse through undamaged cell membranes (0.50 and 0.25 mg/ml of suspension). After treatment with electric impulse unbound pigment was eliminated via centrifugation through the layer of 5% sucrose. The precipitate was resuspended in water and diluted with SDS to 1% resulting in transparent solution. The samples of these solutions were analyzed on NanoDrop 200 spectrophotometer; the electroporation efficiency criterion was the ratio of optical densities at 600 and 260 nm, adjusted for the partial absorption of Trypan Blue at 260 nm.

The amount of the pigment coprecipitated with sperm cells increased linearly with the increase in pulse numbers. Two-fold increase in pigment concentration led to a proportional increase in pigment coprecipitation. The effective parameters were therefore determined for physicochemical treatment of cockerel sperm cells to induce pore formation in cell membrane while preserving sperm viability. This technique could be used in sperm-vectored gene transfer to induce transgenesis in poultry.

References:
1. Brackett B.G., Baranska W., Sawicki W., Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1971. – V. 68. – N 2. – P. 353-357.
2. Lavitrano M., Camaioni A., Fazio V.M., Dolci S., Farace M.G., Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice // Cell. – 1989. – V. 57. – N 5. – P. 717-723.

3. Nakanishi A., Iritani A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods // Mol Reprod Dev. – 1993. – V. 36. – N 2. – P. 258-261.
4. Karapetyan R.V., Korshunova L.G., Fisinin V.I. Serm cells as vector for the transfer of foreign DNA into the germinal cells in poultry. Proc. Conf. "Oriented Fundamental Research and Application in Agriculture", Sankt-Petersburg, Russia, 2008. P. 55-56.
5. Korshunova L. G., Karapetyan R. V., Fisinin V. I. Methods of genetic modification and breeding of poultry / Agricultural biology. – 2013. – No. 6. – S. 3-15
6. Gagne M.B., Pothier F., Sirard M.A. Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes // Mol Reprod Dev. – 1991. – V. 29. – N 1. – P. 6-15.
7. Rieth A., Pothier F., Sirard M.A. Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events // Mol Reprod Dev. – 2000. – V. 57. – N 4. – P. 338-345.

УДК 636.52/.58.084.524

ОБОГАЩЕНИЕ ПИЩЕВЫХ ЯИЦ ОРГАНИЧЕСКИМИ ФОРМАМИ ОМЕГА-3 ПНЖК, СЕЛЕНА И ВИТАМИНА Е

Кавтарашвили А.Ш, Стефанова И.Л., Свиткин В.С., Новоторов Е.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук, г. Сергиев Посад, Россия
141311, Московская область, г. Сергиев Посад-11, ул. Птицеградская, д. 10.
E-mail: alexk@ vnitip.ru

Изучали влияние комбикормов кур-несушек, обогащенных комплексом органических форм селена и омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, витамина Е на содержание их в пищевых яйцах.

Ключевые слова: куры, комбикорма, пищевые яйца, полиненасыщенные жирные кислоты омега-3, селен, витамин Е.

В последнее время в мире устойчиво растет интерес к функциональным продуктам питания, обогащенных различными биологически активными веществами (БАВ) или их комплексами в концентрациях, значительно превышающих их содержание в нефункциональных аналогах. Эти продукты, оказывая положительное действие на физиологические процессы в организме человека, благотворно влияют на его здоровье за счет снижения риска возникновения различных заболеваний. Для превращения в функциональные продукты питания, прекрасно подходят куриные яйца, прежде всего за счёт высокой эффективности переноса БАВ из кормов для птицы в яйцо.

Нами были разработаны и испытаны образцы рационов кур-несушек с повышенным содержанием комплекса селена, витамина Е и омега-3 жирных кислот. В контрольном рационе содержание Омега-6 и Омега-3 и ПНЖК составило 3,62 и 0,14% соответственно, а их соотношение 25,9:1; содержание витамина Е – 10 г, чистого элемента селена, источником которого являлся «Селенит натрия» – 0,2 г на тонну комбикорма. В опытных рационах 2 и 3 содержание Омега-6 и Омега-3 ПНЖК составило 2,09 и 1,97% соответственно, а их соотношение 1,06:1; содержание витамина Е – 100 г, чистого элемента селена – 0,5 г на тонну комбикорма. В опытных рационах 4, 5 и 6 содержание Омега-6 и Омега-3 ПНЖК составило 1,82 и 2,35% соответственно, а их соотношение 0,77:1; содержание витамина Е – 150 г, чистого элемента селена – 0,5 г на тонну комбикорма. Источником селена в рационах 2 и 4 являлся «Сел-Плекс», в рационах 3 и 5 – «Дафс-25» в рационе 6 – «Селенит натрия». Источниками Омега-3 ПНЖК в рационах 2–3 были 3% льняное масло и 5% жмых семени льна, а в рационах 4–6 – 3% льняное масло и 10% жмых семени льна. Все рационы были уравнены и сбалансированы по всем основным показателям питательности, витаминами, макро- и микроэлементами (за исключением изучаемых факторов) согласно рекомендуемым нормам. В них вводили ферментные препараты Фидбест W (содержит ксиланазу и β-глюканазу) и Фидбест P (содержит фермент 3-фитазу) по 0,01%.

Установлено, что опытные рационы позволили по сравнению с контролем повысить отложение в съедобной части яйца ω-3 полиненасыщенных жирных кислот в 4,5–4,7 раза (при соотношении ω-6 к ω-3 – 1,7–2,1:1 против 12,7:1 в контроле), в т.ч. альфа-линоленовой кислоты – в 7,5–8,4 раза, эйкозапентаеновой кислоты – в 1,8–2,4 раза, докозапентаеновой – в 3,2–3,4 раза, докозагексаеновой кислоты – в 2,3–2,7

раза; селена – в 1,5–2,2 раза и витамина Е – в 2,0–3,5 раза при повышении яйценоскости кур на 0,6–4,0%, выхода яичной массы на несушку – на 0,3–8,4% и снижении затрат кормов на 10 яиц и 1 кг яичной массы на 5,1–8,0 и 4,1–9,4% соответственно.

Исследование финансировалось Российским Научным Фондом, Грант № 16-16-04047.

UDC 636.52/.58.084.524

ENRICHMENT OF TABLE CHICKEN EGGS WITH ORGANIC FORMS OF N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, SELENUIM, AND VITAMIN E

Kavtarashvili A.Sh., Stefanova I.L., Svitkin V.S., Novotorov E.N.

Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute" of Russian Academy of Sciences, Sergiev Posad, Russia
Ptitsegradskaya Str, 10, Sergiev Posad, Moscow Province, 141311 Russia.
E-mail: alexk@vnitip.ru

The influence of dietary levels and forms of organic selenium sources, n-3 polyunsaturated fatty acids, and vitamin E in diets for laying hens on the concentrations of these bioactive substances in table eggs was studied.

Key words: chicken, compound feeds, table eggs, n-3 polyunsaturated fatty acids, selenium, vitamin E.

In recent decades an interest towards functional foodstuffs enriched with different bioactive substances in concentrations substantially higher compared to similar non-functional products is constantly grows worldwide. These foodstuffs are beneficial for consumer health due to the positive effects on physiological processes in human and hence can prevent different diseases. Table chicken eggs could be easily made functional, primarily due to the highly effective transfer of bioactive substances from layer diet to the eggs.

The experimental diets for laying hens containing high amounts of complex of selenium, n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and vitamin E were formulated and tested. In control diet concentrations of n-6 and n-3 PUFAs were 3.62 and 0.14% respectively (n-6/n-3 ratio 25.9:1), concentration of vitamin E 10 ppm, concentration of selenium (as sodium selenite) 0.2 ppm. In experimental diets 2 and 3 concentrations of n-6 and n-3 PUFAs were 2.09 and 1.97% respectively (n-6/n-3 ratio 1.06:1), concentration of vitamin E 100 ppm, selenium 0.5 ppm. In experimental diets 4, 5, and 6 concentrations of n-6 and n-3 PUFAs were 1.82 and 2.35% respectively (n-6/n-3 ratio 0.77:1), concentration of vitamin E 150 ppm, selenium 0.5 ppm. Selenium sources were Sel-Plex (Alltech) in diets 2 and 4; "DAFS-25" (Russia) in diets 3 and 5; and sodium selenite in diet 6. The sources of n-3 PUFAs in diets 2 and 3 were 3% of flaxseed oil and 5% of flaxseed cake, in diets 4, 5, and 6 3% of flaxseed oil and 10% of flaxseed cake. All diets were balanced to be equal in contents of basic nutrients (protein, fat etc.), vitamins and trace elements (excluding Se and vitamin E). The diets were supplemented with 0.01% of enzymatic preparations Feedbest W (containing xylanase and β-glucanase activities) and Feedbest P (3-phytase activity).

Concentrations of total n-3 PUFAs in eggs from layers fed experimental diets were 4.5-4.7 times higher compared to control (n-6/n-3 ratio 1.7-2.1:1 compared to 12.7:1 in control); concentrations of α-linolenic acid (ALA) was 1.8-2.4 times higher, docosapentaenoic acid (DPA) 3.2-3.4 times higher, docosahexaenoic acid (DHA) 2.3-2.7 times higher, selenium 1.5-2.2 times higher, and vitamin E 2.0-3.5 times higher compared to control. Laying performance in experimentally fed layers was higher by 0.6-4.0%, egg mass output per layer higher by 0.3-8.4%, feed efficiency better by 5.1-8.0% (per 10 eggs) and 4.1-9.4% (per 1 kg of egg mass laid).

The study was financed by grant of Russian Science Foundation No 16-16-04047.

УДК 631.414.3;631.461.7.

ФИТОГОРМОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА КОМПЛЕКСНЫХ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЯХ КЛЕТОК BACILLUS SUBTILIS BS-26

Закирьяева С.И., Джуманиязова Г.И.

Институт микробиологии Академии Наук Республики Узбекистан,

100125, Узбекистан, Ташкент, ул. Дурмон йули, 30
E-mail: szakiryaeva@mail.ru

Изучение фитогормональной активности иммобилизованных на универсальных комплексных минеральных удобрениях FAN-AGRO 07 клеток B. subtilis BS-26 показало более активное выделение ИУК и гиббереллина по сравнению со свободными клетками.
Ключевые слова: индолил-3-уксусная кислота, гиббереллин, иммобилизация, универсальные комплексные минеральные удобрения FAN-AGRO 04 и FAN-AGRO 07.

Большинство физиологических процессов, в первую очередь рост, формообразование и развитие растений, регулируется гормонами. Гормоны играют ведущую роль в адаптации растений к условиям среды. Наибольшее внимание уделяется роли бактериальных фитогормонов в стимуляции роста и питания растений, поскольку способность синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) и гиббереллины широко распространена среди бактерий.

Нами совместно с УзНИИ овоще-бахчевых культур и картофеля создан новый биопрепарат комплексного действия FOSSTIM-3 для обработки семян овощных культур и клубней картофеля на основе нового почвенного штамма B. subtilis BS-26 с полифункциональными свойствами (патент UZ IAP № 04712, 2013г.). С целью повышения коэффициента усвояемости растениями вносимых минеральных удобрений нами проведена иммобилизация клеток B. subtilis BS-26

на стерилизованные носители - минеральные удобрения FAN-AGRO 04 (N - 17%, P2O5 – 7,4%, K2O – 14%) и FAN-AGRO 07 (N - 20%, P2O5 – 14%, K2O – 6,0%), предоставленные ООО «FAN - DON». Выживаемость иммобилизованных на носителях клеток проверяли через 1, 3, 6 и 12 месяцев хранения при комнатной температуре. Установлено, что через 12 месяцев хранения на FAN-AGRO 04, титр жизнеспособных клеток составлял 4,0x108 КОЕ/г, на FAN-AGRO 07 – 2,0 x108 КОЕ/г при исходном титре 7,0x1010 КОЕ/г.

Целью настоящих исследований было изучение сохранности фитогормональной активности иммобилизованных на универ¬сальных комплексных минеральных удобрениях FAN-AGRO 04 и FAN-AGRO 07 клеток B. subtilis BS-26 через год хранения.

Продуцирование индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и гиббереллинов определяли в динамике культивирования в жидкой питательной среде. Результаты исследований выявили, что иммобилизованные на универ¬сальных комплексных минеральных удобрениях FAN-AGRO 07 клетки B. subtilis BS-26 более активно выделяли ИУК от 52,5 мкг/мл до 70,1 мкг/мл и гиббереллин - от 307,2 мкг/мл до 1484,2 мкг/мл, начиная с 3-х суток опыта. Иммобилизованные на FAN-AGRO 04 клетки B. subtilis BS-26 синтезировали ИУК - от 34,9 мкг/мл до 55,2 мкг/мл и гиббереллин - от 214,9 мкг/мл до 1068,8 мкг/мл, тогда как свободные клетки синтезировали ИУК - от 43,0 мкг/мл до 59,2 мкг/мл и гиббереллин - от 291,8 мкг/мл до 1153,4 мкг/мл.

Изучение фитогормональной активности иммобилизованных на универ¬сальных комплексных минеральных удобрениях FAN-AGRO 04 и FAN-AGRO 07 клеток B. subtilis BS-26 через год хранения выявило, что иммобилизованные на FAN-AGRO 07 клетки B. subtilis BS-26 более активно синтезировали ИУК и гиббереллин по сравнению с иммобилизованными на FAN-AGRO 04 клетками.

Таким образом, установлено, что иммобилизованные на FAN-AGRO 07 клетки лучше сохранили свою фитогормональную активность по сравнению со свободными клетками.

UDC 631.414.3;631.461.7.

PHYTOHORMONAL ACTIVITY OF BACILLUS SUBTILIS BS-26 CELLS IMMOBILIZED ON COMPLEX MINERAL FERTILIZERS

Zakiryaeva S.I., Djumaniyazova G.I.

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
100125, Tashkent, Uzbekistan, 30 Durmon yuli str.
E-mail: szakiryaeva@mail.ru

Study of phytohormonal activity of immobilized cells on universal complex mineral fertilizers FAN-AGRO 07 Bacillus subtilis BS-26 have showed more active exudation of indoleacetic acid (IAA) and gibberellins compared with free cells.

Key words: indole-3-acetic acid, gibberellin, immobilization, universal complex mineral fertilizers FAN-AGRO 04 and FAN-AGRO 07

Majority of physiological processes in the first place growth, morphogenesis and development of plant are regulated by hormones. Hormones play a leading role in adaptation of plants into environmental conditions. Great attention is given to importance of bacterial phytohormones in growth stimulation and nutrition of plants, since ability to synthesize indole-3-acetic acid (IAA) and gibberellins had spread among bacteria.

In cooperation with Scientific Research Institute of Uzbekistan for vegetables, melons and potato we developed biopreparation FOSSTIM-3 with ability of complex action for treatment of vegetable seeds and potato tubers on the basis of new soil strain B. subtilis BS-26 with polyfunctional properties (Patent UZ IAP No.04712, 2013). To improve ratio of assimilability of introduced mineral fertilizers by plants we have conducted immobilization of B. subtilis BS-26 cells on aseptic carriers - mineral fertilizers FAN-AGRO 04 (N - 17%, P2O5 – 7.4%, K2O – 14%) and FAN-AGRO 07 (N - 20%, P2O5 – 14%, K2O – 6.0%), provided by "FAN – DON" Ltd. Survival rate of cells immobilized on carriers was examined after storage of 1, 3, 6 and 12 months in room temperature. It was established, that After 12 months of storage on FAN-AGRO 04 titers of vital cells were 4.0x108 CFU/g, and on FAN-AGRO 07 – 2.0 x108 CFU/g, on initial titer 7.0x1010 CFU/g.

The purpose of the present research was to explore preservation of phytohormonal activity of FAN-AGRO 04 and FAN-AGRO 07 B. subtilis BS-26 cells immobilized on universal complex mineral fertilizers after one year storage. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins were identified in dynamics of cultivation on liquid nutrient medium.

Results of studies showed that B. subtilis BS-26 cells which immobilized on universal complex mineral fertilizers FAN-AGRO 07 more active exuded of IAA starting from 3rd experiment day from 52.5 µg/ml to 70.1 µg/ml and gibberellins from 307.2 µg/ml to 1484.2 µg/ml.

Cells of B. subtilis BS-26, which immobilized on FAN-AGRO 04 have been synthesized IAA from 34.9 µg/ml to 55.2 µg/ml, and gibberellins from 214.9 µg/ml to 1068.8 µg/ml, whereas free cells synthesized IAA from 43.0 to 59.2 µg/ml, and gibberellins from 291.8 to 1153.4 µg/ml.

Investigation of phytohormonal activity of immobilized on universal complex mineral fertilizers FAN-AGRO 04 and FAN-AGRO 07 cells B. subtilis BS-26 after a year storage it was revealed that B. subtilis BS-26 cells immobilized on FAN-AGRO 07 more actively synthesized IAA and gibberellins in comparison with immobilized on FAN-AGRO 04.

Thus, it was revealed that immobilized on FAN-AGRO 07 cells stored their phytohormonal activity better than free cells.

УДК 579.64; 632.4;631.461.73;633.511.

ИММОБИЛИЗОВАНЫЕ КЛЕТКИ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ РИЗОБАКТЕРИЙ В БИОКОНТРОЛЕ БОЛЕЗНЕЙ ХЛОПЧАТНИКА

Закирьяева С.И., Джуманиязова Г.И., Нарбаева Х.С.

Институт микробиологии Академии Наук Республики Узбекистан,
100125, , Узбекистан, Ташкент, ул. Дурмон йули, 30
E-mail: szakiryaeva@mail.ru

Изучена антагонистическая активность иммобилизованных клеток солеустойчивых фосформобилизующих ризобактерий хлопчатника к фитопатогенным грибам. Выявлено, что при длительном сроке (4 лет) хранения ризобактерий на фосфоритной муке и каолине штаммы лучше сохраняли свою антагонистическую активность.

Ключевые слова: антагонистическая активность, фитопатогены хлопчатника, солеустойчивых фосформобилизующих ризобактерии, иммобилизованные и свободные клетки.

В настоящее время в нашей стране и за рубежом растет интерес к экологически чистым и сравнительно безопасным в применении микробиологическим препаратам. Их преимущество по сравнению с химическими средствами защиты растений заключается в отсутствии отрицательного влияния на окружающую среду и получении продукции без остаточных количеств пестицидов. Кроме того, исключается появление резистентных к биопрепаратам форм патогенных организмов. В природе сохраняются полезные виды микроорганизмов и насекомых, которые сдерживают развитие вредных видов.

В связи с этим, в Институте Микробиологии АН РУз, в лаборатории почвенной микробиологии создана жидкая форма биопрепарата комплексного действия RIZOKOM-1 на основе ассоциации из 4х местных ризобактерий хлопчатника с полифункциональными свойствами: Bacillus subtilis BS-80 (accession number of GenBank: KY041889), B. licheniformis BL-83 (accession number of GenBank: KY041694), Paenibacillus polymyxa

PP-113 (accession number of GenBank: KY041978) and P. amylolyticus PA-118 (accession number of GenBank: KY041979).

Установлено, что взаимодействие микроорганизмов с высокодисперсными материалами повышает физиологическую активность культур, а также их выживание в почвах и в лабораторных условиях в различных препаративных формах.

В связи с этим целью наших исследований было изучение сохранности антагонистической активности иммобилизованных на стерильных носителях клеток солеустойчивых ризобактерий к фитопатогенным грибам хлопчатника после 4 лет хранения.

Изучена антагонистическая активность иммобилизованных клеток солеустойчивых ризобактерий хлопчатника по отношению к фитопатогенным грибам Verticillium dahliae, Alternaria alternata 63, Fusarium solani, F. oxysporum 173, F. vasinfectum 181 и F. oxysporum f.sp vasinfectum R-7, вызывающих вертициллезный и фузариозный вилт, корневую гниль и альтернариоз. Иммобилизованные клетки B. subtilis BS-80 активно ингибировали рост всех изученных фитопатогенов хлопчатника, d зоны подавления роста составлял: для A.alternata 63 – от 22±0,33 мм до 40±0,44 мм, у свободных клеток этот показатель был равен 18±0,58 мм, для V. dahliae – от 26±0,33 мм до 30±0,44 мм (у свободных клеток - 22±0,60 мм), для F. solani - от 28±0,33 мм до 42±0,33 мм (у свободных клеток - 18±0,44 мм), для F.oxysporum 173 - от 30±0,33 мм до 36±0,33 мм (у свободных - клеток 26±0,58 мм), для F. vasinfectum 181 – от 26±0,33 мм до 35±0,33 мм, (у свободных - клеток - 20±0,44 мм). Аналогичные данные были получены и с иммобилизованными клетками ризобактерий хлопчатника B. licheniformis BL-83, P. polymyxa PP-113 и P. amylolyticus PA-118.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что иммобилизованные клетки ризобактерий хлопчатника при длительном сроке (4 лет) хранения лучше сохранили свою антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным грибам хлопчатника, по сравнению со свободными клетками. В качестве носителя для адсорбционной иммобилизации клеток ризобактерий хлопчатника можно использовать фосфоритную муку и на ее основе приготавливать сухую форму биопрепарата комплексного действия RIZOKOM-1.

.....

UDC 579.64; 632.4;631.461.73;633.511.

IMMOBILIZED CELLS OF SALT-TOLERANT RHIZOBACTERIA AS BIOCONTROL OF COTTON DISEASES

Zakiryaeva S.I., Djumaniyazova G.I., Narbaeva Kh.S.

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
100125, Uzbekistan, Tashkent, 30 Durmon yuli str.
E-mail: szakiryaeva@mail.ru

It has been studied antagonistic activity of the immobilized cells of salt tolerant and phosphorus mobilizing rhizobacteria of cotton on phytopathogenic fungi. It has been determined that storage of rhizobacteria during longer period (4 years) on phosphorite flour and kaolin, strains stored their antagonistic activity better.

Key words: Antagonistic activity, cotton phytopathogens, salt-tolerant and phosphorus mobilizing rhizobacteria, immobilized and free cells.

Nowadays in our country and abroad increases is of interest application of microbiological preparations that are ecological pure and relatively safe. Their advantages comparing to agents of chemical plant protection conclude absence of negative impact on environment and obtaining products without pesticide residue. Furthermore, it is precluded from appearance of pathogenic organism forms that resistant to biopreparation. Useful species of microorganisms and insects, which suppress development of harmful species preserve in nature.

In connection with that in the Soil Microbiology laboratory of the Institute of Microbiology AS RUz it was developed liquid form of biopreparation RIZOKOM-1 with complex action on basis of association of 4 local cotton rhizobacteria Bacillus subtilis BS-80 (accession number of GenBank: KY041889), B. licheniformis BL-83 (accession number of GenBank: KY041694), Paenibacillus polymyxa PP-113 (accession number of GenBank: KY041978) and P. amylolyticus PA-118 (accession number of GenBank: KY041979), which have polyfunctional properties. It was established that interaction of microorganisms with fain-grained materials can improve physiological activity of culture, as well as their survival in soils and in laboratory conditions on different preparative forms.

In this regard the purpose of our research was to investigate preservation of antagonistic activity of cells,

immobilized on sterile carriers, of salt tolerant rhizobacteria to phytopathogenic fungi of cotton after 4 years storage.

Antagonistic activity was the immobilized cells of salt-tolerant rhizobacteria of cotton to phytopathogenic fungi Verticillium dahliae, Alternaria alternata 63, Fusarium solani, F. oxysporum 173, F. vasinfectum 181 and F. oxysporum f.sp vasinfectum R-7, that provoke verticilliose and fusarium wilt, root rot and blackspot.

Immobilized cells of B. subtilis BS-80 have actively inhibited development of all studied cotton phytopathogenes, d zones of growth inhibition consisted: for A.alternata 63 – from 22±0.33 mm to 40±0.44 mm, where free cells indicated 18±0.58 mm, for V. dahliae – from 26±0.33 mm to 30±0.44 mm (free cells rate - 22±0.60 mm), for F. solani - from 28±0,33 mm to 42±0,33 mm (free cells rate - 18±0,44 mm), for F.oxysporum 173 - from 30±0.33 mm to 36±0.33 mm (free cells rate - 26±0.58 mm), for F. vasinfectum 181 – from 26±0.33 mm to 35±0.33 mm, (free cells rate - 20±0.44 mm). Similar records were obtained also with immobilized cells rhizobacteria of cotton B. licheniformis BL-83, P. polymyxa PP-113 and P. amylolyticus PA-118.

Thus, based on conducted research works it can be concluded that immobilized cells of cotton rhizobacteria preserved their antagonistic activity better towards to phytopathogenic fungi of cotton than free cells during long period (4 years) of storage. Phosphorite flour can be used as carrier for adsorptive immobilized cells of cotton rhizobacteria and developed dry form of biopreparation RIZOKOM-1 with complex action on its basis.

УДК 619:616.34

ИННОВАЦИОННЫЙ СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

Портянко А.В.[1], Лыско С.Б.[1], Волохова Л.П.[2]

[1] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Сибирский научно-исследовательский институт птицеводства»
644555, Россия, Омская область, с.Морозовка, ул. 60 лет Победы, д. 1
E-mail: vet@sibniip.ru
[2] Научно-производственный центр «Элюсан»
644042, Россия, Омск, пр-т. Карла Маркса, 18/1,
E-mail:info@pepidol.ru

В опытах in vitro отобран препарат на основе пектина, обладающий высокой бактерицидной активностью на возбудителей кишечных инфекций птиц. Разработан и апробирован инновационный способ профилактики ассоциированной кишечной инфекции цыплят-бройлеров с использованием препарата Пепидол.

Ключевые слова: профилактика, кишечные инфекции, пектин, Пепидол, цыплята-бройлеры.

Одна из актуальных проблем современного промышленного птицеводства — высокая заболеваемость и гибель цыплят от кишечных инфекций, возбудителями которых являются ассоциации патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В птицеводстве для профилактики кишечных инфекций применяют антибиотики широкого спектра действия, преимущественно импортного производства. Нарушения наставлений по их применению приводят к развитию лекарственной устойчивости у возбудителей и побочным действиям в организме птиц (дисбактериозы, иммунодефициты, реинфекции). Потребление продуктов птицеводства, содержащих антибиотики, наносит вред здоровью человека [1, 2, 3, 4].

Альтернативой антибиотикам могут являться растительные препараты на основе пектина, обладающие широким спектром физиологической и биологической активности, экологически безопасные, не имеющие побочных действий. Высокая эффективность и безвредность препаратов делают их перспективными для применения в птицеводстве.

В опытах in vitro изучены бактерицидные свойства различных концентраций 4 образцов препаратов на основе пектина (производитель НПЦ «Элюсан» г. Омск), различных по сырьевому происхождению, на 8 тест-культурах возбудителей, выделенных от цыплят-бройлеров с признаками кишечных инфекций. Доказано, что данные препараты обладают антимикробной активностью в отношении возбудителей кишечных инфекций птиц, которая повышается при увеличение их концентрации и времени взаимодействия с микроорганизмами. Отобран препарат на основе пектина «Я» (Пепидол), обладающий наиболее выраженным бактерицидным действием.

Установлена профилактическая эффективность препарата Пепидол при экспериментальной и спонтанной ассоциативной кишечной инфекции цыплят-бройлеров in vivo. Определены оптимальные схемы применения препарата. Доказанно бактерицидное, противовоспалительное, связывающее и пребиотиче-

ское действие препарата Пепидола в организме цыплят-бройлеров, что позволяет защитить их организм от возбудителей и токсинов, предупреждает развитие инфекционного процесса, нормализует микрофлору кишечника. Выявлено стимулирующее влияние препарата на обмен веществ, неспецифическую резистентность и поствакцинальный иммунитет цыплят. Разработан инновационный способ профилактики кишечных инфекций, применение которого повышает сохранность цыплят-бройлеров на 1,0%, живую массу — на 3,1%, прибыль — на 27,7%, рентабельность производства — на 10,3%, обеспечивает получение экологически безопасной продукции птицеводства и является альтернативой импортным препаратам.

Литература.
1. Микробиологический мониторинг бактериальных болезней птиц / С.Б. Лыско [и др.] // Птица и птицепродукты. 2016. №1. С. 51-53.
2. Антимикробное действие пектинов на условно-патогенную микрофлору кишечника цыплят / А.В. Портянко [и др.] // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2015. Том 222 (2). С. 180-186.
3. Бактерицидная активность пектинов на возбудителей кишечных инфекций птиц / А.В. Портянко [и др.] // Птица и птицепродукты. 2015. №3. С.50-52.
4.Черных М.Н., Федотов С.В. Неспецифическая профилактика ассоциированных инфекций // Птицеводство. 2008. №11. С. 23-24.

UDC 619:616.34

AN INNOVATIVE WAY OF PREVENTION OF INTESTINAL INFECTION OF BROILER CHICKENS

Portyanko A.V. [1], Lysko S.B. [1], Volokhova L.P. [2]

[1] Siberian Research Institute of Aviculture
644555,Russia, Omsk oblast, Morozovka Settlement, 60 Let Pobedy Street,1
E-mail: vet@sibniip.ru
[2] Elusan Co.
644042, Russia, Omsk, K.Marksa Street, 18/1
E-mail: info@pepidol.ru

Summary: In experiments in vitro the pectin-based drug was selected which has high bactericidal activity on causative agents of intestinal infections of birds. An innovative way of prevention of associated intestinal infection of broiler chickens was worked out and tested with using of preparation Pepidol.

Key words: prevention, intestinal infections, pectin, Pepidol, broiler chickens

One of the actual problem of modern industrial poultry farming is high morbidity and death of chickens from intestinal infections which activators are associations of pathogenic and opportunistic microorganisms. In poultry farming for prevention of intestinal infections antibiotics of a broad spectrum of activity are used and they are mainly import production. However, they exert negative impact on an organism of birds, they collect in poultry farming products and do harm to human health. At long-term application antibiotics become inefficient owing to high stability of activators.

Vegetable preparations on the basis of pectin having a wide range of physiological and biological activity, ecologically safe not having side effects may be alternative to antibiotics. High efficiency and harmlessness of preparations make them perspective for using in poultry farming.

In experiments in vitro bactericidal properties of various concentration of 4 samples of preparations on the basis of pectin which are different on raw origin (LLC NPTs “Elyusan” producer Omsk) were studied on 8 test cultures of the activators excreted from broiler chickens with symptoms of intestinal infection. It is proved that experimental samples of pectin have antimicrobic activity concerning causative agents of intestinal infections of birds which raises at increase of their concentration and at time of interaction with microorganisms. The preparation on the basis of pectin “Ya” (Pepidol) having the most expressed bactericidal action was selected.

Prophylactic efficiency of preparation Pepidol was established in case of experimental and spontaneous associative intestinal infection of broiler chickens in vivo. Optimum schemes of use of preparation was determined. The bactericidal, antiinflammation, connecting and prebiotic effect of preparation Pepidol in an organism of broiler chickens was proved what allows to protect their organism from activators and from toxins it prevents development of infectious process and it normalizes intestinal microflora. The stimulating influence of preparation on a metabolism, nonspecific resistance and vaccine-challenged immunity of chickens was revealed. The innovative

method of prophylaxis of intestinal infections which application increases safety of broiler chickens for 1.0%, live weight – for 3.1%, profits – for 27.7%, profitability of production – for 10.3% was developed. It provides receiving of ecological safe products of poultry farming and is an alternative to import preparations.

References:.
1.Microbiological monitoring of bacterial diseases of birds / S.B. Lysko [et al.] // Ptica i pticeprodukty. 2016. Vol.1. P. 51-53.
2.Antimicrobial action of pectin on conditionally pathogenic microflora of broilers bowels / A.V. Portyanko [et al.] // Uchenyie zapiski KGAVM im. N.E. Baumana. 2015. T.222(2). P. 180-186.
3.Germicide activity of pectins on the pathogens of intestinal infections of birds / A.V. Portyanko [et al.] // Ptica i pticeprodukty. 2015. Vol.3. P. 50-52.
4.Chernyh M.N., Fedotov S.V. Non-specific prevention of associated infections // Pticevodstvo. 2008. Vol.11. P. 23-24.

УДК 67.08

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОЭНЕРГЕТИКИ В РЕГИОНАХ С ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫМ МОРОЗНЫМ ПЕРИОДОМ

Кадысева А.А.

ИПИ им. П.П. Ершова (филиал) ФГАОУ ВО ТюмГУ
Ишим, Россия, 627756, Тюменская обл. Ишим, ул. Ленина, д. 1
e-mail: kadyseva@mail.ru

Разработка современных путей повышения эффективности анаэробных методов обработки органических отходов АПК при использовании в суровых низкотемпературных климатических условиях, на основе оптимизации видового состава и функционирования метаногенных сообществ микроорганизмов с учетом современных достижений микробиологии и молекулярной биологии.

Ключевые слова: биогаз, метан, анаэробные методы обработки, отходы животноводства, метаногены.

Увеличение объемов продукции растениеводства и животноводства является одним из приоритетных направлений деятельности на всей территории Российской Федерации. Увеличение продукции животноводства способствует выделению большого количество органосодержащих отходов. С одной стороны, органические отходы, в частности, навоз, представляет серьезную экологическую проблему, особенно, в местах ее массового хранения. С другой стороны, она имеет высокую ценность для генерации биоэнергии, что положительно скажется на развитии биоэкономики. Хотя идея производства биоэнергии из органических отходов животного происхождения не является новым но, его реализация сдерживается климатическими условиями (длинные и суровые зимы на 80% территории России).

Современный уровень развития анаэробных технологий обработки позволяет с помощью микроорганизмов утилизировать органосодержащие отходы в безвредные и обеззараженные продукты и получить при этом газ, пригодный для промышленных нужд. Анаэробная обработка имеет целый ряд преимуществ перед другими методами обработки органических отходов, но, несмотря на это, методы анаэробного сбраживания до сих пор не нашли широкого применения в промышленности и сельском хозяйстве [1]. Анаэробная деструкция органических загрязнений в биометан, это сложный биохимический процесс, осуществляемый микробными сообществами при отсутствии кислорода. Сообщества анаэробных микроорганизмов - это сбалансированные метаногенные системы, участники которых находятся в тесной взаимосвязи друг с другом. Современное развитие методов молекулярной биологии и генетики, позволят эффективно проанализировать консорциумы анаэробных микроорганизмов, выделить активных участников анаэробного процесса. На основе полученных данных адаптировать существующие анаэробные технологии переработки отходов животноводства для работы в регионах с продолжительными морозными периодами в экономически рентабельные.

В связи с этим необходимо разработать технологические принципы функционирования систем анаэробной обработки отходов животноводства в низкотемпературных природно-климатических условиях. Провести оценку видов и объемов органосодержащих отходов, имеющихся в регионе исследований, с учетом потенциала производства биогаза. Определить видовой и функциональный состав анаэробных сообществ микроорганизмов с применением современных методов микробиологии, молекулярной биологии и генетики. Адаптировать инокулят к низким температурам Разработать рекомендации по государственной поддержке и продвижению технологии производства биогаза.

Литература.
1. Кадысева А.А. Анаэробные методы обработки высоконагруженных органосодержащих отходов : дис .. канд. тех, наук - Щелково, 2007 - с. 220

PROSPECTS FOR BIOENERGY DEVELOPMENT IN A REGION WITH LONG-LASTING FROSTY CLIMATE

Kadyseva A.A.

Teachers' Training Institute named after P.P. Ershov (Branch) of theFederal State Budgetary Educational Institution of Higher Vocational Education «Tyumen State University» (Ishim, Russia)
Ishim Pedagogical Institute named after P.P. Yershov (branch) Tyumen State University 1, Lenina str., Ishim, Russian Federation E-mail: kadyseva@mail.ru

Development of modern ways for increasing efficiency of anaerobic treatment methods for agro-industry organic wastes, during application under adverse low-temperature climatic conditions, on the basis of species composition and methanogenic microorganic communities with regard to the current achievements of microbiology and molecular biology.

Key words: biogas, methane, anaerobic treatment methods, animal wastes, methanogens.

Increase in crop growing and animal breeding production amount is one the priority areas throughout the entire territory of the Russian Federation. Increase in animal breeding production results in emission of great amount of organic substance wastes. On the one hand, organic wastes (manure, in particular) is a serious environmental problem, especially in the locations of its mass storage. On the other hand, it is of high value for bioenergy generation, which positively impacts bioeconomics development. Though the idea of bioenergy production of animal organic wastes is not a brand new one, but its implementation is restrained by climatic conditions. Current state of anaerobic treatment technologies enables recycling organic substance wastes into non-hazardous and decontaminated products by means of microorganisms, and gas producing, which is industrially applicable [1]. Anaerobic treatment has a number of advantages against other organic wastes treatment procedures, but, despite that, anaerobic fermentation methods have not become widely used in industry and agriculture. Anaerobic microorganic communities are well-balanced methanogenic systems which participants are strongly intercorrelated. The state-of-art molecular biology and genetics methods will provide the analysis of anaerobic microorganisms consortiums, and mark out the most active anaerobic process participants. On the basis of the obtained data, it is possible to adapt existing anaerobic technologies of animal breeding wastes recycling for application in regions with frost periods of long duration, and converse them in economically efficient ones.

For the purpose of widespread use of anaerobic technologies under low-temperature environmental and climatic conditions, the set of advanced measures is necessary, which shall include: assessment of organic substance wastes types and amounts, which are presented in the region of studies, with regard to biogas production opportunities; determination of species and functional composition of anaerobic microorganic communities with the use of advanced microbiology, molecular biology and genetics methods; adaptation of inoculum to low temperatures; elaboration of recommendations for government assistance and promotion of biogas production technology.

References:
1. Kadyseva A.A. 2007. Anaerobic processing methods of highly organic wastes. PhD thesis. All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, Schyolkovo

УДК 636:612.34:636.52/.58.085.16

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА МИКРОБИОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКА И ПРОДУКТИВНОСТЬ БРОЙЛЕРОВ

Егорова Т.А., Ленкова Т.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук, г. Сергиев

Посад, Россия
141311, Московская область, г. Сергиев Посад-11, ул. Птицеградская, д. 10.
E-mail: eta164@yandex.ru

Изучали эффективность пробиотических микроорганизмов для увеличения продуктивности бройлеров.

Ключевые слова: цыплята-бройлеры, пробиотик, продуктивность, микрофлора кишечника

Птицеводство является самой динамичной и наукоемкой отраслью животноводства. По производству яиц отрасль занимает 6–е место в мире, мяса – 4-е. На долю производства мяса птицы в стране приходится 46,8%. В 2016 году планируется довести его до 4575 тыс. т., при этом основная доля приходится на мясо бройлеров. Для достижения поставленных задач необходимо увеличить продуктивность птицы путем реализации ее генетического потенциала, обеспечить ее высокую сохранность, низкую себестоимость продукции, качественную и безопасную для питания человека продукцию.

Известно, что состав кормов оказывает непосредственное влияние на качественные и количественные характеристики микробного сообщества желудочно-кишечного тракта. Несбалансированное кормление цыплят приводит к нежелательным изменениям микробиоценоза, что является причиной снижения продуктивности и возникновения ряда заболеваний вследствие нарушения процессов пищеварения.

Нами было изучено изменение бактериального сообщества желудочно-кишечного тракта цыплят в онтогенезе. В качестве регуляторов микрофлоры кишечника использовали отечественные пробиотики.

Определено, что использование пробиотика «А2» позволяет повысить сохранность поголовья бройлеров, их продуктивность и эффективность использования корма.

Применение пробиотика «А2» ($1 \cdot 10^9$ КОЕ/г) в количестве 1 кг/т корма до 21-дневного возраста цыплят, затем 0,5 кг/т до конца откорма бройлеров способствует повышению сохранности птицы на 2,9%, живой массы – на 4,5%, снижению затрат кормов на 1 кг прироста живой массы на 4,5%.

Включение в комбикорма препарата в количестве 1 кг/т ($1 \cdot 10^9$ КОЕ/г) на протяжении всего периода выращивания цыплят увеличивает их живую массу на 5,1%, сохранность – на 2,9%, снижает затраты кормов на 1 кг прироста живой массы на 5,6%.

Использование концентрированного пробиотика ($1,5 \cdot 10^{12}$ КОЕ/г) путем выпойки в первую неделю выращивания бройлеров в количестве 0,015 г/гол./сут., затем 0,05 г гол./сут. в возрасте 11 – 13-, 15 – 16-, 18 – 20 дней обеспечивает в последующем при прекращении дачи препарата увеличение сохранности поголовья на 2,9%, живой массы – на 3,7%, снижение затрат корма на 3,9%. Физиологические исследования показали, что благодаря применению пробиотика «А2» у бройлеров отмечается улучшение переваримости и использования питательных веществ корма, что не могло не отразиться на увеличении их продуктивности. В толстом кишечнике птицы отмечено увеличение бифидо- и лактобактерий.

Результаты исследований пробиотика Лактоамиловорина на основе чистой культуры штамма Lactobacillus paracasei (Lactobacillus amylovorus БТ – 24/88) В-6253, выделенного из кишечника поросят, показали следующее:

Использование жидкого препарата пробиотика – Лактоамиловорина-КЖ путем выпойки цыплятам-бройлерам в течение первых четырех недель выращивания увеличивает их живую массу на 4,2%, снижает затраты кормов на 1 кг прироста живой массы на 2,8%. Включение сухого пробиотика Лактоамиловорина в количестве 1 кг на 1 т корма в течение аналогичного периода времени (первые 4 недели) способствует повышению живой массы птицы на 5,6%, а также улучшению конверсии корма на 3,4%. Использование Лактоамиловорина в количестве 1 кг на 1 т корма на протяжении всего периода откорма бройлеров обеспечивает повышение их живой массы в 37-дневном возрасте на 5,3%, снижение затрат кормов на 1 кг прироста живой массы на 3,9%. Количество лактобактерий в толстом отделе кишечника увеличилось с $1,8 \cdot 10^4$ до $3,7 \cdot 10^5$ КОЕ в группе, получавшей жидкий пробиотик путем выпойки, до $8,4 \cdot 10^4$ - сухой пробиотик в течении 4 недель и до $1,2 \cdot 10^6$ КОЕ – весь период выращивания птицы. Соответственно количество бифидобактерий увеличилось с $3,2 \cdot 10^6$ КОЕ в контрольной группе до $7,6 \cdot 10^6$, $9 \cdot 10^7$ и $8,0 \cdot 10^9$ КОЕ.

THE EFFECTS OF PROBIOTICS ON INTESTINAL BIOCOENOSIS AND PRODUCTIVE PERFORMANCE IN BROILER CHICKS

Egorova T.A., Lenkova T.N.

Federal State Financed Scientific Institution Federal Scientific Center «All-Russian Research and Technological Poultry

Institute» of Russian Academy of Sciences, Sergiev Posad, Russia
Ptitesegradskaya Str., 10, Sergiev Posad, Moscow Region, 141311 RUSSIA
E-mail: eta164@yandex.ru

The efficiency of different probiotic microbial strains as productivity enhancers in broilers was studied.

Key words: broiler chicks, probiotic, productivity, intestinal microbiota.

Poultry production is the most dynamic and innovative branch of animal production. Russian poultry production ranks 6th position in the world for egg production and 4th for poultry meat production. Poultry meat is accounted for 46.8% of meat production in Russia; planned volume of meat production in 2016 is 4.575 million mt. This task requires improvement of productive performance in poultry due to improvements in genetics of poultry, mortality rates, production costs, and consumer quality and safety of poultry products.

It is well known that diet composition directly affects qualitative and quantitative parameters of gut microbiota in broiler chicks. Nutritive imbalances can result in certain undesirable changes in intestinal microbiota with subsequent impairment of productive performance and induction of digestive disorders and diseases.

The dynamics of intestinal microbiota throughout the entire ontogenesis in broiler chicks were studied with the use of domestically produced probiotics (direct fed microbials) as microbiota regulators.

Probiotic "A2" was shown to improve mortality rates, productive performance, and feed efficiency in broilers. The supplementation of broiler diets with 1000 ppm of probiotic "A2" ($1x10^9$ CFU/g) from 1 to 21 days of age and then 500 ppm until the slaughter improved mortality by 2.9%, live bodyweight by 4.5%, feed conversion ratio (FCR) by 4.5%. The dose of 1000 ppm throughout the entire rearing period improved live bodyweight by 5.1%, mortality by 2.9%, FCR by 5.6%.

Concentrated form of the probiotic ($1.5x10^{12}$ CFU/g) was fed to broilers with drinking water in doses 0.015 g/bird/day during the first week of age and then 0.05 g/bird/day at 11-13, 15-16 and 18-20 days of age. The additive was found to improve mortality by 2.9%, live bodyweight by 3.7%, FCR by 3.9%. Physiological trials showed the associated improvements in digestibility and metabolization of dietary nutrients. The increases in concentrations of bifido- and lactobacterial species in the large intestine were also found.

Trials with "Lactoamylovorin", a probiotic preparation based on pure strains of Lactobacillus paracasei (Lactobacillus amylovorus BT-24\88) B-6523 isolated from the porcine intestine were performed.

Liquid form of the probiotic ("Lactoamylovorin-KZh") was fed to broilers with drinking water during the first 4 weeks of age; improvements in live bodyweight by 4.2% and in FCR by 2.8% were found. Supplementation of diets with dry form of the probiotic (1000 ppm) during the same age period improved live bodyweight by 5.6% and FCR by 3.4%. The same dose of the probiotic throughout the entire rearing period improved live bodyweight at 37 days of age by 5.3% and FCR by 3.9%. Lactobacilli concentration in the large intestine increased from $1.8x10^4$ CFU in control to $3.7x10^5$ CFU in the treatment with liquid form of the probiotic, to $8.4x10^6$ CFU in the treatment with dry form (to 21 days of age), and to $1.2x10^6$ CFU in the treatment with dry form (to 37 days of age). Bifidobacteria concentrations increased from $3.2x10^6$ CFU in control to $7.6x10^6$; $9.0x10^7$; and $8.0x10^9$ CFU respective to the treatments.

УДК 636.087.7

СПОСОБ ВЫРАЩИВАНИЯ ГИДРОПОННОЙ ДОБАВКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЛАУКОНИТА

Миронова И. В., Нигматьянов А. А., Долженкова Г. М., Фаткуллина Л. М.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет», Уфа, Россия
450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34
e-mail: mironova_irina-v@mail.ru

Разработан способ использования глауконита при выращивании гидропонного корма (семена ячменя, измельченная солома, глауконит), обработанного в водном растворе католита в разреженной среде.

Ключевые слова: гидропонный корм; глауконит; семена ячменя; измельченная солома; католит; химический и минеральный состав.

Известно, что в составе гидропонного корма, выращенного из чистого зерна, содержится относительно небольшое количество клетчатки. В этой связи нами предлагается выращивать зеленый корм из ячменя на субстратах из измельченной ячменной соломы. При этой технологии используется вся выращенная хлебная масса (зерно и солома), а также ликвидируются такие операции по подготовке соломы к скармливанию как запаривание, ощелачивание.

Для активации проращивания семян нами предлагается обработка зерна электрохимически активированной водой – католитом. Одновременно осуществляли перемешивание в разреженной среде при давлении 650-680 мм рт. ст. в течение 9 мин на установке с частотой вращения барабана 10 об/мин. Водный раствор католита с pH 7-9 и редокс-потенциалом -400..-500 мВ получали путем электролиза с помощью биоэлектроактиватора «Эсперо-1». Повысить урожайность и питательность гидропонного корма мы предлагаем за счет применения глауконита. Исследованиями установлено, что оптимальной дозой внесения глауконита является 60 г/м2, что составляет 10,6 г на 1 кг сухой массы гидропонного корма. Так, содержание протеина по сравнению с дозировкой 30 и 90 г/м2 возрастает соответственно на 6,8 и 3,3%, а каротина – на 2,4%.

UDC 636.087.7

THE METHOD OF GROWING HYDROPONIC ADDITIVE USING YEW GREEN PAINT

Mironova I. V., Nigmat'yanov A. A., Dolzhenkova G. M., Fatkullina L. M.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Bashkir State Agrarian University
Ufa, Russia
34, 50-letiya Oktyabrya Str., Ufa, 450001, Russia.
e-mail: mironova_irina-v@mail.ru

The method of using yew green paint for growing the hydroponic fodder (barley seeds, shredded straw, yew green paint), treated with aqueous solution of the catholyte in the rarefied environment has been developed.

Key words: hydroponic fodder; yew green paint; barley seeds; shredded straw; catholyte; chemical and mineral composition.

It is known that the composition of hydroponic fodder grown from the clean grain contains a relatively small amount of fiber. In this context, we are encouraged to grow green fodder of barley on the substrates made of shredded barley straw. When this technology is implemented all grown grain weight (grain and straw) is used, as well as such operations of preparing straw for feeding as scalding, alkalization are eliminated.

To activate the seeds germination we offer to treat grain with electrochemically activated water – catholyte. At the same time the grain was stirred in the rarefied environment at a pressure of 650-680 mm Hg for 9 min in the unit with a drum speed of 10 rev/min. Aqueous solution of the catholyte with a pH of 7-9 and a redox potential of -400..-500 mV has been obtained by electrolysis using the bio-electro activator «Espero-1». To increase the yield and nutritional value of the hydroponic fodder, we offer to use the yew green paint. It has been established that the optimal dose of yew green paint is 60 g/m2, which is 10,6 g/kg of hydroponic fodder dry mass. Thus, the content of protein in comparison with the dosage of 30 and 90 g/m2 increases respectively by 6,8 and 3,3%, and carotene – by 2,4%.

УДК 18:632.488.42:575

ВЫВЕДЕНИЕ СЕЛЕКЦИОННЫХ ЛИНИЙ РИСА С ГЕНАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К ПИРИКУЛЯРИОЗУ, ЗАСОЛЕНИЮ ПОЧВЫ И ДЛИТЕЛЬНОМУ ЗАТОПЛЕНИЮ ВОДОЙ

Костылев П.И., Редькин А.А. , Краснова Е.В.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт зерновых культур имени И.Г. Калиненко, г. Зерноград, Россия
347740, г. Зерноград Ростовской обл., Научный городок, 3
E-mail: p-kostylev@mail.ru

В результате проведенных исследований с помощью молекулярного маркирования на основе ПЦР в соче-

тании с традиционной селекцией выделены скороспелые линии риса с генами устойчивости к засолению Saltol и затоплению Sub 1, пригодные для выращивания в Ростовской области. Созданы линии риса, в генотипе которых собрано шесть эффективных генов резистентности к пириуляриозу (Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b, Pi-40). Внедрение таких сортов в производство позволит избежать эпифитотийного развития болезни, сохранить биологическую урожайность риса и получать экологически чистую сельхозпродукцию.

Ключевые слова: рис, устойчивость, стрессоры, маркерная селекция

Повышение урожайности риса является основной целью селекционных программ. Потенциальная продуктивность новых сортов риса достигла в России максимума в 10-12 т/га, но фактическая урожайность существенно меньше из-за различных биотических и абиотических стресс-факторов, которые являются главными барьерами для увеличения валового сбора зерна. Главными стрессорами для риса являются засоление почвы, длительное затопление в период наводнения, пониженная температура, недостаточное количество влаги, болезни, вредные животные и сорные растения. В связи с этим использование генов устойчивости и их внедрение в генотипы современных сортов риса является актуальным. Применение биотехнологических методов вносит существенный вклад в выявление генов и их перенос в новые сорта риса.

Цель исследований – создание с помощью ДНК-маркеров селекционного материала риса, устойчивого к стресс-факторам среды: пирикуляриозу, засолению почвы, длительному затоплению водой.

Исходный материал и методика. Донорами устойчивости к засолению взяли образцы (ген Saltol) – NSIC Rc 106, IR 52713, IR 74099; к затоплению (ген Sub 1A) – BR-11, CR-1009, Inpara-3 и TDK-1, устойчивости к пирикуляриозу (Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b, Pi-40) – линии C101-A-51, C101-Lac, IR-58, Мороберекан и др. Реципиентами послужили скороспелые сорта Новатор, Боярин и Вираж. Идентификацию генов проводили методом молекулярного маркирования на основе ПЦР с использованием специфичных праймеров.

Результаты исследований. Выведение резистентных к пирикулярии форм риса и использование их в сельском хозяйстве является лучшим способом борьбе с этим заболеванием. В то же время это является сложной задачей, так как патогены постоянно мутируют и размножаются в огромных количествах. Соединение в одном генотипе нескольких генов с устойчивостью на базе районированных местных сортов представляет собой эффективную стратегию селекции на длительную резистентность к изменчивым грибковым расам. На основе использования технологии маркер вспомогательной селекции с применением ДНК маркеров нами было проведено введение 6 генов устойчивости к пирикуляриозу в российские сорта риса, приспособленные к климатическим условиям южной части России. Многолетняя гибридизация позволила создать формы риса на базе сортов Боярин и Вираж с пирамидированными генами устойчивости к пирикуляриозу Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b и Pi-40 в гомозиготном состоянии. В течение всех циклов возвратных скрещиваний перенос доминантных аллелей каждого такого гена в потомстве контролировался тесно сцепленными молекулярными маркерами. Растения, в генотипе которых не было аллелей устойчивости, выбраковывали.

На первом этапе работы в 2005 году были получены 6 гибридов от скрещивания сортов Боярин и Вираж с донорами устойчивости к пирикуляриозу, несущими гены Pi-1, Pi-2, Pi-33. После анализа выделены гомозиготные формы по доминантным аллелям. На втором этапе (2008) после скрещивания между собой гибридов Pi-1+33 x Боярин и Pi-2 x Боярин удалось получить формы с тремя пирамидированными генами одновременно: Pi-1, Pi-2, Pi-33 в гомозиготном состоянии. На третьем этапе работы (2010) после их гибридизации с сортами – донорами генов Pi-ta и Pi-b были получены формы, объединяющие 5 генов. На четвертом этапе (2013) к ним был добавлен 6-й ген Pi-40. После анализа ДНК удалось выделить образцы риса, несущие доминантные аллели всех шести локусов. Внедрение таких сортов в производство позволит избежать эпифитотийного развития болезни, сохранить биологическую урожайность риса и получать экологически чистую сельхозпродукцию.

Засоление почвы значительно ограничивает продуктивность выращиваемого на ней риса. Нами получены гибриды сорта Новатор с азиатскими солеустойчивыми сортами риса, несущими гены Saltol. Локус количественного признака (QTL) Saltol представлен значительным участком первой хромосомы, включающий более 4500 тысяч пар нуклеотидов. Одними из полиморфных микросателлитных локусов, связанных с Saltol, являются RM493 и RM7075. Длина данных микросателлитов отличается у родительских форм на 20-25 п.н., поэтому у гибридов F2 можно легко провести анализ наследования QTL Saltol. Кривые плавления SSR-маркеров имели четкие различия. Анализ ДНК 83 лучших растений трех комбинаций F2 с хорошо вызревшим зерном показал, что расщепление по генам Saltol составило: NSIC Rc 106 x Новатор – 15ss: 13Ss: 2SS, IR 52713 x Новатор 9ss: 18Ss: 2SS, IR 74099 x Новатор 14ss: 8Ss: 2SS. Преобладали растения с рецессивными аллелями гена и гетерозиготы, а солеустойчивых доминантных гомозигот было меньше ожидаемого количества. Это связано со

сцеплением генов Saltol с неблагоприятными для растений в наших условиях генами: фоточувствительностью, позднеспелостью, осыпаемостью колосков, остистостью и тем, что выборка была нерепрезентативной вследствие искусственного отбора. Выделены лучшие формы.

Особенностью затопления, как стресс-фактора, является сочетание высокой оводненности и нарушение кислородного режима. При этом происходит снижение поглощения воды, ингибирование процесса экссудации и фотосинтетической активности. В результате в надземных органах обнаруживается недостаток питательных веществ, что в итоге приводит к гибели растений. Селекция сортов риса, устойчивых к данному стресс-фактору, актуальна в обширных регионах возделывания риса, подверженных наводнению. Другим вариантом использования устойчивости к затоплению, актуальным для России, является борьба с сорными растениями за счет глубокого слоя воды, который сорняки преодолеть не в состоянии

У гибридов от скрещивания сорта Новатор с донорами гена устойчивости к затоплению Sub 1 в F2 наблюдали огромный спектр расщепления по вегетационному периоду, высоте растений, длине и форме метелки, количеству колосков, остистости. Из проанализированных гибридных растений BR-11 х Новатор ген Sub 1A (в гомо- и гетерозиготном состоянии) присутствовал у девяти, т.е. в соотношении 9:11, хотя при моногибридном расщеплении оно должно было быть 15:5. В гибридной комбинации CR-1009 × Новатор расщепление F2 прошло в соотношении 18:2, т.е. почти все отобранные растения имели ген Sub 1. У гибридов Inbara-3 × Новатор и TDK-1 × Новатор расщепление прошло в соотношении 14:6, или примерно 3:1, т.е. близко к менделевскому. Отклонения в расщеплениях двух комбинаций можно объяснить влиянием отбора и сцеплением генов. Образцы с целевыми генами репродуцированы в ФГУП «Пролетарское» Ростовской области, где из них отобраны лучшие растения F3-F4.

Таким образом, с помощью ДНК-анализа гибридных популяций риса F2-F4, полученных на основе отечественных сортов Боярин, Вираж, Новатор и азиатских линий-доноров, были идентифицированы устойчивые образцы, гомозиготные по искомым локусам, на основе которых после оценки урожайности и качества можно будет создать принципиально новые сорта, отсутствующие сейчас в Российском сортименте.

DEVELOPMENT BREEDING LINES OF RICE WITH BLAST, SALINITY AND WATER FLOODING RESISTANCE GENES

Kostylev P.I., Red'kin A.A. , Krasnova E.V.

FSBSI ARRIGC named I.G. Kalinenko, Zernograd, Russia
347,740, Zernograd Rostov region., Nauchny gorodok, 3
E-mail: p-kostylev@mail.ru

The studies using molecular marking on the basis of PCR in conjunction with conventional breeding lines marked maturing rice with genes resistant to salinity Saltol and flooding Sub 1, suitable for cultivation in the Rostov region. Established line of rice, in which the genotype of the six effective resistance genes assembled to blast (Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b, Pi-40). The introduction of such varieties in production to avoid epiphytotic of the disease, to preserve the biological productivity of rice and getting clean agricultural products.

Key words: rice, resistance, stressors, marker selection

Increasing rice productivity is the main purpose of breeding programs. The potential productivity of new rice varieties in Russia reached a maximum of 10-12 t / ha, but the actual yield is much smaller due to various biotic and abiotic stress factors, which are the main barriers to increasing the gross grain harvest. The main stressors for rice are soil salination, prolonged flooding in the flood period, low temperature, lack of moisture, disease, harmful animals and weeds. In this regard, the use of resistance genes and their introduction into modern varieties of rice genotypes is important. The use of biotechnological methods for making a significant contribution to the identification of genes and their transfer to the new varieties of rice.

The purpose of research - creation with the help of DNA markers rice breeding material resistant to stress factors of environment: blast, salinization of soil, prolonged flooding water.

Material and methods. The donors of resistance to salinity took samples (Saltol gene) - NSIC Rc 106, IR 52713, IR 74099; flooding gene (Sub 1A) - BR-11, CR-1009, Inpara-3-one and TDK, resistance to blast disease (Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-b, Pi- 40) -. line C101-A-51, C101-Lac, IR-58, and other recipients Moroberekan served ripening varieties Novator, Boyarin and Virage. Identification of genes carried by molecular labeling by PCR using specific primers.

Results. Breeding blast resistant rice forms and their use in agriculture is the best way to combat the disease.

At the same time it is a challenging task, as the pathogens are constantly mutate and reproduce in large quantities. Mix in one genotype of several genes with resistance on the basis of recognized local varieties is an effective breeding strategy for the long-term resistance to fungal volatile races. Based on the use of marker assisted selection techniques with the use of DNA markers, we conducted the introduction of 6 genes for resistance to blast in Russian rice varieties adapted to the climatic conditions of the southern part of Russia. Long-term hybridisation possible to create shapes on the basis of rice varieties and Boyaryn, Virage piramiding of resistance genes to blast Pi-1, Pi-2, Pi-33, Pi-ta, Pi-Pi-b and 40 in the homozygous state. During all cycles of backcrossing transfer each dominant alleles in progeny of such a gene controlled closely linked molecular markers. Plants in which the genotype had no resistance alleles, are rejected.

In the first phase of work in 2005, six hybrids by crossing varieties Virage, Boyarin with donors of blast resistance have been obtained, carrying the genes Pi-1, Pi-2, Pi-33. After the analysis were identified homozygous form of the dominant alleles. In the second step (2008) after the crossing of a hybrid between the Pi-1 + 33 x Boyaryn and Pi-2 x Boyaryn could receive three forms piramiding genes simultaneously: Pi-1, Pi-2, Pi-33 in the homozygous state. In the third stage of work (2010) after hybridization with varieties - donors, gene Pi-ta and Pi-b were obtained form combining 5 genes. The fourth step (2013) it to the 6th gene Pi-40 was added. After the analysis of DNA samples to allocate rice bearing dominant alleles in all six loci. The introduction of such varieties in production to avoid epiphytotic of the disease, to preserve the biological productivity of rice and getting clean agricultural products.

The salinity of the soil greatly limits the productivity of rice grown on it. We obtained hybrid varieties Novator with Asian salt-tolerant rice varieties carrying Saltol genes. Quantitative trait loci (QTL) Saltol represented a significant portion of the first chromosome, which includes more than 4.5 million pairs of nucleotides. One of polymorphic microsatellite loci associated with Saltol, are RM493 and RM7075.

Microsatellite data length is different from the parental forms by 20-25 bp, so the F2 hybrids are easily spend inheritance analysis of QTL Saltol. SSR-markers melting curves have clear differences. Analysis of DNA 83 best plants three F2 combinations with well ripened grain showed that the splitting of the genes Saltol was: NSIC Rc 106 x Novator - 15ss: 13Ss: 2SS, IR 52713 x Novator 9ss: 18Ss: 2SS, IR 74099 x Novator 14ss: 8Ss: 2SS. Dominated plants with recessive gene alleles and heterozygous and homozygous dominant salt tolerant was less than the expected number. This is due to genes Saltol clutch with adverse plant in our conditions genes: photosensitivity, of late, shattering spikelets, the spinous and the fact that the sample was not representative due to artificial selection. It highlights the best shape.

The peculiarity of flooding as a stress factor, is a combination of a high water content and a violation of the oxygen regime. Thus there is a reduction in water uptake, process and exudation inhibition of photosynthetic activity. As a result, the aerial organs detected lack of nutrients, which ultimately leads to the death of the plants. Selection of rice varieties that are resistant to this stress factor is relevant in vast areas of rice farming, flood-prone. Another use of resistance to flooding, relevant for Russia, is fighting with weeds due to the deep layer of water that weeds are not able to overcome.

Hybrids F2 by crossing varieties of Novator with donors of gene resistance to flooding in Sub 1 seen a huge range of cleavage by growing season, plant height, panicle length and shape, number of spikelets. Of the analyzed hybrids BR-11 x Novator gene Sub 1A (in homo- and heterozygous state) is present in nine, that is, in a ratio of 9:11, although monohybrid segregating it had to be 15: 5. The hybrid combination F2 of CR-1009 × Novator passed segregating ratio in 18: 2, i.e. almost all plants were selected gene Sub1. In hybrids Inbara-3 × Novator and TDK-1 × Novator segregate in the ratio of 14: 6, or about 3: 1, ie, close to Mendelian. Deviations in the segregating of the two combinations can be explained by the influence of selection and gene clutch. Samples with target genes reproduced in «Proletarskoe» of the Rostov region, where they selected the best plants F3-F4.

Thus, with the help of DNA analysis of hybrid populations of rice F2-F4, derived from local varieties Boyarin, Virage, Novator and Asian lines donor-resistant samples were identified homozygous for the desired loci, on the basis of which, after evaluation of productivity and quality, you can It will create a fundamentally new varieties that are not currently in the Russian assortment.

УДК 637.18

РЕСУРСОСБЕРЕГАЮЩИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Ивкова И.А., Скрябина О.В., Пиляева А.С., Рябкова Д.С.

ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», Омск, Россия
644008, Омская область, г. Омск, ул. Институтская площадь, 1
e-mail: tovar_ivm_omgau@mail.ru

В статье приводится обоснование возможности использования нетрадиционных видов сырья (заменителей молочного жира, растительных белков) взамен дефицитных и дорогостоящих молочного жира и молочного белка при производстве сухих молокосодержащих продуктов. Приведена технологическая схема производства сухого кисломолочного (сметанного) продукта функционального назначения, с повышенной хранимоспособностью, высушенного способом сублимации.
Ключевые слова: заменители молочного жира, растительные белки, сливочно-растительная эмульсия, показатели качества, удлиненные сроки годности.

В последние десятилетия, в силу острого дефицита и дороговизны натурального молочного сырья, актуальна проблема использования нетрадиционных видов сырья растительного происхождения: растительных жиров, в частности, заменители молочного жира, а так же растительных белков (соевых, рапсовых и др.).

Целью работы является установление возможности и разработка технологического процесса производства сухого молочного продукта повышенной пищевой ценности и хранимоспособности с заменой части животного сырья на сырье растительного происхождения.

Анализируя накопленный научный и производственный опыт, можно сделать вывод о возможности и необходимости разработки новых технологий по созданию сухих молокосодержащих консервов, не уступающих по качеству натуральным. [2,3,4]

В качестве способа сушки выбрана сублимационная, как наиболее щадящая и сохраняющая качество вырабатываемых продуктов в процессе хранения. Для стабилизации жировой фазы использовали натуральный окислитель дигидрокверцетин. Замену молочного жира на его заменители проводили в соотношении 1 : 1. [1] Качество продукта оценивали в процессе длительного хранения в течение 24 мес.

На основании проведенных исследований разработана технологическая схема и параметры приготовления сливочно-растительной эмульсии для производства сухого сметанного продукта, рецептура и технология его производства. Практической ценностью работы является разработка и утверждение в установленном порядке технической документации: СТО 100 202 789-001 «Сухой сметанный продукт сублимационной сушки».

Литература.
1. Ивкова И.А., Батухтин А.Н. Технология получения стабильной растительно-жировой эмульсии при производстве сухих молокосодержащих консервов /Сборник научных трудов СибНИИС.- г. Барнаул, 2011 г.- 21-23 с.
2. Применение растительного белка в диетотерапии сердечно-сосудистых заболеваний: метод. письмо/ В.А. Тутельян [и др.]. – М., 2003.- 28 с.
3. Рощупкина Н.В. Разработка продуктов на молочно-растительной основе // Переработка молока, 2007.- №10.- С.38.
4. Харитонов В.Д. Термодеструктивные изменения сухого молока в процессе распылительной сушки: монография / В.Д. Харитонов, Л.В. Петров, С.В. Петрова.- Омск, Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2009.

.....

UDC 637.18

SAVING TECHNOLOGIES IN THE PRODUCTION OF DAIRY PRODUCTS

Ivkova IA, Scriabin OV Pilyaeva AS, Ryabkov DS

FGBOU IN «Omsk State Agrarian University named after PA Stolypin «, Omsk, Russia
644008, Omsk region, Omsk, ul. Institutskaya area, 1
e-mail: tovar_ivm_omgau@mail.ru

The paper provides a rationale for the possibility of using non-traditional raw materials (milk fat substitutes, vegetable protein) instead of scarce and expensive milk fat and milk protein in the manufacture of dry milk-containing products. The technological scheme of production of dry sour milk (sour cream) functionality of the product, with increased hranimosposobnostyu, dried means of sublimation.

Key words: milk fat substitutes, vegetable proteins, vegetable creamy emulsion, quality indicators, extended shelf-life.

In recent decades, due to acute shortage and high prices of natural raw milk, urgent problem of using non-traditional vegetable raw materials: vegetable oils, in particular, milk fat substitutes, as well as vegetable protein (soy, rapeseed and others.).

The aim is to establish opportunities and the development of technological process of dry milk product of increased nutritional value and hranimosposobnosti replacing part of the animal feed raw materials of vegetable origin.

Analyzing the accumulated scientific and production experience, we can conclude about the possibility and the need to develop new technologies to create a dry milk-cans, are not inferior in quality to natural. [2,3,4]

As a method of drying the freeze-selected as the most gentle and preserves the quality of the products produced during storage. To stabilize the fat phase using natural oxidant Dihydroquercetin. Substitute milk fat substitutes performed at a ratio of 1: 1. [1] The product quality was evaluated during long-term storage for 24 months.

On the basis of researches the technological scheme and parameters of cooking creamy emulsion plant for the production of dry sour cream product formulation and production technology. The practical value of the work is the development and approval in the prescribed manner of technical documentation: STO 100 202 789-001 «Dry sour cream product is freeze-dried.»

References:
1. Ivkova IA Batukhtin AN Technology for producing a stable vegetable fat emulsion in the manufacture of dry milk-containing canned / Collection of scientific works SibNIIS.- Barnaul, 21-23, 2011-s.
2. Use of a vegetable protein diet therapy in cardiovascular disease: a method. Writing / VA Tutelian [et al.]. - M., 2003.- 28 p.
3. Roshupkina NV Product development in dairy and vegetable-based // Processing of milk, 2007.- №10.- P.38.
4. VD Kharitonov Thermodestructive change milk powder in the spray drying process: monograph / VD Kharitonov, LV Petrov, SV Petrova.- Omsk, Publ FSEIHPE OmGAU 2009.

УДК 579.64

АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ BACILLUS THURINGIENSIS, ВЫДЕЛЕННЫХ В УЗБЕКИСТАНЕ

Фёдорова О.А., Магай Е.Б, Мавжудова А. М., Нурмухамедова Х.

Институт Микробиологии АНРУз, Ташкент, Узбекистан, ул.Кадыри, 7б
e-mail: fed-olga78@mail.ru

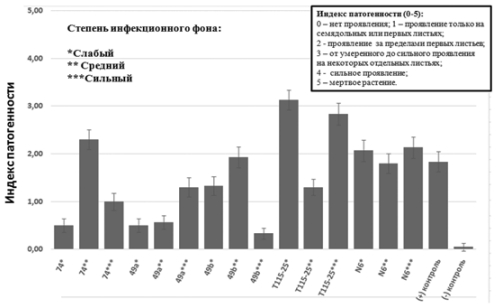
В лабораторных условиях изучено действие культур Bacillus thuringiensis на заболеваемость растений хлопчатника фузариозным вилтом. Показано, что штамм Bacillus thuringiensis 49а является наиболее эффективным по отношению F. oxysporum f.sp.vasinfectum 3 расы при слабом и среднем инфекционном фоне, подавляя в 2,5 раза активность фитопатогена. При сильном инфекционном фоне лучший результат продемонстрировал штамм Bacillus thuringiensis 49б, который ингибировал активность фитопатогена в 5,5 раз.

Ключевые слова: хлопчатник, Bacillus thuringiensis, Fusarium. oxysporum f.sp.vasinfectum, инфекционный фон.

В Узбекистане актуальной проблемой сельского хозяйства остается защита растений от насекомых-вредителей и многочисленных заболеваний. Хлопчатник является главной коммерческой сельскохозяйственной культурой Республики, имеющей значение в национальной экономике. К сожалению, хлопчатник имеет много естественных врагов, из которых наиболее агрессивным в последние годы является возбудитель фузариозного вилта - гриб Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum 3 расы (FOV). В последние годы в литературе появились сведения о влиянии некоторых культур Bacillus thuringiensis (BT) на фитопатогены – возбудители болезней растений. Однако особенности антифунгального действия культур еще малоизучены. В Институте микробиологии АН РУз собрана большая коллекция штаммов энтомопатогенных бактерий BT (150 культур), среди которых имеются культуры, активные как в отношении Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum, так и в отношении Verticillium dahliae и Rhizoctonia solani (зона подавления роста грибов d=20-60 мм).

Изучение действия культур BT на снижение заболеваемости растений хлопчатника проводили на искусственном инфекционном фоне с использованием сорта С-6524. Семена хлопчатника предварительно замачивали на 12 часов в суспензии изучаемых штаммов BT (шт.6, 74, 49а, 49б, Т115-25). Степень инфекционного фона регулировали внесением в почву различного количества семян ячменя, зараженных FOV.

Рис. Влияние культур BT на индекс патогенности FOV



Установлено, что три штамма ВТ (шт. 74, 49а, 49б) могут быть рекомендованы к тестированию на полях с разными уровнями заражения фитопатогенами. Штаммы ВТ 74 и 49а показали незначительные значения индекса патогенности 0.5±0.14 при наличии низкого инфекционного фона. Усиление инфекционного фона приводило к ослаблению антифунгальной активности данных культур, о чем свидетельствует повышение индекса патогенности FOV от 0.57±0,14 до 2,3±0,21. Штамм ВТ 49б продемонстрировал наилучший результат в эксперименте. При высоком уровне инфекционного фона, значение индекса составило 0.33±0.12, что в 5.5 раз ниже чем в контроле с патогеном (1.83±0.21). Интересным является факт, что снижение инфекционного фона вызывало увеличение индекса патогенности FOV.

Анализ полученных данных показал, что штаммы ВТ 49а, 49б, 74 снижают до 80% общий инфекционный фон, создаваемый наиболее агрессивной 3 расой F. oxysporum f.sp.vasinfectum. Данные факты говорят о перспективности использования местных штаммов ВТ в биологическом контроле болезней растений.

Авторы выражают особую благодарность сотрудниками Центра геномики и Биоинформатики АН РУз за содействие в постановке опытов и обсуждении результатов.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF BACILLUS THURINGIENSIS ISOLATED IN UZBEKISTAN

Fedorova O.A., Magay E.B., Mavjudova A.M., Nurmuhamida Kh.

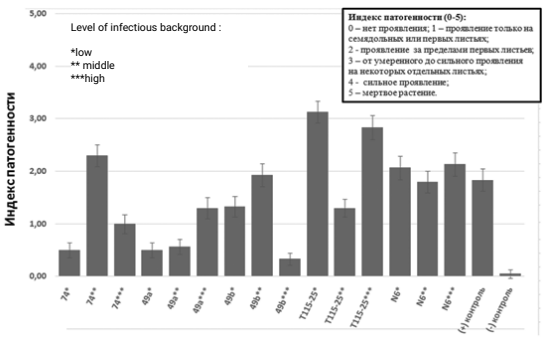
Institute Microbiology ASRUz, Tashkent, Uzbekistan, Kadiry street, 7 b
e-mail: fed-olga78@mail.ru

The influence of Bacillus thuringiensis on morbidity of cotton plant infected by a Fusarium wilt was studied in laboratory condition. It is shown that Bacillus thuringiensis strain № 49a is the most effective isolate against F. oxysporum f.sp.vasinfectum 3 races at a low and middle infectious background repressing 2.5 times activity of phytopathogen. The strain of Bacillus thuringiensis 49b showed the best result at strong infectious background that inhibited the phytopathogen activity 5.5 times.

Key words: cotton plant, Bacillus thuringiensis, Fusarium. oxysporum f.sp.vasinfectum, infectious background.

The protecting of plants from insects and numerous diseases is remained as an issue of the day of in Uzbek agriculture. The cotton plant is the main commercial agricultural culture of Republic, mattering in a national economy. Unfortunately, a cotton plant has many natural enemies from that the most aggressive the last years is Fusarium wilt - Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum 3 races (FOV). The literature gives the information about influence of some isolates of Bacillus thuringiensis (BT) on phytopathogen that are causative agents of illnesses of plants. However, the features of antifungal action of Bt isolates are yet insufficiently known. There is a large collection of entomopathogenic bacteria of Bt (150 strains) in Institute of microbiology of the Uzbek Academy of Science. Among them there are active BT isolates against Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum, Verticillium dahliae and Rhizoctonia solani (a zone of suppression of pathogen growth is a 20-60 mm/d). Study of effect of BT strains on the decline of morbidity of cotton plant was conducted on an artificial infectious background with the use of sort of cotton seeds C- 6524. Seeds were preliminary wetted on 12 hours in the suspension of the studied strains of BT (№ 6, 74, 49а, 49б, T115-25). The degree of infectious background was regulated by bringing a different amount of seed of barley into soil, infected by FOV.

Figure. Influence of cultures of BT on the index of pathogenicity of FOV.



It is determined that three stains of BT (№ 74, 49a, 49b) can be recommended to be tested on the field condition with the different levels of infection of phytopathogen. The strains of BT, № 74 and 49a showed insignificant values of index of pathogenicity 0.5±0.14 at presence of subzero infectious background. Increase of infectious background resulted in weakening of antifungal activity of BT strains, that is testified by the increase of index of pathogenicity of FOV from 0.57±0.14 to 2.3±0.21. The strain of BT 49b showed the best result in an experiment. At the high level of infectious background a value of index was 0.33±0.12, that is 5.5 times lower than in control with a pathogen (1.83±0.21). Interesting, that the decline of infectious background caused the increase of index of pathogenicity of FOV.

The analysis of the obtained data showed that strains BT 49a, 49b, 74 reduce the general infectious background up to 80%% caused by the most aggressive F. oxysporum f.sp.vasinfectum 3 race. These fact proves the perspective of the use of local strains of BT in biological control of plant illnesses.

Authors express the great gratitude to the scientists of Center of Genomic and Bioinformatics of ASRUz for assistance in experiment setup and discussion of results.

УДК 630.283.1:630.187

БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ ЯГОДНЫХ КУСТАРНИЧКОВ КАК ОСНОВА СОЗДАНИЯ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ПЛАНТАЦИЙ

Панин И.А., Залесов С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Уральский государственный лесотехнический университет», Екатеринбург, Россия
620131, Екатеринбург, ул. Металлургов д. 16 кв. 46
e-mail: IgorPanin1993@yandex.ru

Изучена продуктивность дикорастущих ягодников в условиях ельников Уральской горно-лесной области. Установлены показатели надземной фитомассы в абсолютно сухом состоянии и урожайности в свежесобранном виде. Создана база перспективных форм брусники и черники для плантационного выращивания.

Ключевые слова: биологические запасы, черника, брусника, ельники, плантации

Леса России обладают большим потенциалом для заготовки недревесных пищевых продуктов. Лесные ягодные растения в значительных количествах содержат легко усвояемые витамины, микроэлементы, органические кислоты и множество других полезных для организма человека веществ. Это делает их ценным ресурсом не только для обеспечения потребностей рынка, но и как средства повышения качества жизни населения [1]. Наиболее перспективным способом эксплуатации лесных ягод является создание искусственных плантаций. Его экономическая эффективность обусловлена применением высокопродуктивного посадочного материла, получаемого селекционными методами [2]. Вместе с тем, создание лесных плантаций, исследования по отбору продуктивных и устойчивых форм лесных ягод невозможно без точных сведений об их биологических запасах в естественной среде. На Урале существует серьёзный недостаток таких данных, что является фактором тормозящим развитие всей отрасли в регионе. Цель работы установление биологических запасов ягодных кустарничков в условиях ельников Северного Урала. Исследование выполнялось по известным методикам [3] на пробных площадях (ПП) в период с 2014 по 2016 гг. Устанавливались урожайность и надземная фитомасса ягодных кустарничков в абсолютно сухом состоянии. Выявлено, что черника обыкновенная (Vaccínium myrtíllus L.) является широко представленным видом в живом напочвенном покрове (ЖНП). Наибольшие запасы установлены в насаждениях ельника зеленомошно-ягодникового (Е. зм. яг.). Максимальный урожай ягод в свежесобранном виде (326 кг/га) был зафиксирован в среднеполнотных насаждениях со значительной долей участия в составе древостоя сосны. Во всех насаждениях Е. зм. яг. пройденных сплошнолесосечной рубкой наблюдается сильная деградация кустарничкового яруса и практически полное отсутствие плодоношения. В насаждениях ельника нагорного (Е. нг.) запасы черники варьируют от 0 до 857,91 кг/га в абсолютно сухом состоянии, что обусловлено сильным влиянием высотной поясности. Кроме того, из за экстремальных условий произрастания в Е. нг. не обнаружено корреляции между фитомассой и урожайностью зарослей черники. Следует отметить, что на абсолютной высоте 650 м. на отроге горы «Катышёр» зафиксирован высокопродуктивный черничник, в котором наблюдалось активное плодоносящие в течении всего периода наблюдений. Его урожайность достигает 299,4 кг/га в свежесобранном виде. Особи данной ценопопуляции

могут обладать повышенной устойчивостью к факторам негативно влияющим на плодоношение, что требует более детального изучения. В ельниках исследуемого района не обнаружено продуктивных зарослей брусники обыкновенной (Vaccininium vitis-idaea L.), хотя данный вид достаточно широко представлен в ЖНП и его встречаемость в Е. зм. яг. составляет 19 - 89%. Таким образом, в районе исследования возможна эксплуатация дикорастущих черничников. Сбор брусники бесперспективен из за низкой продуктивности. Полученные данные позволяют начать набор перспективных форм брусники и черники для плантационного выращивания.

Литература.
1. Коростелев А.С., Залесов С.В., Годовалов Г.А. Недревесная продукция леса. Екатеринбург: Урал. гос. лесотехн. ун-т, 2004. 387 с.
2. Большаков Б.М. Состояние и перспективы использования недревесных ресурсов леса: сб. ст. Международной практической конференции // Состояние и перспективы использования недревесных ресурсов леса. - 2014. - С 7-12.
3. Бунькова Н.П., Залесов С.В., Зотеева Е.А., Магасумова А.Г. Основы фитомониторинга: Учеб. пособие: изд. 2-е дополненное и переработанное. Екатеринбург: Урал. гос. лесотехн. ун-т, 2011. 89 с.

BIOLOGICAL RESOURCES OF BERRY-SHRUBS AS BASIS OF ESTABLISHMENT OF HIGHLY PRODUCTIVE PLANTATIONS

Panin I., Zalesov S.

Federal state budget educational establishment «Ural state forestry engineering University», Ekaterinburg city, Russian Federation,
620131, Ekaterinburg, 16 Metallurgov st., flat 46
e-mail: igorpanin1993@yandex.ru

Productivity of wild berry plants in the conditions of spruce forests of Ural mountain forest area have been studied. The study has identified value of above-ground phytomass in absolutely dry condition and yield of berry. Base promising forms of cranberries and blueberries for plantation cultivation has been created.

Key words: biological resources, blueberries, cranberries, spruce, plantations

The forests of Russia have great potential for harvesting non-timber food products. Forest berry plants to contain significant quantities of easily digestible vitamins, minerals, organic acids and many other useful for the human body substances. This makes them a valuable resource not only to meet the needs of the market, but also as a means of improving the quality of life [1]. The most promising way to exploit wild berries is the creation of artificial plantations. Its economic efficiency due to the use of high-yielding planting stock produced breeding methods [2]. However, forestry plantations, research on the selection of productive and sustainable forms of forest berries is impossible without exact information about their biological stocks in the natural environment. In the Urals there is a serious lack of such data, which is a factor hindering the development of the whole industry in the region. The aim of the work was to determine the biological resources of berry shrubs in the conditions of spruce forests of the Northern Urals. The research was carried out according to known methods [3] on the sample plots (SP) in the period from 2014 to 2016. In work was identified yield and above-ground phytomass of berry bushes in an absolutely dry state. Bilberry (Vaccínium myrtíllus L.) is a widely represented species in live ground cover (LGC). The largest recourses established in plantations of spruce have founded in conditions of moss-berry forest type. The maximum yield of berries in fresh form (326 kg/ha) was recorded in middle-density forests with significant shares pines. In all plantings of moss-berry forest type passed by clear felling there is a strong degradation of the shrubs layer and almost complete absence of fruiting. Stocks of blueberries range from 0 to 857,91 kg/ha in mountain forest type due to the strong influence of altitudinal zonation. In addition, due to the extreme growth conditions in mountain forest type not found the correlation between phytomass and yield of blueberries. It should be noted that at an altitude of 650 m. on the spur of the mountain «Katysher» fixed productive thickets of bilberry in which there was an active fruit-bearing during the whole observation period. ts yield reaches 299,4 kg/ha in fresh form. This species cenopopulations can have increased resistance to factors adversely affecting fruits. It is heed more detailed study. In the spruce forests of the study area is not detected productive shrubs of cranberries (Vaccininium vitis-idaea L.), although this view is widely represented in LGC and its prevalence in moss-berry forest type is 19 - 89%. Thus, there is possible exploitation of bilberry in the region of study. Harvest of cranberries is hopeless due low productivity. The obtained data allow to begin choose the most promising forms of cranberries and blueberries for plantation cultivation.

References:
1. Korostelev A.S., Zalesov S.V., Godovalov G.A. Nedrevesnaja produkcija lesa. Ekaterinburg: Ural. gos. lesotehn. un-t, 2004. 387 s.
2. Bol'shakov B.M. Sostojanie i perspektivy ispol'zovanija nedrevesnyh resursov lesa: sb. st. Mezhdunarodnoj prakticheskoj konferencii // Sostojanie i perspektivy ispol'zovanija nedrevesnyh resursov lesa. 2014. S 7-12.
3. Bun'kova N.P., Zalesov S.V., Zoteeva E.A., Magasumova A.G. Osnovy fitomonitoringa: Ucheb. posobie: izd. 2-e dopolnennoe i pererabotannoe. Ekaterinburg: Ural. gos. lesotehn. un-t, 2011. 89 s.

УДК 631.84:633.28

БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА И ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ УДОБРЕНИЙ НА СЕМЕННЫХ ПОСЕВАХ ФЕСТУЛОЛИУМА

Образцов В.Н., Щедрина Д.И.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Воронеж, Российская Федерация
E-mail: ovennn@mail.ru

Приведены результаты исследований по изучению влияния различных доз минеральных удобрений на экономическую и биоэнергетическую эффективность производства семян фестулолиума сорта ВИК-90.

Ключевые слова: фестулолиум, многолетние злаковые травы, семенная продуктивность, минеральные удобрения, аммиачная селитра, азофоска, экономическая эффективность, биоэнергетическая оценка

Фестулолиум (× Festulolium F. Aschers. et Graebn.) – первая искусственно созданная кормовая культура, полученная во ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса путем использования гибридизации в системе родов Lolium (райграс) и Festuca (овсяница). Этот гибрид считается одним из лучших компонентов для создания культурных пастбищ и сенокосов в Центральном Черноземье, он характеризуется высокой продуктивностью и отличными кормовыми качествами, хорошей отавностью и зимостойкостью, а также используется для создания газонов, благоустройства спортивных площадок и полевых аэродромов. Введение в практику семеноводства фестулолиума в ЦЧР и применение агротехнических приёмов его возделывания позволяют повысить эффективность производства семян этой культуры. Установлено, что агроклиматические условия лесостепи Центрального Черноземья благоприятны для возделывания фестулолиума семена. Внесение в осенний период минеральных азотных удобрений в дозе 60 кг/га д. в. обеспечивает формирование высокопродуктивного слабополегающего семенного травостоя. Применение разработанных агроприемов позволяет повысить выход энергии с урожаем в 1,45-1,82 раза и получать в среднем 543-680 кг/га кондиционных семян. Наибольшую рентабельность производства – 120% и высокий условный чистый доход – 63,7 тыс. руб./га обеспечивает однократное внесении в подкормку аммиачной селитры в дозе 60 кг/га д.в. в осенний период (в середине сентября после отчуждения вегетативной массы).

UDK 631.84:633.28

BIOENERGETIC ASSESSMENT AND ECONOMIC EFFICIENCY OF APPLICATION OF FERTILIZERS ON SEED PLANTINGS OF FESTULOLIUM

Obraztsov V.N., Shchedrina D.I.

Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great, Voronezh, Russian Federation
E-mail: ovennn@mail.ru

The objective of research was to study the economic and bioenergetic efficiency of application of mineral nitrogen fertilizers in the cultivation of Festulolium for seeds.

Key words: Festulolium, perennial grasses, seed productivity, mineral fertilizers, ammonium nitrate, nitrogen-phosphorus-potassium fertilizer, economic efficiency, bioenergetic assessment.

In the system of agricultural techniques that provide a high seed productivity of Festulolium a great role is played by fertilizers. The experiment included the following variants: no fertilizer application (control) and application of mineral fertilizers (ammonium nitrate and nitrogen-phosphorus-potassium fertilizer) at different doses to the dressing in autumn and spring. Soil preparation was conventional for seed swards of perennial grasses in the Central Chernozem Region. Festulolium was sown in broad drills by coverless sowing to the depth of up to 1.0 cm at the seeding rate of 6.0 kg/ha. Experiments, records, observations and determination of economic and bioenergetic efficiency of agricultural technologies were carried out according to conventional procedures. It was found that the agro-climatic conditions in the forest steppe of the Central Chernozem Region are favorable for cultivation of Festulolium for seeds. Application of mineral nitrogen fertilizers in the autumn period at the dose of 60 kg of active substance/ha ensures the formation of highly productive erect seed-producing sward. The use of the developed agricultural practices can increase the energy yield with harvest by 1.45-1.82 times and receive an average of 543-680 kg/ha of certified seeds. The greatest profitability of production (120%) and the highest contingent net income (63.7 thousand rub./ha) is provided by a single application of ammonium nitrate fertilizer in the dose of 60 kg of active substance/ha in autumn (after the disposal of vegetative mass).

УДК 631.51:633.63

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ДЕГРАДАЦИИ ЧЕРНОЗЕМОВ

Трофимова Т.А., Коржов С.И., Дедов А.В., Образцов В.Н.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I», Воронеж, Российская Федерация
E-mail: zemledel@agronomy.vsau.ru

Представлены результаты исследований по выявлению изменений агрофизических показателей плодородия черноземов ЦЧР и продуктивности сельскохозяйственных культур при длительном и краткосрочном применении основной обработки почвы в сочетании с минеральными и органическими удобрениями. Целью исследований являлась модернизация шкалы деградации черноземов и определение пороговых параметров комплекса агрофизических показателей плодородия по применению минимализации основной обработки почвы. Объект исследований – чернозём обыкновенный и выщелоченный. Исследования проводились в краткосрочных и многолетних стационарных опытах по общепринятым методикам.

Ключевые слова: чернозём обыкновенный, чернозем выщелоченный, деградация почвы, степень выпаханности, агрофизические показатели, плотность почвы, твердость, структурные агрегаты, севообороты, минимализация обработки почвы, приемы биологизации.

В многолетних опытах определены основные агрофизические показатели плодородия, применяемые для оценки степени деградации (выпаханности) почв: плотность почвы (г/см3), твердость почвы (кг/см2), содержание агрегатов более 10 мм (%). Разработана шкала оценки степени выпаханности черноземов и пригодности почв к минимализации основной обработки. Рассчитаны значения степени выпаханности (Š) в зависимости от агрофизических показателей плодородия, возделываемых сельскохозяйственных культур, дифференциации поля по плодородию, а также предложены системы основной обработки почвы в севообороте. Предложено использовать несколько уровней коэффициентов агрофизических показателей плодородия (a1, a2, a3) в зависимости от степени выпаханности почвы, культуры севооборота и индивидуальных особенностей отдельного поля или его частей. На невыпаханных и слабо выпаханных черноземах при значениях Š = 0,64-0,79, агрофизические показатели плодородия которых соответствуют оптимальным для сельскохозяйственных культур, рекомендуется применение минимализации основной обработки почвы. На средне выпаханных (Š = 0,80-0,97) и сильно выпаханных почвах (Š = 0,98-1,50) рекомендуются следующие системы основной обработки почвы в севообороте: отвальная, безотвальная, комбинированная разноглубинная с максимальным использованием в севообороте приемов биологизации (сидеральные пары, пожнивная сидерация, многолетние травы, оставление нетоварной части урожая, внесение навоза, дефеката) в комплексе с внесением рекомендованных доз минеральных удобрений.

UDK 631.51:633.63

EVALUATION OF THE DEGREE OF DEGRADATION OF CHERNOZEM SOILS

Trofimova T.A., Korzhov S.I., Dedov A.V., Obraztsov V.N.

Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great,
Voronezh, Russian Federation
E-mail: zemledel@agronomy.vsau.ru

The goal of the conducted research was to upgrade the scale of degradation of chernozem soils and determine threshold parameters of the complex of agrophysical indicators of fertility in the context of minimizing main soil treatment. The object of the study was leached and ordinary chernozem. The studies were conducted in short-term and long-term stationary experiments according to standard techniques. Analysis of soils and vegetations samples were carried out according to conventional methods of agrophysical, biological and agrochemical research.

Key words: ordinary chernozem, leached chernozem, soil degradation, degree of soil exhaustion, agrophysical indicators, soil density, hardness, structural aggregates, crop rotation, minimizing main soil treatment, biologization methods.

In long-term experiments the authors determined basic agrophysical indicators of fertility used for the evaluation of the degree of soil exhaustion: soil density (g/cm3), soil hardness (kg/cm2), the content of aggregates of more than 10 mm (%). Due to attained results the authors propose a rating scale of the degree of chernozem soil exhaustion and the adaptability of soils for minimizing main soil treatment. The authors estimated values of the degree of soil exhaustion (Š) depending on agrophysical indicators of fertility, cultivated agricultural crops, field fertility differentiation, substantiated systems of main soil treatment in crop rotation, proposed to consider several levels of the coefficients of agrophysical indicators of fertility (a1, a2, a3) depending on the degree of soil exhaustion, concrete agricultural crop and individual characteristics of each field or even its parts. On medium (Š = 0.80-0.97) and heavy (Š = 0.98-1.50) plowed chernozem soils the following systems of main soil treatment in crop rotation are recommended: moldboard plowing, boardless plowing, intended for different depth combined with maximum application of biologization methods in crop rotation (green-manured fallow, stubble crops, perennial grasses, trash cover farming, manurial treatment and application of defecate) in combination with recommended doses of mineral fertilizers.

.....

УДК 581. 522.4

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ МЕЛАТОНИНА НА РАСТЕНИЯХ РАПСА ПРИ ТЕХНОГЕННОМ СТРЕССЕ

Коломейчук Л.В., Данилова Е.Д., Малофий М.К., Мурган О.К., Ефимова М.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36.
E-mail: kolomeychuklv@mail.ru

Предложен экономичный способ повышения устойчивости растений рапса к избыточному содержанию меди экологически безопасным фитогормоном мелатонином.

Ключевые слова: рапс, медь, мелатонин, окислительный стресс.

Высокое содержание тяжелых металлов в почве приводит к снижению продуктивности агро- и биоценозов, к сокращению биоразнообразия и, как следствие, к значительным экономическим потерям. Известно, что медь является одним из наиболее токсичных тяжелых металлов. В настоящее время не существует экологически чистых и экономически эффективных методов очистки загрязненных солями тяжелых металлов территорий. В связи с этим представляется перспективным разрабатывать технологии повышения устойчивости растений к повреждающему действию абиотических факторов, что позволит вовлекать неиспользуемые ранее площади в аграрное производство. Устойчивость растений к действию неблагоприятных факторов во многом определяется фитогормонами. Мелатонин является новым перспективным гормоном растений.

Рапс относится к ценным масличным культурам, который находит практическое использование в пищевой, металлургической, мыловаренной, кожевенной и текстильной промышленности. По пищевым и кормовым достоинствам рапс превосходит многие сельскохозяйственные культуры. В последнее время особый интерес привлекает рапсовое масло как источник биодизеля. Повышение интенсивности загрязнения посевных площадей тяжелыми металлами и относительно низкая устойчивость рапса к повреждающим факторам делают его идеальной моделью для изучения путей повышения устойчивости к тяжелым металлам.

Исследования проводили на растениях Brassica napus L. сорта Вестар канадской селекции. Семена проращивали в перлите на дистиллированной воде в течение 7 суток, после чего проростки переносили на жидкую питательную среду Хогланда–Снайдер для последующего культивирования в течение 2 недель. Далее к растениям опытных вариантов в среду добавляли (1) 25 мкМ CuSO4, (2) 10 мкМ мелатонина, или (3) 25 мкМ CuSO4 и 10 мкМ мелатонина. Используемые в данной работе концентрации меди и мелатонина были подобраны в предварительных экспериментах. Протекторный эффект мелатонина при техногенном загрязнении оценивали по общепринятым ростовым и физиологическим показателям.

Негативный эффект ионов меди проявлялся в уменьшении площади листьев и длины корня и, как следствие, в снижении в 2.5 раза сырой и сухой биомассы рапса. Перекисное окисление липидов (измеряемое по содержанию малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой) усиливалось примерно в два раза по сравнению с контрольным вариантом, что свидетельствует о развитии окислительного стресса. Содержание пролина в листьях рапса увеличилось в 6 раз, что, вероятно, было причиной снижения осмотического потенциала клеточного содержимого.

Протекторное действие мелатонина проявлялось в снижении отрицательного воздействия меди на ростовые показатели и уменьшении интенсивности перекисного окисления липидов. Одно из возможных объяснений защитного действия гормона - аккумуляция неферментативных антиоксидантов – пролина и каротиноидов.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-01071-а, Программой Эразмус + страны партнеры и Программой повышения международной конкурентоспособности Томского государственного университета на 2013-2020 гг.

UDC 581. 522.4

PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN ON RAPE PLANTS UNDER THE TECHNOGENIC STRESS

Kolomeychuk L.V., Danilova E.D., Malofiy M.K., Murgan O.K., Efimova M.V.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation
634050, Tomsk, Lenin av., 36.
E-mail: kolomeychuklv@mail.ru

An economical way of increasing the stability of rape plants to excessive copper content in an environmentally sound phytohormones melatonin is offered.

Key words: rape plants, copper, melatonin, oxidative stress.

The high content of heavy metals in the soil leads to a decrease in productivity and agro-and biocoenoses a reduction in biodiversity and, as a consequence, to significant economic losses. It is known that copper is one of the most toxic and heavy metals. Currently there are no environmentally friendly and cost-effective methods of cleaning contaminated areas with heavy metal. In this regard, it seems promising to develop technologies of increasing plant resistance to the damaging effects of abiotic factors, which will make it possible to involve the previously unused area of agricultural production. The resistance of plants to unfavorable factors largely determined by phytohormones. Melatonin is a new promising plants hormone.

Rape refers to the valuable oil crops, which finds practical use in the food, metallurgical, soap, leather and textile industries. According to food and fodder advantages rape plants exceed many crops. Lately, rape plants attract special interest as a source of biodiesel. An increasing of the intensity of cultivated areas contamination by heavy metals and relatively low stability of rape plants to damaging factors make it an ideal model for the study of ways of improving its heavy metals resistance.

Studies were carried out on plants of Brassica napus L. of Canadian selection Westar variety. Seeds were

germinated in perlite in distilled water for 7 days after which the plantlets were transferred to a liquid Hoagland and Snyder solution for further culturing within the period of 2 weeks. Further to this medium to the plants of experienced variants were added (1) 25 μM CuSO4, (2) 10 μM of melatonin, or (3) 25 μM CuSO4 and 10 μM of melatonin. The concentrations of copper and melatonin were chosen in preliminary experiments. The protective effect of melatonin under the technogenic stress was evaluated by growth and physiological parameters.

The negative effect of copper ions was shown in the reduction of leaves area and root length and, as a consequence, in reduction of raw and dry rape plants biomass in 2.5 times. Lipid peroxidation (measured by the content of malondialdehyde in reaction with thiobarbituric acid) amplified twofold in comparison to the control sample, indicating the development of oxidative stress. The content of proline in leaves of rape plants has increased by 6 times, which was probably the reason of reducing the osmotic potential of the cell contents.

The protective effect of melatonin was shown in reduction of the negative impact of copper on growth metrics and in reduction of the intensity of lipid peroxidation. One of possible explanations of the hormone protective effect is the accumulation of non-enzymatic antioxidants - proline and carotenoids.

The investigation was supported by Russian Foundation for Basic Research № 16-04-01071-a, Erasmus + Partner Countries Program and the program for improving the international competitiveness of the Tomsk State University for 2013-2020.

УДК 630.165.314

FASTIGIATA URALICA - ПЕРСПЕКТИВНАЯ ФОРМА ЕЛИ СИБИРСКОЙ ДЛЯ ЛЕСНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Оплетаев А.С., Кожевников А.П., Залесов С.В., Дамари Р.Г., Прядилина Н.К.

Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, Россия
620100, Россия, г.Екатеринбург, ул.Сибирский тракт, 37
e-mail: opletaev@e1.ru

Для скорейшего внедрения новых форм трудноукоренямых хвойных древесных растений необходимо изучить эффективность использования всех известных в лесной биотехнологии методов размножения. Ель сибирская 'Фастигиата Уральская' (Picea obovata 'Fastigiata Uralica' Opletaev) имеет нетипичный для ели внешний вид и больше похож на кипарис, что открывает перспективы для её использования в ландшафтном дизайне и озеленении городов.

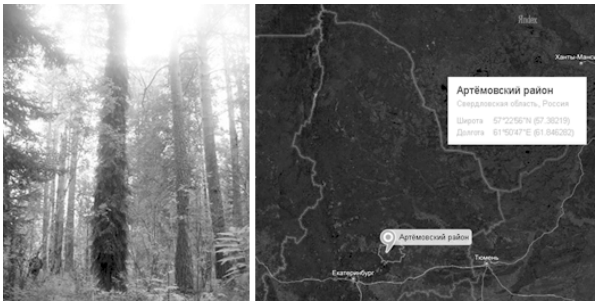
Ключевые слова: лесная биотехнология, размножение растений, ель сибирская, Fastigiata uralica, вегетативное размножение ели, укоренение хвойных.

Ель сибирская, в отличие от обыкновенной, характеризуется заметно меньшим полиморфизмом, поэтому обнаружение ее новой декоративной формы весьма перспективно для ее размножения современными методами лесной биотехнологии. Период жизни древесных растений очень велик, а получение новых форм лесных древесных пород на основе традиционной селекции занимает десятилетия. Значительный интерес представляет обнаруженная на территории Свердловской области новая декоративная форма ели сибирской 'Фастигиата Уральская' (P. obovata Ledeb. var. 'Fastigiata Uralica' Opletaev). Обнаруженное дерево имеет нетипичный для ели габитус и обладает колонновидной формой кроны, ветви многочисленные, побеги плотно прижаты к стволу, направлены вниз по спирали.

Расширение ассортимента древесных растений в лесном хозяйстве осуществляется путем введения интродуцентов [1], а также отбора декоративных форм местной флоры [2]. Ель сибирская Fastigiata Uralica найдена в единственном экземпляре на территории Свердловской области (рисунок). Нашей целью является размножение, выращивание и популяризация новой декоративной формы ели на рынке ландшафтного дизайна и озеленения городов [3, 4].

Для внедрения новых форм хвойных растений в зеленое строительство применяется один из быстрых способов получения посадочного материала с сохранением всех признаков материнского растения - черенкование. Как известно, укоренению черенков рода Picea, кроме индивидуальных особенностей генотипа, мешает содержание в них полифенольных веществ, которые снижают способность черенков к корнеобразованию. Поэтому перспективным направлением в лесной биотехнологии являются работы по разработке способа черенкования ели, снижающего концентрацию полифенолов в посадочном материале [5].

Рисунок. Внешний вид ели сибирской Fastigiata Uralica и район обнаружения



В результате трехлетних опытов по черенкованию ели сибирской нам удалось добиться укоренения черенков с маточного дерева Fastigiata uralica на уровне 5-25% с целью закрепления формы и создания плантации маточных деревьев, которые в дальнейшем будут являться источником генетического материала для промышленного размножения этой формы.

Современные приемы культуры in vitro позволяют получать посадочный материал ценных генотипов хвойных пород. Однако из опыта прошлых проектов лесных биотехнологов можно отметить, что ставить задачу - размножать ель методом клонального микроразмножения из вегетативных тканей в коммерческих целях дело очень трудоемкое. Можно получить единичные экземпляры ценой больших усилий [6].

Литература.
1. Кожевников А.П. Ботанические сады и дендропарки мира : учебное пособие / А. П. Кожевников; Урал. гос. лесотехн. ун-т. — Екатеринбург: УГЛТУ, — 2013. — 342 с.
2. Крекова Я.А., Данчева А.В., Залесов С.В. Оценка декоративных признаков рода Picea Dieter. в Северном Казахстане // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1-1.;URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17204 (дата обращения: 10.01.2017).
3. Оплетаев А.С., Залесов С.В., Кожевников А.П. Новая декоративная форма ели сибирской (Picea obovata Ledeb.) / Аграрный вестник Урала. — 2016. — №148(6) —С. 40—44.
4. Zalesov S., Opletaev A., Pryadilina N., Damary R. Fastigiata uralica – a new decorative form of Siberian spruce (Picea obovata Ledeb.) for landscaping // 9th International Scientific Conference WoodEMA 2016 The path forward for wood products: a global perspective. Louisiana, USA. — 2016. — P. 1—8.
5. Чумакова Н.И. Усовершенствование технологии вегетативного размножения хвойных растений методом черенкования // Известия ТСХА. — 2011 — выпуск 5 — С. 161-164
6. Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Мирошников А.И. Лесная биотехнология: методы, технологии, перспективы // Биотехнология. — 2008. — №5 — С. 3-22

FASTIGIATA URALICA IS A PROMISING FORM OF SIBERIAN SPRUCE FOR FOREST BIOTECHNOLOGY

Opletaev A. S., Kozhevnikov A. P., Zalesov S. V., Damari R. G., Priadilina N. K.

Ural State Forest Engineering University, Ekaterinburg, Russia
620100, Russia, Ekaterinburg, Sibirskiy tract street, 37
e-mail: opletaev@e1.ru

For the speedy implementation of the new difficult cultivated coniferous woody plants it is necessary to examine the effectiveness of the use of all known forest biotechnology methods of reproduction. The Siberian spruce 'Fastigiata Ural' (Picea obovata 'Fastigiata Uralica' Opletaev) is not typical for spruce appearance and more like the cypress, which opens prospects for its use in landscaping and greening of cities.

Key words: forest biotechnology, plant reproduction, Siberian spruce, Fastigiata uralica, vegetative propagation of spruce, rooting conifers.

The Siberian spruce, unlike the ordinary, is characterized by low polymorphism, so the discovery of her new decorative forms promising for breeding for forest biotechnology. The period of the life of woody plants is very high. Obtaining new forms of forest tree species on the basis of traditional breeding takes decades. In the Sverdlovsk region found a new decorative form of Siberian spruce 'Fastigiata Ural' (P. obovata Ledeb. var. 'Fastigiata Uralica'

Opletaev). The tree has an unusual form and has a columnar shape, shoots densely appressed to stem the downward spiral.

The range expansion of woody plants in forestry is carried out by introduction of exotic species [1], as well as a selection of decorative forms of the local flora [2]. The Siberian spruce Fastigiata Uralica found in a single copy in the territory of Sverdlovsk region. Our goal is breeding, cultivation and popularization of new decorative forms ate at the market of landscape design and gardening of the cities [3, 4].

The introduction of new forms of conifers in the green construction used method of grafting. The rooting of cuttings of the genus Picea, in addition to the individual characteristics of the genotype, interferes with the content of polyphenolic substances, which reduce the ability of cuttings to the rooting. a promising direction in forest biotechnology are to provide a method for grafting spruce, decreasing the concentration of polyphenols in planting material [5].

The result of three years of experiments on cuttings of Siberian spruce we have achieved rooting with the mother tree Fastigiata uralica at the level of 5-25% in order to secure the shape and create plantations of uterine of trees that will continue to be a source of genetic material for industrial breeding of this form.

Modern techniques of culture in vitro allow you to obtain planting material of valuable genotypes of coniferous breeds. However, from the experience of past projects in the forest biotechnologists may be noted that to pose the problem is to propagate the tree by the method of clonal micropropagation from vegetative tissues for commercial purposes it is very time consuming. You can obtain single copies at the price of great effort [6].

References:
1. Kozhevnikov A. P., Botanical gardens and arboretums of the world: study guide / A. P. Kozhevnikov; Ural state forest University. — Yekaterinburg: 2013. — 342 p.
2. Krekova J. A., Bancheva A. V., Zalesov S. V. Estimation of decorative traits of the genus Picea Dieter. in Northern Kazakhstan // Modern problems of science and education. – 2015. No. 1-1.; URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=17204 (date accessed: 10.01.2017).
3. Opletaev A. S., Zalesov S. V., Kozhevnikov A. P. New decorative form of Siberian spruce (Picea obovata Ledeb.) / Agrarian Bulletin of the Urals. — 2016. — №148(6) —S. 40-44.
4. Zalesov S., Opletaev A., Pryadilina N., Damary R. Fastigiata uralica is a new decorative form of Siberian spruce (Picea obovata Ledeb.) for landscaping // 9th International Scientific Conference WoodEMA 2016, The path forward for wood products: a global perspective. Louisiana, USA. — 2016. — P. 1-8.
5. Chumakova N. A. Improvement of the technology for vegetative propagation of conifers by grafting method // Izvestiya Timiryazev agrarian academy. — 2011 — issue 5 — Pp. 161-164
6. Shestibratov K. A., Lebedev V. G., Miroshnikov A. I. Forest biotechnology: methods, technologies, prospects // Biotechnology. — 2008. — No. 5 — Pp. 3-22

УДК 631.147

БИОТЕХНОЛОГИИ В ЭКОЛОГО-ЛАНДШАФТНОМ ЗЕМЛЕДЕЛИИ КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКИХ УРОЖАЕВ БЕЗОПАСНОЙ РАСТЕНИЕВОДЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Недикова Е.В., Линкина А.В., Ершова Н.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I
Россия, г. Воронеж, ул. Мичурина,1
Anna_linkina@rambler.ru

В статье рассматривается влияние биотехнологии на получение высоких урожаев растениеводческой продукции. Приводятся данные исследований по содержанию гумуса и обменных оснований в адаптивных агроландшафтах. Разработанный комплекс мероприятий позволяет повышать активность биологического компонента в органоминеральном комплексе почвы.

Ключевые слова: биотехнологии в агроландшафтах, органическое вещество почвы, гумус, биоразнообразие в адаптивном земледелии.

От уровня продуктивности почвы и эффективности ее использования зависит продовольственное обеспечение страны. Эколого-ландшафтное земледелие по сравнению с традиционным позволяет получить урожайность продовольственных, кормовых и технических культур до 30% выше, обеспечивая при этом защиту почв от деградации и эрозии. Биотехнологии в адаптивном земледелии представляют

собой комплекс мероприятий, направленный на увеличение плодородия и накопления органического вещества почвы. Это достигается за счет устройства агроландшафтов, максимально приближенного к природным условиям.

Проведенные в опытных хозяйствах (Кантемировский район Воронежской области, Белгородский район Воронежской области) исследования доказывают, что комплекс мероприятий, включающий проектирование агроландшафтов в разрезе агрофаций (элементарных ареалов агроландшафтов); предпочтительное размещение короткоротационных севооборотов (например, 5-польных) с возможной маневренностью плодосмена сельскохозяйственных культур; использование полосного земледелия; создание обеспечивающих биологическое разнообразие экотонов и заказников для энтомофауны и дикой фауны; насыщение севооборотов бобовыми и зернобобовыми культурами, обогащающими почвы азотными ферментно-активными бактериями, позволяет повышать активность биологического компонента в органоминеральном комплексе почвы. Наблюдения показали, что при таком устройстве агроландшафтов происходит повышение содержание гумуса до 2,99% на склонах юго-восточной экспозиции и обменных оснований до 1,5% с ясно выраженной дифференциаций гумусного слоя. При этом повышается резистентность сельскохозяйственных культур к заболеваниям, что позволяет сократить и даже исключить применение химических гербицидов. Исключение или минимальное использование химических пестицидов и удобрений напрямую связано с получением экологически безопасной растениеводческой продукции. Одним из количественных показателей агроландшафтов в экологически устроенных системах земледелия является индекс экологического разнообразия и экологическая устойчивость агроэкосистемы, которые отражают эффективность использования биотехнологических приемов на современном этапе.

Литература.
1. Недикова Е.В. Эколого-экономический механизм управления земельными ресурсами / Е.В. Недикова, Н.В. Ершова, Э.А. Садыгов, Г.А. Калабухов // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2016. – №1. – С. 269-276.
2. Ершова, Н.В. Земельный вопрос в аграрной политике // Актуальные проблемы природообустройства, кадастра и землепользования: матер. междунар. науч.-практ. конф., посвященной 95-летию факультета землеустройства и кадастров ВГАУ. – Ч. I. Воронеж: ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ, 2016. – С. 59 – 65.
3. Линкина А.В. Влияние соотношения средостабилизирующих и дестабилизирующих земельных угодий на порогоустойчивость агроландшафтов и плодородие почв /А.В. Линкина, М.И. Лопырев, Е.В. Недикова // Вестник Во-ронежского государственного аграрного университета. – 2016. – №2 (49). – С. 60-65.
4. Linkina, A., Nedicova, E. (2016). Ways to preserve soil fertility based on agrolandscape. AGROFOR International Journal, Volume 1. Issue No. 2. pp. 112-118. DOI:10.7251/AGRENG1602112L

BIOTECHNOLOGY IN ECOLOGICAL LANDSCAPE AGRICULTURE AS A WAY TO OBTAIN HIGH YIELDS OF SAFE CROP PRODUCTION

Nedicova E.V., Linkina A.V., Ershova, N.V.,

Voronezh State Agrarian University named Emperor Peter the Great

The article discusses the impact of biotechnology to obtain high yields of crop production. Data content of humus and exchangeable bases in adaptive agricultural landscapes is provides in research. It develops to allow a set of measures to improve the biological activity of a component in a complex organic-soil. Developed set of measures in agrolandscapes allow raising activity of biological components in organo-mineral complex.

Key words: biotechnology in agrolandscapes, organic substance, humus, biodiversity in adaptive farming

Food facility is depended on level of soil capability and land using efficiency. Ecological landscape agricultural in comparison with traditional farming give 30% more harvest, it provides soil from degradation and erosion. Biotechnology in adaptive agricultural represent action plan, which focuses on rise of soil fertility and accumulation of organic substance. It achieved by means of agrolandscape organization, which is close to environmental conditions.

Investigations in base farm (Kantemirovsky district of Voronezh region and Belgorod district in Belgorod region) argue that action plan allow to raise activity of biological components in organo-mineral complex. This action plan includes projection similar agroficies (environmentally homogeneous plots); short rotation order (5 field); strip cropping using; creating biodiversity nature – sanctuary, saturation of crop rotation by the grain

legumes and legumes, which fertilize of soil by nitric enzymatically active bacteria. Observation shows rise humus and exchangeable bases as higher as 2, 99% and 1, 5% respectively in south-eastern exposure slopes with clearly expressed differentiation of the humus layer. Crop resistance to diseases is increases, which minimizes the use of pesticides. It is associated with getting of environmental –friendly crop production. One of the quantities index of agrolandscape in adaptive farming is Environmental Sustainability Index, which shows efficient use of biotechnological methods at the present stage.

References:
1. Nedikova E.V. Environmental and economic mechanism of land resources management / E.V. Nedikova, Ershova N.V., Sadygov E.A., Kalabukhov G.A. // Vestnik of Voronezh state agrarian university. – 2016. – Issue No. 1. pp. 269-276
2. Ershova, N.V. Zemelnyj vopros v agrarnoj politike // Aktualnye problemy prirodoobustrojstva, kadastra i zemlepolzovanija: mater. mezhdunar. nauch.-prakt. konf., posvjashhennoj 95-letiju fakul'teta zemleustrojstva i kadastrov VGAU. – Ch. I. Voronezh: FGBOU VO Voronezhskij GAU, 2016. – S. 59 – 65.
3. Linkina Anna V. Environment-stabilizing and destabilizing lands ratio influence on threshold resistanse of agrolandscapes and soil fertility / A. V. Linkina, M.I. Lopyrev, E. V. Nedicova // Vestnik of Voronezh state agrarian university. – 2016. – Issue No. 2. pp. 60-65
4. Linkina, A., Nedicova, E. (2016). Ways to preserve soil fertility based on agrolandscape. AGROFOR International Journal, Volume 1. Issue No. 2. pp. 112-118. DOI:10.7251/AGRENG1602112L

УДК 631.111.3

СОХРАНЕНИЕ ПЛОДОРОДИЯ ПОЧВ ЦЕНТРАЛЬНО-ЧЕРНОЗЕМНОГО РЕГИОНА НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Лопырев М.И., Недикова Е.В., Линкина А.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I
Россия, г. Воронеж, ул. Мичурина,1
Anna_linkina@rambler.ru

В статье представлена современная интерпретация организации и устройства агроландшафта на экологической основе с ориентацией на улучшение экологии землепользования и окружающей среды. Методические предложения по организации новых агроэкосистем землепользований основываются на многолетнем производственном опыте, базирующемся на биоэкологических процессах, протекающих в агроландшафтах.

Ключевые слова: биоэкология, устройство агроландшафтов, устойчивость систем земледелия, эколого-экономическая эффективность.

Центрально-Черноземный регион представляет собой агроиндустриальный комплекс с благоприятными природно-климатическими условиями. Продуктивность почв по сравнению с другими регионами России выше в 1,5 раза. Но глобальные экологические последствия угрожают состоянию землепользования как основе сельскохозяйственного производства: происходит снижение земельно-ресурсного потенциала, сокращаются запасы гумуса, повышается сельскохозяйственная освоенность территории и ее распаханность, а также усугубляются природные неблагоприятные явления (засуха).

Ежегодные потери гумуса и органического вещества почвы составляют 0,5-1 т/га. В этих условиях применение биотехнологических методов при организации агроландшафтов становится основой для улучшения состояния окружающей среды, восстановления экологического баланса и плодородия почв.

Сущность конструирования новых агроэкосистем землепользований базируется на законах экологии, биоэкологи и рекомендациях В.В. Докучаева.

Фундаментом сохранения почвенного плодородия ЦЧР является специальное экологически устойчивое устройство агроландшафтов, в результате которых создаются новые конструктивные агросреды. Одним из основных принципов является дифференциация при использовании земельных угодий, когда территория зонируется на экологически однородные участки, базирующиеся на элементах мезорельефа и ограниченные однородной почвенной структурой со схожими геологическими и микроклиматическими условиями.

При формировании агроландшафтов землепользований решаются следующие задачи: адаптивное

возделывание сельскохозяйственных культур на пахотных угодьях и конструирование агроландшафтов землепользований. Предлагается помимо известных компонентов агроландшафта дополнительно проектировать следующие компоненты: создание экологически однородных участков (агрофации); проектирование экотонов на смежных земельных угодьях; размещение энтомологических микрозаказников для опыления сельскохозяйственных культур; формирование «островных» участков или луговин, образующиеся при механизированной обработке на стыке лесных полос и границ агрофаций; планирование кормовых полей для диких животных и птиц; создание «зеленых зонтов» для сельскохозяйственных животных на кормовых угодьях; проектирование байрачных лесов на овражно-балочной сети; размещение пасечных стоянок на сельскохозяйственных угодьях и севооборотных массивах; планирование дамб-перемычек и противоэрозионных прудков у вершин оврагов.

Новая агроэкосистема землепользования, базирующаяся на биоэкологических процессах, протекающих в агроландшафтах, апробирована кафедрой землеустройства и ландшафтного проектирования Воронежского государственного аграрного университета в сельскохозяйственном предприятии «Дружба» Кантемировского района Воронежской области. Данный эксперимент проводится 30 лет, охватывает площадь 10 тыс. га и является ландшафтной основой для сбалансированной системы земледелия, а значит сохранения плодородия почв.

Литература.
1. Дедов А.В. Основные приемы повышения плодородия черноземов // Вестник Воронежского государственного аграрного университета, 2012. – № 1. – С. 12-15.
2. Каталог проектов агроландшафтов и земледелие (сохранение плодородия почв, территориальная организация систем земледелия, устойчивость к изменению климата): научно-практическое пособие) / Колл. авторов; под ред. проф. М.И. Лопырева. – Воронеж: ФГБОУ ВПО Воронежский ГАУ, 2013. – 183 с.
3. Лопырев М.И., Постолов, Е.В. Недикова, Чечин Д.И. Конструирование экологически устойчивых агроландшафтов новый этап в развитии землеустройства и земледелия//Землеустройство, кадастр и мониторинг земель, 2008. – № 3. – С. 20-25.

CONSERVE SOIL FERTILITY IN THE CENTRAL BLACK SOIL REGION BASED ON BIOLOGICAL METHODS

Lopyrev M.I., Nedicova E.V., Linkina A.V.,

Voronezh State Agrarian University named Emperor Peter the Great

The article discussed a modern interpretation of the agrolandscape organization and structure, which is focuses on environmental improvement. Methodological proposals for land management based on many years of experience that examines biological and ecological processes in agricultural landscapes.

Key words: bioecology, agrolandscape's structure, sustainability of farming system, ecologic and economic efficiency.

Central Black Earth region is an agroindustrial complex with favorable climatic conditions. Soil productivity in comparison with other regions of Russia is 1.5 times higher. However, the global environmental consequences of land use are threatening agricultural production, because land and resource potential is decreases, humus stock is shrinking, agricultural development of the territory and its plowed rises, and natural adverse events (drought) are compounds.

The annual loss of humus and soil organic matter of 0.5-1 t / ha. In these circumstances, the use of biotechnological methods in the organization of agricultural landscapes become the basis for improving the environment, restoration of ecological balance and soil fertility. The essence of new agroecosystems construction is based on environmental laws and guidelines bioecology by Dokuchaev.

The foundation of the conservation of soil fertility in the Black Earth Region is a special environmentally sustainable agricultural landscapes device, which resulted in the creation of new structural landscapes. One of the basic principles is land-using differentiation, when the area is zoned for environmentally homogeneous areas based on mesorelief elements and limited homogeneous soil structure with similar geological and microclimatic conditions. The following tasks in the formation of agricultural landscapes are adaptive cropping on arable lands and construction land use of agricultural landscapes. It is proposed in addition to the known components of the agricultural landscape in addition to design the following components: similar agroficies (environmentally homogeneous plots), ecotones, entomological micro-reserves for pollination of agricultural crops, he formation of

«island» areas or meadows, formed by mechanical processing, fodder fields for wild animals, shade clump, ravine forest, beeyard on the crop rotation, earth dams and antierosional pool near gully head.

New land agroecosystem, based on biological and ecological processes occurring in agricultural landscapes, approved by the Department of Land Survay and Landscaping of The Voronezh State Agricultural University in agricultural enterprise «Druzhba» Kantemirovsky district of Voronezh region. This experiment was carried out 30 years, it covers an area of 10 thousand ha and it is the basis for a balanced landscape system of agriculture, and therefore soil conservation.

Refereces:
1. Dedov A.V. Osnovnye priemy povysheniya plodorodiya chernozemov // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2012. – № 1. – S. 12-15.
2. Katalog proektov agrolandshaftov i zemledelie (sohranenie plodorodiya pochv, territorial'naya organizaciya sistem zemledeliya, ustojchivost' k izmeneniyu klimata): nauchno-prakticheskoe posobie) / Koll. avtorov; pod red. prof. M.I. Lopyreva. – Voronezh: FGBOU VPO Voronezhskij GAU, 2013. – 183 s.
3. Lopyrev M.I., Postolov, E.V. Nedikova, CHechin D.I. Konstruirovanie ehkologicheski ustojchivyh agrolandshaftov novyj ehtap v razvitii zemleustrojstva i zemledeliya//Zemleustrojstvo, kadastr i monitoring zemel', 2008. – № 3. – S. 20-25.

УДК 631.147

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ДЛЯ УСТРОЙСТВА АДАПТИВНЫХ АГРОЛАНДШАФТОВ

Недикова Е.В., Линкина А.В., Лопырев М.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I
Россия, г. Воронеж, ул. Мичурина,1
Anna_linkina@rambler.ru

В статье приводятся биотехнологические приемы, используемые для эколого-ландшафтного землеустройства. Отмечается суммарный эколого-экономический эффект от внедрения биотехнологий в адаптивном земледелии. Раскрывается механизм сохранения и восстановления плодородия почв с использованием биоресурсов.

Ключевые слова: биотехнологии в адаптивном земледелии, плодородие почв, агроландшафты, органическое вещество почв.

Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года, а также Российская технологическая Платформа «Биоиндустрия и Биоресурсы – БиоТех2030» закрепляет обеспечение поддержки на государственном уровне развития биотехнологий в сельском хозяйстве. Они ориентированы на стабильное развитие агропромышленного комплекса, решение проблемы продовольственной безопасности, получение высококачественных и экологически чистых продуктов питания, переработку отходов сельскохозяйственного производства, восстановление плодородия почв. Доктрина продовольственной безопасности Российской Федерации устанавливает приоритет повышения плодородия почв и экологизацию производства с использованием биотехнологических приемов. Парадигма адаптивно-ландшафтного земледелия направлена на решение указанных задач.

В связи с неоднородностью почвенно-климатических условий и потребностями посевов крайне необходимым является использование технологии точного земледелия на основе данных агроэкологической оценки земель. С учетом локальных особенностей экосистем положительное влияние на сохранение плодородия почв оказывает и органическое земледелие, при котором не используются химические средства защиты растений с заменой их аналогами биологического происхождения. Это достигается на основе биологических приемов. Одним из действенных способов является использование в качестве элементов агроландшафтов для экологизации землепользования энтомологических микрозаказников для опыления сельскохозяйственных культур, а также создание заказников для орнитофауны для борьбы с вредителями. В пользу последнего метода говорит и тот факт, что медленно разлагающиеся ядохимикаты накапливаются в почве, водоемах, растениях, организмах животных и птиц в количествах, нередко превышающих допустимые нормы. Например, высоко аккумулятивный и канцерогенный пестицид ДДТ, запрещенный к применению в 70-е годы, по биологической цепи распространился так широко, что его обнаруживают даже в мышечной ткани пингвинов в Антарктиде. Многократное опрыскивание посевов пестицидами, приводя

к загрязнению окружающей среды и сельхозпродукции, кроме того способствует возрастанию в сотни раз устойчивости вредителей (паутинный клещ, оранжерейная белокрылка) к препаратам и резко снижает эффективность таких обработок. В связи с этим использование биотехнологических приемов при устройстве агроландшафтов является перспективным направлением в современном земледелии.

Литература.
1. Каталог проектов агроландшафтов и земледелие (сохранение плодородия почв, территориальная организация систем земледелия, устойчивость к изменению климата): научно-практическое пособие) / Колл. авторов; под ред. проф. М.И. Лопырева. – Воронеж: ФГБОУ ВПО Воронежский ГАУ, 2013. – 183 с.
2. Линкина А.В. Влияние соотношения средостабилизирующих и дестабилизирующих земельных угодий на порогоустойчивость агроландшафтов и плодородие почв /А.В. Линкина, М.И. Лопырев, Е.В. Недикова // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2016. – №2 (49). – С. 60-65.
3. Linkina, A., Nedicova, E. (2016). Ways to preserve soil fertility based on agrolandscape. AGROFOR International Journal, Volume 1. Issue No. 2. pp. 112-118. DOI:10.7251/AGRENG1602112L

BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR DEVICES ADAPTIVE AGROLANDSCAPES

Nedicova E.V., Linkina A.V., Lopyrev M.I.

Voronezh State Agrarian University named Emperor Peter the Great

The article presents the biotechnological methods, which used for ecological and land management landscape. The total ecological and economic impact of biotechnology in the implementation of adaptive agriculture is presented. The mechanism of preservation and restoration of soil fertility with the use of biological resources is discussed.

Key words: biotechnology in the adaptive agriculture, soil fertility, agricultural landscapes, soil organic matter.

A comprehensive program of biotechnology development in the Russian Federation for the period up to 2020, as well as Russian technological platform «Bioindustry and Bioresources - BioTeh2030» establish providing support the development of biotechnology in agriculture at the state level. They are focused on sustainable agriculture development, food security, obtain high quality and environmentally friendly food products, processed agricultural waste, restoration of soil fertility. The doctrine of the Russian Federation Food Safety sets the priority of improving soil fertility and the greening of production using biotechnological methods. The paradigm of adaptive landscape agriculture aimed at solving these problems.

Due to the heterogeneity of soil and climatic conditions and the needs of the crops it is extremely necessary to use precision farming technologies based on agro-ecological land evaluation data. Organic farming has a positive impact on the preservation of soil fertility because it takes into account the peculiarities of local ecosystems, organic farming do not use chemical pesticides with the replacement of their biological counterparts. This is achieved through biological methods. One of the most effective ways is to use as elements of agricultural landscapes for land greening entomological micro-reserves for the pollination of crops and the creation of sanctuaries for avifauna for pest control. In favor of the latter method is the fact that the slowly decaying pesticides accumulate in the soil, waters, plants, animals and birds in the amounts, often exceeding the permissible limits. For example, highly accumulative and carcinogenic pesticide DDT, banned for use in 1970 years, according to the biological chain has spread so widely that it detected even in the muscle tissue of penguins in Antarctica. Repeated spraying crops with pesticides leading to contamination of the environment and agricultural products also contributes to an increase in the stability of the hundreds of times pests (spider mites, whitefly hothouse) to drugs and dramatically reduces the effectiveness of such treatments. That is why the use of biotechnological methods in the device agricultural landscapes is a promising trend in modern agriculture.

References:
1. Katalog proektov agrolandshaftov i zemledelie (sohranenie plodorodiya pochv, terri-torial'naya organizaciya sistem zemledeliya, ustojchivost' k izmeneniyu klimata): nauchno-prakticheskoe posobie) / Koll. avtorov; pod red. prof. M.I. Lopyreva. – Voronezh: FGBOU VPO Voronezhskij GAU, 2013. – 183 s.
2. Linkina Anna V. Environment-stabilizing and destabilizing lands ratio influence on threshold resistanse of agrolandscapes and soil fertility / A. V. Linkina, M.I. Lopyrev, E. V. Nedicova // Vestnik of Voronezh state agrarian university. – 2016. – Issue No. 2. pp. 60-65
3. Linkina, A., Nedicova, E. (2016). Ways to preserve soil fertility based on agrolandscape. AGROFOR International Journal, Volume 1. Issue No. 2. pp. 112-118. DOI:10.7251/AGRENG1602112L

УДК 620.95:631.248:636 (470.325)

БИОГАЗОВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ОТХОДОВ ПТИЦЕВОДСТВА БЕЛГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ РОССИИ

Мирошниченко И.В.[1], Линднер Й.Ф.[2]

[1]Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина, Белгород, Россия
308503, Белгородская область, п. Майский, ул. Вавилова, д.1
e-mail: imiroshnichenko_@mail.ru
[2]Университет Хоэнхайм, Штутгарт, Германия

Установлены основные показатели биогазовой продуктивности помета сельскохозяйственной птицы в условиях Белгородской области России, которые могут быть использованы для проектирования биогазовых станций.

Ключевые слова: биогаз, метан, субстраты, отходы птицеводства, биодеградация

Белгородская область России является лидером по производству мяса птицы в стране, при этом ежегодно здесь образуется более трех миллионов тонн помета. Его компоненты могут использоваться в качестве удобрения, включаясь в природные круговороты веществ и энергии. Однако проблема заключается в количестве отходов – экосистемы не в состоянии переработать образующуюся массу.

В Белгородской области все более популярными становятся такие способы утилизации отходов, как компостирование и биогазовые технологии. Оборудование для производства биогаза в России в подавляющем большинстве случаев поставляется из-за рубежа, но при проектировании биогазовых станций не учитываются региональные особенности субстратов, которые могут отличаться от ориентировочных цифр Управления техники и строительства в сельском хозяйстве (KTBL), используемых при проектировании установок в Германии [1].

Исследования проведены на базе Белгородского ГАУ и университета Хоэнхайм. Цель – изучение основных показателей биогазовой продуктивности помета кур, сравнение их с показателями KTBL. Материал исследований – помет кур-несушек, цыплят-бройлеров, кур смешанного направления продуктивности из личного подсобного хозяйства Белгородской области. Отбор, подготовку проб, определение состава исходных субстратов определяли по [3]; оценку биогазовой продуктивности проводили с помощью Хоэнхаймского теста выхода биогаза [2, 4]; степень биодеградации органического вещества субстратов рассчитывали, исходя из массы выделившегося биогаза.

Анализ биогазовой продуктивности субстратов показал, что самый высокий специфический выход биогаза – из помета цыплят-бройлеров (0,456 мн3/кг органического вещества (ОВ)), несколько ниже – из помета кур смешанного направления продуктивности (0,375 мн3/кг ОВ), самый низкий – из помета от кур-несушек (0,363 мн3/кг ОВ); данный показатель в Германии колеблется от 0,250 до 0,450 мн3/кг ОВ [1]. Выход метана составил: из субстратов Белгородской области соответственно 58, 54 и 59%, из субстратов Германии – 60% [1]. Степень биодеградации органического вещества субстратов показывает эффективность способа утилизации отходов и для Белгородской области России имеет не меньшее значение, чем получение энергии. Самый высокий показатель у помета цыплят-бройлеров (49,1%), несколько ниже – у помета кур смешанного направления продуктивности (48,8%), самый низкий – у помета кур-несушек (45,0%); у субстратов из Германии данный показатель составляет в среднем 67% [1].

Таким образом, помет кур из России в среднем дает выход биогаза на 4,85% выше, однако содержание в нем метана на 2,75% ниже. Помет кур российского происхождения по степени биодеградации уступает в среднем на 20%.

Литература.
1. Faustzahlen Biogas / Döhler, H.; Eckel, H.; Fröba, N. u.a. Darmstadt: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL), 2009.
2. Hellfrich D., Oechsner H. Hohenheimer Biogasertragstest. Vergleich verschiedener Laborverfahren zur Vergärung von Biomasse // Agrartechnische Forschung. 2003. N 9. Heft 3. S. 27 – 30.
3. Pfeiffer D., Dittrich-Zechendorf M. Messmethodensammlung Biogas: Methoden zur Bestimmung von analytischen und prozessbeschreibenden Parametern im Biogasbereich. Leipzig: Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH (DBFZ), 2012.
4. VDI 4630: Vergärung organischer Stoffe; Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche. Beuth Verlag GmbH, 2006.

UDC 620.95:631.248:636 (470.325)

BIOGAS POTENTIAL OF POULTRY MANURE IN THE BELGOROD REGION IN RUSSIA

Miroshnichenko, I.V.[1], Lindner, J.Ph.[2]

[1]Belgorod state agricultural university named after V. Gorin, Belgorod, Russia
308503, Belgorod region, Mayskiy, Vavilova, 1
e-mail: imiroshnichenko_@mail.ru
[2]University of Hohenheim, Stuttgart, Germany

In this investigation, parameters for the biogas production form poultry manure in the Belgorod Region were determined. This parameters are very important for further biogas plant construction.

Key words: biogas, methane, substrate, poultry manure, degradation of organic material

The Oblast Belgorod is the territory with the highest poultry meat production in Russia. This results in a production of over 3 million tons of poultry manure every year, which should be used as fertilizer in plant production to reach a closed nutrient cycle. However, the direct use of this high amount of organic wastes lead to an overloading of the ecological system.

Therefore, over the recent years some composting and biogas facilities were constructed in the Belgorod region. For the economic efficiency calculations and the plant designs frequently German indexes such as published from the KTBL [1] were used. However, by this calculations regional differences of the substrate compositions, which occurs especially by agricultural residues, were often not considered. This results often in an overestimation of the biogas yields and the predicted power output often was not achieved.

The aim of this study is to detect the specific biogas yields and the degree of degradation of chicken manure in the Belgorod region. The experiments were conducted at the Belgorod state agricultural university named after V. Gorin (Russia) and at the University of Hohenheim (Germany). As substrate the manure from laying hens, broiler chickens and poultry of housekeeping (mixed bread) were used. The sample collection and the analysis of raw substrate were conducted according to Pfeiffer and Dittrich-Zechendorf [2]. Biogas yields were determined with the highly reproducible Hohenheim biogas yield test [2, 4]. The degree of degradation was calculated by the amount of added organic dry matter and the mass of produced biogas.

The highest specific biogas yield could be detected by the manure from broiler chickens (0.456 Nm3/kg oDM). The biogas yields of manure from poultry of housekeeping (0.375 Nm3/kg oDM) and laying hens (0.363 Nm3/kg oDM) were significantly lower. In German literature described biogas yields for poultry manure are between 0.250 und 0.450 Nm3/kg oDM [1]. The methane content was 58% by manure from broiler chickens, 54% by manure from laying hens and 59% by manure from poultry of housekeeping. This values are a little bit lower in comparison to the German index value of 60% [1]. The degree of organic dry matter degradation, show how effective is the waste recycling procedure. This is an extremely important parameter especially in Russian regions with a high livestock density like the Oblast Belgorod. The highest degree of organic dry matter degradation could be determined by the manure from broiler chickens (49.1%). By the manure from poultry of housekeeping decrease the degree of organic dry matter degradation to 48.8%, and by laying hens to 45.0%.In German literature a degree of organic dry matter degradation by 67% is described [1].

This investigation showed comparable biogas yields and methane concentrations too in German literature described indexes for poultry manure.

References:
1. Faustzahlen Biogas / Döhler, H.; Eckel, H.; Fröba, N. u.a. Darmstadt: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL), 2009.
2. Hellfrich D., Oechsner H. Hohenheimer Biogasertragstest. Vergleich verschiedener Laborverfahren zur Vergärung von Biomasse // Agrartechnische Forschung. 2003. N 9. Heft 3. S. 27 – 30.
3. Pfeiffer D., Dittrich-Zechendorf M. Messmethodensammlung Biogas: Methoden zur Bestimmung von analytischen und prozessbeschreibenden Parametern im Biogasbereich. Leipzig: Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH (DBFZ), 2012.
4. VDI 4630: Vergärung organischer Stoffe; Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche. Beuth Verlag GmbH, 2006.

УДК 633.15

ПОВЫШЕНИЕ ЗЕРНОВОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ КУКУРУЗЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Прохорова Л.Н.[1], Волков А.И.[1], Кириллов Н.А.[2]

[1]Чувашская государственная сельскохозяйственная академия, Россия
428000, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. К. Маркса, 29
[2]Волжский филиал МАДИ, Россия
42800, Чувашская Республика, г. Чебоксары, пр. Тракторостроителей, 101, корп. 30.
e-mail: lubashka-1502@mail.ru

Подбор гибридов с высокой генетической продуктивностью на фоне применения регуляторов роста растений способствует повышению урожайности зерна кукурузы в агроклиматических условиях Чувашии.

Ключевые слова: зерновая продуктивность, кукуруза, гибрид, регуляторы роста.

Препятствием к широкому распространению зерновой кукурузы в Поволжье до последнего момента являлись отсутствие холодостойких гибридов с коротким периодом вегетации и современных приемов возделывания [1-11]. С появлением на рынке регуляторов роста, способных сокращать период вегетации и оптимизировать использование растениями тепловых и пищевых ресурсов, стало возможным успешное возделывание кукурузы на зерно во многих северных регионах России, включая Чувашию, что и послужило основанием для проведения настоящих исследований

В лабораторных условиях нами было установлено, что обработка регуляторами роста Байкалом ЭМ 1, Крезацином, Цирконом и Эпином повышает энергию прорастания семян, лабораторную и полевую всхожесть семян гибрида кукурузы РОСС 145 МВ на 9-16; 3-7 и 12-14%; Поволжский 107 СВ – на 4-19; 2-7 и 13-23%; Катерина СВ – на 7-29; 1-7 и 12-16%; НК Гитаго – на 3-15; 3-6 и 13-16% соответственно.

Предпосевная обработка семян и двукратное опрыскивание посевов водными растворами современных регуляторов роста способствует накоплению вегетативной массы растений кукурузы. Варианты с использованием регуляторов превышали контрольные на 17-26% – при возделывании гибрида РОСС 145 МВ; на 3-5% – гибрида Поволжский 107 СВ; на 23-44% – гибрида Катерина СВ и на 16-28% – гибрида НК Гитаго.

При использовании данных регуляторов роста растений урожайность зерна кукурузы повышается на 14-40% в зависимости от используемого гибрида. Так, на гибриде РОСС 145 МВ прибавка урожая составила 0,64-1,53 т/га; на гибриде Поволжский 107 СВ – 0,40-0,65 т/га; на гибриде Катерина СВ – 0,71-1,02 т/га и на гибриде НК Гитаго – 0,72-1,14 т/га.

Таким образом, подбор гибридов, имеющих высокий генетический потенциал продуктивности, вкупе с применением регуляторов роста позволяет повысить зерновую урожайность кукурузы в агроклиматических условиях Чувашии.

Литература.
1. Волков А.И., Кириллов Н.А. Короткоротационные севообороты с включением кукурузы для малых форм хозяйствования // Аграрная Россия. – 2016. – № 8. – С. 2-5.
2. Волков А.И., Прохорова Л.Н., Кириллов Н.А. Способ повышения урожайности, питательной и энергетической ценности зерна кукурузы // Кормопроизводство. – 2013. – № 7. – С. 16-17.
3. Волков А.И., Кириллов Н.А., Прохорова Л.Н., Куликов Л.А. Перспективы «нулевой» обработки почвы при возделывании кукурузы на зерно в Волго-Вятском регионе // Земледелие. – 2015. – № 1. – С. 3-5.
4. Волков А.И., Кириллов Н.А., Прохорова Л.Н. Перспективные сорта и гибриды кукурузы на зерно для Волго-Вятского региона // Аграрная Россия. – 2013. – № 10. – С. 5-7.
5. Волков А.И., Кириллов Н.А., Прохорова Л.Н. Повышение продуктивности земельных ресурсов Чувашии // Агро XXI. – 2014. – № 10-12. – С. 26-27.
6. Кириллов Н.А., Волков А.И., Прохорова Л.Н. Внедрение в севообороты нетрадиционных культур // Аграрная наука. – 2014. – № 5. – С. 10-12.
7. Кириллов Н.А., Волков А.И. Способ возделывания кукурузы на зерно в агроклиматических условиях Чувашской Республики // Патент России № 2569240. 2015. Бюл. № 32.
8. Кириллов Н.А., Волков А.И. Энергосберегающие технологии возделывания кукурузы на зерно // Инновации в сельском хозяйстве. – 2016. – № 3 (18). – С. 125-130.
9. Прохорова Л.Н., Волков А.И., Кириллов Н.А. Отзывчивость гибридов кукурузы на применение регуляторов роста и развития растений // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 2 (30). – С. 24-28.

10. Прохорова Л.Н., Волков А.И., Кириллов Н.А., Куликов Л.А. Энергетическая эффективность биопрепаратов при зерновой технологии возделывания кукурузы // Аграрная Россия. – 2015. – № 9. – С. 2-5.
11. Kulikov L.A., Volkov A.I., Kirillov N.A., Semenov V.G., Ershov M.A. Use of the multicomponent biostimulator and microfertilizer on crops of corn // Proceedings of the VIII International Academic Congress «Development of Countries in Asia, Africa and Europe: Past, Present and Future». Volume II. «Seoul National University Press». 2016. P. 70-74.

UDC 633.15

THE INCREASE IN GRAIN PRODUCTIVITY OF MAIZE BY BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Prokhorova L.N., Volkov A.I., Kirillov N.A.

Chuvash state agricultural Academy, Russia
428003, Chuvash Republic, Cheboksary, str. K. Marks, 29
Moscow Automobile and Road Construction State Technical University, Russia
428003, Chuvash Republic, Cheboksary, pr. Tractorostroiteley, 101, korp. 30.
e-mail: lubashka-1502@mail.ru

Selection of hybrids with high genetic productivity on a background of application of plant growth regulators promotes increase of grain yield of maize in agroclimatic conditions of the Chuvash Republic.

Key words: crop productivity, maize, hybrid, growth regulators.

An obstacle to wide distribution of the grain corn in the Povolgskiy region until the last moment was the lack of cold-hardy hybrids with short vegetation period and modern cultivation methods [1-11]. With the advent of market regulators of growth, capable of reducing the growing period and to optimize the use of thermal plants and the food supply, made possible the successful cultivation of grain maize in many northern regions, including Chuvashia, which served as the basis for carrying out the present study.

In the laboratory we have found that the treatment with growth regulators Baikal EM 1, Krezatsin, Zircon and Appin enhances seed vigor, laboratory and field germination of seeds of hybrid maize ROSS 145 MV 9-16; 3-7 and 12-14%; Povolgskiy 107 SV – 4-19; and 2-7 13-23%; Katerina SV – 7-29; 1-7 and 12-16%; NK Gitago – 3-15; 3-6 and 13-16%, respectively.

Presowing treatment of seeds and double spraying of crops with water solutions of modern growth regulators contributes to the accumulation of vegetative mass of corn. The options using the controls was higher than the control at 17 to 26% – in the cultivation of hybrid ROSS 145 MV; 3-5% – hybrid Povolgskiy 107 SV; 23-44% – hybrid Katerina SV and 16-28% – hybrid NK Gitago.

When using these growth regulators of plants grain yield of maize increased by 14-40% depending on hybrid. Thus, the hybrid ROSS 145 MV yield increase of 0.64-1.53 t/ha; hybrid Povolgskiy 107 SV – 0.40-0.65 t/ha; hybrid Katerina SV – 0.71-1.02 t/ha and hybrid NK Gitago – 0.72-1.14 t/ha.

Thus, the selection of hybrids with high genetic potential of productivity, coupled with the application of growth regulators allows to increase the grain yield of maize in agroclimatic conditions of the Chuvash Republic.

References:
1. Волков А.И., Кириллов Н.А. Короткоротационные севообороты с включением кукурузы для малых форм хозяйствования // Аграрная Россия. – 2016. – № 8. – С. 2-5.
2. Волков А.И., Прохорова Л.Н., Кириллов Н.А. Способ повышения урожайности, питательной и энергетической ценности зерна кукурузы // Кормопроизводство. – 2013. – № 7. – С. 16-17.
3. Волков А.И., Кириллов Н.А., Прохорова Л.Н., Куликов Л.А. Перспективы «нулевой» обработки почвы при возделывании кукурузы на зерно в Волго-Вятском регионе // Земледелие. – 2015. – № 1. – С. 3-5.
4. Волков А.И., Кириллов Н.А., Прохорова Л.Н. Перспективные сорта и гибриды кукурузы на зерно для Волго-Вятского региона // Аграрная Россия. – 2013. – № 10. – С. 5-7.
5. Волков А.И., Кириллов Н.А., Прохорова Л.Н. Повышение продуктивности земельных ресурсов Чувашии // Агро XXI. – 2014. – № 10-12. – С. 26-27.
6. Кириллов Н.А., Волков А.И., Прохорова Л.Н. Внедрение в севообороты нетрадиционных культур // Аграрная наука. – 2014. – № 5. – С. 10-12.
7. Кириллов Н.А., Волков А.И. Способ возделывания кукурузы на зерно в агроклиматических условиях Чувашской Республики // Патент России № 2569240. 2015. Бюл. № 32.
8. Кириллов Н.А., Волков А.И. Энергосберегающие технологии возделывания кукурузы на зерно // Инновации в сельском хозяйстве. – 2016. – № 3 (18). – С. 125-130.

9. Прохорова Л.Н., Волков А.И., Кириллов Н.А. Отзывчивость гибридов кукурузы на применение регуляторов роста и развития растений // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 2 (30). – С. 24-28.
10. Прохорова Л.Н., Волков А.И., Кириллов Н.А., Куликов Л.А. Энергетическая эффективность биопрепаратов при зерновой технологии возделывания кукурузы // Аграрная Россия. – 2015. – № 9. – С. 2-5.
11. Kulikov L.A., Volkov A.I., Kirillov N.A., Semenov V.G., Ershov M.A. Use of the multicomponent biostimulator and microfertilizer on crops of corn // Proceedings of the VIII International Academic Congress «Development of Countries in Asia, Africa and Europe: Past, Present and Future». Volume II. «Seoul National University Press». 2016. P. 70-74.

УДК 631.528.1.

НОВЫЙ ХЕМОМУТАНТНЫЙ СОРТ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ЦЕНТРАЛЬНОГО РЕГИОНА РОССИИ. ПОВЯЩАЕТСЯ 70-ЛЕТИЮ ОТКРЫТИЯ МЕТОДА ХИМИЧЕСКОГО МУТАГЕНЕЗА И.А. РАПОПОРТОМ (1946 – 2016)

[1]Эйгес Н.С., [1]Волченко Г.А., [2]Волченко С.Г., [3]Духанин Ю.А., *Кузнецова Н.Л., *Упелниек В.П., [1]Александров Е.Н.

[1]ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. Москва. Россия 119334. Косыгина 4.
[2]Союз писателей Москвы. Москва. Россия. 121069 Большая Никитская, д. 50а/5, стр. 1.
[3]ФГБУ Министерство сельского хозяйства и продовольствия. Правительство Московской области. Москва. Россия. 127994 Садово-Триумфальная 10/13.
**ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН. Москва, Россия, 127276. ул. Ботаническая, д. 4.*
volchenkos@mail.ru

Представлены: происхождение нового хемомутантного сорта озимой пшеницы, характеристика его свойств и признаков коллекции, из которой он был выделен. Показаны высокая зимостойкость и высокие технологические свойства сорта.

Ключевые слова: химический мутагенез, хемомутанты, коллекция хемомутантов, озимая пшеница, сорт, зимостойкость, мутаген, этиленимин.

Новый хемомутантый сорт озимой пшеницы Солнечная после 3 – 4-летних Госсортоиспытаний был включён в Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию по Центральному региону России (Ивановская область). В Ивановской области сорт Солнечная стабильно превышал по урожаю местные стандартные сорта. Наиболее значительное превышение составило 8,6 ц/га, то есть 41% по отношению к стандарту. Сорт выращивается в районах Московской и Рязанской областей с перспективой дальнейшего распространения. Данный сорт является «выходцем» из обширной коллекции хемомутантов и константных гибридов. Последние получены от скрещивания перспективных мутантов с сортами, в том числе немутантного происхождения. Характерные черты коллекции – широкое генотипическое и фенотипическое разнообразие [1], наличие новых и редких признаков [2, 3], в том числе, генетически (теоретически) интересных и селекционно ценных. Особое внимание уделяется комплексам ценных признаков [4], которые вне метода химического мутагенеза получить весьма трудно [5]. Коллекция хемомутантов была создана при удачном сочетании 3-х составляющих в соответствии со схемой: мутаген – доза – исходный сорт. Исходный сорт пшенично-пырейный гибрид (ППГ) 186 оказался наиболее мутабильным из испытанных нами иных сортов. Поэтому данный сорт используется нами в химическом мутагенезе. Таким образом, сорт ППГ 186 возвращён из генетического и селекционного небытия. Данные цитогенетического анализа говорят о том, что в геноме исходного сорта ППГ 186 содержится генетический материал пырея [6], который вероятно определяет его зимостойкость. Последняя ещё более повысилась благодаря хемомутациям. Высокая мутабильность сорта также связана с его происхождением и повышением уровня гетерозиготности. Высоко эффективный мутаген этиленимин (ЭИ), неоднократно опробованный И.А. Рапопортом [7] на классическом генетическом объекте дрозофиле, в сочетании с наиболее мутагенными дозами дал эффект высокой частоты мутаций и, соответственно, мутантов [1,2], при наиболее широком разнообразии мутационного спектра [1,2]. Из коллекции были выделены селекционно ценные образцы – исходный материал для будущих сортов. В том числе был получен перспективный хемомутант, который скрещивался с иными сортами немутантного происхождения. При этом наблюдалась высокая комбинационная способность признаков. Особенно высокой она была при скрещивании хемомутанта с сортом

Мироновская 808, выразившаяся в высоком генотипическом и фенотипическом разнообразии признаков гибридного потомства, которые приумножили разнообразие признаков коллекции хемомутантов. Сюда же присоединяется трансгрессивное наследование признаков обоих родителей [5]. При наличии множественных мутаций [8] и отсутствии плейотропии, под влиянием мутагена происходит ослабление некоторых корреляционных связей между признаками (в том числе нежелательных), которые сложились ранее в процессе естественного отбора и которые представляют собой генетические барьеры, препятствующие сочетанию в одной форме ряда желательных признаков. Здесь большую роль играют отборы [9], которые помогают улучшать хемомутантные сорта, например по признакам, определяющим, структуру урожая. Сорт Солнечная сочетает в себе трудно сочетаемые признаки: стабильная урожайность + стабильное продовольственное качество + высокие адаптивные свойства + устойчивость и толерантность к патогенам. Благодаря высоким адаптивным свойствам [8] сорт Солнечная формирует высокие урожаи в некоторый областях Западной Сибири, превышающие таковые у местных стандартных сортов на 8 – 9 ц/га [4], как и в Центральном регионе. Сорт проявил высокую зимостойкость в Алтайском крае, в некоторых районах Новосибирской и Тюменской областей. Проявление сортом Солнечная высокой зимостойкости в Западно-Сибирском регионе подтверждает высокую зимостойкость, которую он проявил в Центральном регионе с менее суровым климатом по сравнению с Западной Сибирью. Высокое продовольственное качество сорта [10] позволяет иметь экологически чистые продукты, в том числе хлеб, который выпекается без вредных химических ингредиентов.

Литература.

1. Эйгес Н.С. Генетическое разнообразие мутантов озимой пшеницы и создание высокоадаптивных форм с комплексами ценных признаков. // Химический мутагенез и проблемы селекции. Москва. Наука. – 1991. – С. 77 – 92.

2. Эйгес Н.С. Создание мутантов и мутантных сортов озимой пшеницы с новыми и редкими комплексами признаков. // Тезисы докладов научной сессии (1 – 3 июля Киров.1998 г.) «Новые методы селекции и создание адаптивных сортов сельскохозяйственных культур: Результаты и перспективы». Киров. Северо-Восточный научно-методический центр РАСХН. – 1998. – С. 92 – 93.

3. Эйгес Н.С. Новые и редкие признаки у озимой пшеницы, возникающие при использовании метода химического мутагенеза. // Материалы Всероссийской научно-производственной конференции «Интродукция нетрадиционных и редких сельскохозяйственных растений» (24 – 28 июня). РАСХН. МСХ Продовольствия РФ. ВНИИССОК. Пензенская ГСХА (Государственная Сельскохозяйственная Академия). Пенза – 1998. – Т. 2. – С. 177 – 179.

4. Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г., Духанин Ю.А., Кузнецова Н.Л., Упелниек В.П., Ханов В.Г. Новый сорт озимой мягкой пшеницы Солнечная, полученный с использованием метода химического мутагенеза И.А. Рапопорта. // Сборник статей. «Инновационные технологии в АПК: теория и практика». Пензенская Государственная сельскохозяйственная. Академия. Пенза. – 2016. – С. 124 – 130.

5. Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г., Кузнецова Н.Л., Упелниек В.П., Александров Е.Н. Трансгрессивное наследование признаков – параметров хлебопекарного качества у константных гибридов, полученных от скрещивания сорта Мироновская 808 с перспективным хемомутантом Б-500. // Материалы міжнародноі наукової конференції. «Селекційно-генетична наука і освіта». Умань. – 2016.– С. 85 – 89.

6. Эйгес Н.С. Роль генотипа озимой мягкой гексаплоидной пшеницы, созданного на основе отдаленной гибридизации, в индуцированном мутагенезе. // Тезисы докладов Международной конференции «Проблемы интродукции растений и отдаленной гибридизации», посвященной памяти Н.В. Цицина. РАН. РАСХН. Совет Ботанических садов России. ГБС. Москва. – 1998. – С. 508 – 510.

7. Рапопорт И.А. // Карбонильные соединения и химический механизм мутаций. Доклады АН СССР Москва. – 1946. – Т. 54, №1. – С. 65 – 68.

8. Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г. Влияние супермутагена этиленимина на возникновение свойств высокой адаптивности у озимой пшеницы. // Innovations and science. On VI International Interdisciplinary Academic Conference. Egypt Hurghada – 2014. – Vol. 3 (2). – P. 57 – 69.

9. Эйгес Н.С., Бекузарова С.А., Манукян И.Р., Волченко Г.А. и др. Улучшение ценных мутантов и сортов озимой пшеницы, созданных методом химического мутагенеза, по селекционно-важным признакам. // Вісніk Українського товариства генетиків і селекціонерів (The Bulletin of the Ukrainian Society for Genetics and Selections). Украина. – 2007. – Т. 5. №1-2. – С. 126 – 132.

10. Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г., Духанин Ю.А. Метод химического мутагенеза в создании сортов озимой мягкой пшеницы. // Сборник статей «Научное обеспечение сельскохозяйственной отрасли в современных условиях». Ульяновский Государственный технический университет (УлГТУ). Ульяновск. – 2016.– С. 458 – 463.

UDK 631.528.1.

CHEMIMUTANT NEW VARIETY OF WINTER SOFT WHEAT FOR THE CENTRAL REGION OF RUSSIA. IT IS DEDICATED TO 70 ANNIVERSARY OF THE DISCOVERY OF CHEMICAL MUTAGENESIS OF I.A. RAPOPORT

[1]Eiges N.S., [1]Volchenko G.A., [2]Volchenko S.G., [3]Dukhanin J.A., *Kuznetsova N.L., *Upelniek V.P., [1]Aleksandrov E.N.

[1]FSBES Institute of Biochemical Physics name of N.M. Emanuel Academy of Sciences. Moscow. Russia 119334. Kosygina 4.
[2]Union of Moscow writers. Moscow. Russia. 121069 Bolshaya Nikitskaya 50a/5, stroenie 1.
[3]FSBE Ministry of Agriculture and Food. Government of Moscow Region. Moscow. Russia. 127994. Sadovo-Ttriumfal'naja 10/13.
**FSBES Main Botanical Garden name of N.V. Tsitsin RAS. Moscow. Russia, 127276. Botanical 4.*
volchenkos@mail.ru

Presents: the origin of the new chemimutant winter wheat variety, characteristic of its properties and signs of the collection, from which it was isolated. Showing high hardiness and high technological properties of the variety.

Key words: chemical mutagenesis, chemomutants, collection of chemimutants, winter wheat, variety, hardiness, mutagen, ethyleneimine.

Chemimutant new winter wheat variety Solnechnaya after 3 – 4-year-olds of State variety tests was included in the State Register of Breeding Achievements Approved for use in the Central region of Russia (Ivanovo region). In the Ivanovo region variety Solnechnaya stable exceeded of yield on local standard varieties. The most significant exceeding was 8,6 centners of hectare, ie 41% compared to the standard. The variety is grown in the some regions of Moscow and Ryazan regions with the perspective of further spread. The variety Solnechnaya is a «peasant» of the extensive collection of chemimutants and constant hybrids. Hybrids were obtained by crossing perspective mutants with varieties, including varieties of non mutant origin. Typical features of the collection – a wide genotypic and phenotypic diversity [1], the presence of new and rare signs of [2, 3], including genetically (theoretically) interesting and selection valuable. Particular attention is given to complexes of valuable signs [4], which are without of a method chemical mutagenesis to get very difficult [5]. Collection of chemimutants was created using of the successful combination of 3 components in accordance with the scheme: mutagen – dose – the initial variety. Initial variety wheat-couch-grass hybrid (PPG) 186 was the most mutable of other tested varieties. Therefore, this variety PPG 186 is used by us in the chemical mutagenesis. Thus the variety was returned from genetic and selection non-existence. These cytogenetic analysis mean that the genome of variety PPG 186 contains of couch-grass genetic material [6], which probably determines its hardiness, which is increased by chemimutations. The high mutability of the variety is also linked to its origin and an increase in the level of heterozygosity. Highly effective mutagen ethyleneimine, has tested repeatedly by I.A. Rapoport [7] on classical genetic object of Drosophila, combined with the most mutagenic effect dose gave a high frequency of mutations and, therefore, of the mutants [1, 2], with most wide diversity of mutational spectrum [1, 2]. From the collection have been isolated breeding valuable samples – the initial material for future varieties. Including promising chemimutant was obtained, which was crossed with other varieties of non-mutant-origin. At the same time there is a high combinative ability of signs. Especially high it was, when chemimutant crossed with a variety Mironovskaya 808. It expressed in the high genotypic and phenotypic diversity in the hybrid offspring that is multiplied on diversity of signs of our collection chemimutants. This also joins transgressive inheritance of signs of both parents [5]. In the presence of multiple mutations [8] and the absence of pleiotropy under the influence of a mutagen are weakening of some correlations between signs (including not desirable), that developed earlier in the process of natural selection and which are genetic barriers to the combination in one form of a number of desirable signs. Here selections play an important role [9], which help to improve chemimutant varieties, such for example as signs that determine the structure of the crop.

Variety Solnechnaya combines in it hard combined signs: a stable yield + stable food quality + high adaptive properties + resistance and tolerance to pathogens. Because of the high adaptive properties [8] variety Solnechnaya forms high yields in some regions of Western Siberia, exceeding those of the local standards on 8 – 9 centners of hectare [4], as well as in the Central region. The variety showed high winter hardiness in the Altai Territory, in some of Novosibirsk and Tyumen regions. Manifestation of variety high winter hardiness in the West Siberian region confirms the high winter hardiness, which it showed in the Central region, where the climate is less severe than in Western Siberia. High food quality of variety [10] allows for ecological-pure products, including the bread and bake it without any harmful chemical ingredients.

References:
1. Eiges N.S. Genetic diversity of winter wheat mutants and the creation of highly adaptive forms with complexes of valuable signs. // Chemical mutagenesis and selection problems. Moscow. The Science. – 1991. – P. 77 – 92.
2. N.S. Eiges Creation of mutants and mutant varieties of winter wheat with new and rare complexes of signs. // Theses of scientific session (1 – 3 July. Kirov. 1998) «New methods of selection and creation of adaptive varieties of crops: results and prospects». Kirov. North-East Scientific and Methodological Center of Agricultural Sciences. – 1998. – P. 92 – 93.
3. Eiges N.S. New and rare signs of winter wheat resulting from the use of chemical mutagenesis method. // Proceedings of the All-Russian scientific-production conference «Introduction of non-traditional and rare agricultural plants». (24 – 28 June). Penza State Agricultural Academy. Penza. – 1998. – Vol. 2. – P. 177 – 179.
4. Eiges N.S., Volchenko G.A., Volchenko S.G., Dukhanin Y.A., Kuznetsova N.L., Upelniek V.P., Khanov V.G. A new variety of winter soft wheat Solnechnaya obtained using the method of chemical mutagenesis of I.A. Rapoport. // Collection of articles. «Innovative technologies in agro-industrial complex: theory and practice». Penza State Agricultural Academy. Penza. – 2016. – P. 124 – 130.
5. Eiges N.S., Volchenko G.A., Volchenko S.G., Kuznetsova N.L., Upelniek V.P., Alexandrov E.N. Transgressive inheritance of signs – baking quality parameters at constant hybrids obtained by crossing variety Mironovskaya 808 with perspective chemimutant B-500. // Materials mizhnarodnoi naukovoi konferentsii. «Селекційно-генетична наука і освіта». Uman. – 2016. – P. 85 – 89.
6. Eiges N.S. Role of genotype of soft winter hexaploid wheat created on the basis of remove hybridization in induced mutagenesis. // Theses of the International Conference «Problems of plant introduction and remove hybridization». Dedicated to the memory of N.V. Tsitsin. Russian Academy of Sciences. RAAS. Russia Council of Botanic Gardens. GBS. Moscow. – 1998. – P. 508 – 510.
7. Rapoport I.A. Carbonyl compounds and chemical mechanism mutations. // Reports of the USSR Academy of Sciences Moscow. – 1946. – Vol. 54, №1. – P. 65 – 68.
8. Eiges N.S., Volchenko G.A., Volchenko S.G. Influence of the supermutagen ethylenimine to occurrence of high adaptive properties on winter wheat. // Innovations and science. On VI International Interdisciplinary Academic Conference. Egypt Hurghada. – 2014. – Vol. 3 (2). – P. 57 – 69.
9. Eiges N.S., Bekuzarova S.A., Manukyan I.R., Volchenko G.A. and others. Improvement of valuable mutants and winter wheat varieties created by chemical mutagenesis, by selection-important signs. // Visnik Ukraïnskogo tovaristva genetikiv i selektsioneriv (The Bulletin of the Ukrainian Society of Genetics and Selections). Ukraine. – 2007. – Vol. 5. №1 – 2. – P. 126 – 132.
10. Eiges N.S., Volchenko G.A., Volchenko S.G., Dukhanin Y.A. The method of chemical mutagenesis in the creation of varieties of winter wheat. // Collection of articles «Scientific provision of the agricultural branch in modern conditions». Ulyanovsk State Technical University. Ulyanovsk. –2016. – P. 458 – 463.

УДК 579.66

УГЛЕВОДНЫЙ СОСТАВ ГИДРОЛИЗАТОВ ДЕПРОТЕИНИЗИРОВНАННОГО ШРОТА ПОДСОЛНЕЧНИКА

Тур А.В., Баурин Д.В., Шакир И.В., Панфилов В.И.

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1.
e-mail: tur.alexandra96@gmail.com

Аннотация
Проведен углеводный анализ кислотного гидролизата депротеинизированного подсолнечного шрота методами ВЭЖХ. Культивирование Saccharomyces cerevisiae на гидролизатах показало возможность получения биомассы обогащённой микробным белком.

Ключевые слова: депротеинизированный шрот подсолнечника, кислотный гидролиз, ВЭЖХ, углеводный состав, биологическая конверсия, переработка отходов растительного сырья,

Растительное сырье, имеющее в своем составе лигниноцеллюлозный комплекс, является перспективным источником моносахаридов для культивирования микроорганизмов. Использование сельскохозяйственных растительных отходов представляет большой экономический интерес в связи с проблемой реализации вторичной растительной биомассы. Биоконверсия лигниноцеллюлозных субстратов требует стадии предварительной обработки для увеличения физической и химической доступности сырья [1]. Депротеинизированный подсолнечный шрот (ДПШ) представляет собой отход производства изолята белка подсолнечника, содержит 38% клетчатки, 22% сырого протеина и 23% целлюлозы [2]. Концентрированные

кислоты эффективно гидролизуют целлюлозу и обладают высокой каталитической активностью при низких температурах, в результате чего концентрация сахаров в гидролизатах в несколько раз выше, чем при гидролизе разбавленными кислотами, так как снижается распад моносахаридов [3]. Кислотный химический гидролиз лигниноцеллюлозного сырья проводится в жестких условиях, что приводит к разложению многих питательных компонентов сырья, а также к образованию антипитательных соединений, которые снижают ростовую активность дрожжей [4,5]. Были изучены различные способы химического извлечения сахаров из стеблей подсолнечника путем гидролиза с соляной [6], серной [7,8] и уксусной кислотами [9]. В нашей работе гидролизаты ДПШ были подвернуты дальнейшей микробиологической конверсии. Продукты, получаемые в процессе кислотного гидролиза целлюлозы при высоких температурах: целлюлоза – олигомеры – глюкоза – продукты окисления и деструкции. Наиболее ценным, с точки зрения производства, продуктом гидролиза гемицеллюлоз является фурфурол, получаемый посредством гидролиза пентозанов до пентоз [10].

Для анализа возможности использования гидролизатов ДПШ для дальнейшей биологической конверсии был проведен химический гидролиз с помощью концентрированной серной кислотой. Гидролиз осуществляли при температуре 115 °С, pH 2,5 в течение 30 мин. Содержание индивидуальных углеводов определяли методом ВЭЖХ (Agilent LC 1220, USA), колонка Zorbax Carbohydrate C18 4.6x150 мм, 5 мкм. Подвижная фаза - смесь растворителей ацетонитрил-вода (75/25), скорость 1,0 мл/мин. Обнаружение веществ проводили при 30 ºС, с помощью рефрактометрического детектора (Agilent RID 1260). Тип углеводов определяли по времени удерживания. Концентрацию углеводов определяли по калибровочным графикам стандартных сахаров глюкозы, фруктозе, маннозе, галактозе (Sigma). ВЭЖХ анализ позволил сделать вывод о наличии в составе кислотного гидролизата фруктозы, маннозы, глюкозы и галактозы в количестве 1,20; 0,87; 0,5 и 0,95 г/л соответственно. Общая концентрация углеводов составила 3,527 г/л. Гидролизаты ДПШ не содержали ксилозу, арабинозу, сахарозу, мальтозу, лактозу.

Полученный гидролизат без отделения твёрдой фазы после нейтрализации использовали как основу питательной среды для культивирования биомассы S.cerevisiae, с добавлением в среду минеральных компонентов (среда Ридера). Аэробное глубинное гетерофазное культивирование проводили при постоянной температуре и значении pH (30 °С, pH 4,8 – 5,0, 400 об./мин.).

Биохимического анализа полученной биомассы показал, что содержание сырого протеина увеличилось до 26%. Общая концентрация углеводов составила менее 0,5 г/л. Потребление РВ составило 89%. Концентрация клеток через 24 часа культивирования увеличилась с 1,3·106 до 1,4·108 кл/мл. Содержание сырого протеина в биомассе увеличилось менее чем на 4%.

Условия предварительной обработки требуют дополнительной оптимизации, а подбор штаммов микроорганизмов для культивирования на гидролизатах позволит увеличить выход сырого протеина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках базовой части государственного задания, проект № 1294.

Литература.

1. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol 2005;96:673–86.
2. Baurin D.V. et al. Integrated processing of sunflower meal // 14th SGEM GeoConference on Nano, Bio And Green–Technologies For A Sustainable Future. 2014. SGEM2014 Conference Proceedings, ISBN 978-619-7105-20-9/ISSN 1314-2704, June 19-25, 2014, Vol. 1. С. 419–426.
3. Шарков В.И. и др. Технология гидролизных производств // М.: Лесн. пром-сть. 1973.
4. Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Pichia stipitis, and Candida shehatae //Enzyme and microbial technology. – 1996. – Т. 19. – №. 3. – С. 220-225.
5. Banerjee N., Bhatnagar R., Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in Saccharomyces cerevisiae //European journal of applied microbiology and biotechnology. – 1981. – Т. 11. – №. 4. – С. 226-228.
6. Bonilla JL, Chica A, Ferrer JL, Jim´enez L, Mart´ın A. Sunflower stalks as a possible fuel source. Fuel 1990;69:792–4.
7. Jim´enez L, Bonilla JL. Acid-hydrolysis of sunflower residue biomass. Process Biochem 1993;28:243–7.
8. Tosun A. Dilute acid hydrolysis of sunflower residue (cellulosic wastes) prior to enzymatic hydrolysis. Fresen Environ Bull 1997;6:296–301.
9. Farid MA, Shaker HM, El-Diwany AI. Effect of peracetic acid, sodium hydroxide and phosphoric acid on cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. Enzyme Microb Technol 1983;13:421–4.
10. Кузнецов Б.Н. Каталитическая химия растительной биомассы // Соровский образовательный журнал. 1996. № 12. С. 47–55.

CARBOHYDRATE ANALYSIS OF DEPROTEINIZIED SUNFLOWER MEAL ACID HYDROLYSATES

Tur A.V., Baurin, D.V., Shakir I.V., Panfilov V.I.

Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, RussiaRussian chemical-technological University named after D.i. Mendeleev, Moscow, Russia
125480, Moscow, St. Geroyev Panfilovtsev, 20, Bldg. 1.
e-mail: tur.alexandra96@gmail.com

This study aims to explore carbohydrate composition of the deproteinized sunflower meal acid hydrolysates by means of the HPLC methods. Saccharomyces cerevisiae fermentation on the hydrolysed products showed the possibility of obtaining the biomass enriched with microbial protein.

Key words: deproteinized sunflower meal, acid hydrolysis, HPLC, carbohydrate composition, biological conversion, processing of plant raw material

Plant raw materials, containing ligninocellulosic complex, is a promising source of monosaccharides for the microorganisms fermentation. Use of agricultural wastes is of great economic interest due to the problem of secondary plant biomass realization. Bioconversion of ligninocellulosic substrates requires a pre-processing phase for increasing physical and chemical availability of raw material [1]. Deproteinized sunflower meal (DSM) is a by-product of protein isolate production, which contains 38% of fiber, 22% of crude protein and 23% of cellulose [2]. Concentrated acids have high catalytic activity at low temperatures and effectively hydrolyse cellulose, resulting in concentration of sugars in hydrolysed products several times higher than during the hydrolysis with diluted acids, because of the monosaccharides breakup decreases [3]. Acid hydrolysis of ligninocellulosic raw materials is heled in harsh conditions, which leads to the degradation of many nutrients, as well as to the formation of antinutrient compounds that reduce the activity of yeasts [4,5]. There were studied the various ways of chemical extracting of sugars from the stalks of sunflowers by hydrolysis with hydrochloric [6], sulphuric [7,8] and acetic acids [9]. In this research hydrolysates of the DSM were used for further microbiological conversion. Products obtained during acid hydrolysis of cellulose at high temperatures: cellulose-disaccharides-glucose-oxidation and degradation products. The most valuable product of hemicellulose hydrolysis is furfural, produced by pentosans hydrolysis to ethanol [10].

To analyse the possibilities of DSM hydrolysates use for further biological conversion was carried out chemical hydrolysis using concentrated sulphuric acid. Hydrolysis of carried out at a temperature of 115° c, pH 2.5 within 30 min. The individual content of carbohydrates was determined by the HPLC method (Agilent LC 1220, USA), column Zorbax Carbohydrate C18 4.6 x 150 mm, 5 μm. Mobile phase - a mixture of solvents acetonitrile-water (75/25), the speed of 1.0 ml/min. Detection of substances carried out at 30° C, using the refractometric detector (Agilent RID 1260). The type of carbohydrates was determined by their retention time. Carbohydrate concentration was determined by calibration graphs using standard sugars glucose, fructose, mannose, galactose (Sigma). HPLC analysis led to the conclusion of presence in hydrolysates such sugars as fructose, mannose, galactose and glucose in an amount of 1.20; 0.87; 0.5 and 0.95 g / L, respectively. The total concentration of carbohydrates was 3.527 g/l. DSM hydrolysates contained no xylose, arabinose, sucrose, maltose, lactose.

Obtained hydrolysates after the neutralization without separation of solid phase has been used as the source of nutrient for the fermentation of S. cerevisiae with additional mineral components (Rider media). Aerobic batch fermentation conducted at a constant temperature and pH (30° c, pH 4.8-5.0, 400 m-1).

Biochemical analysis of the obtained biomass showed that crude protein content increased to 26%. Total carbohydrate concentration was less than 0.5 g/l. Consumption of RS totalled 89%. Cells concentration after 24 hours of fermentation increased from 1.3·106 to 1.4·108 cells/ml. Crude protein content in biomass increased by less than 4%.

Pre-treatment conditions require further optimization and microorganisms strains selection for fermentation on the hydrolysed products will increase the yield of crude protein.

This work was financially supported by the Ministry of education and science of the Russian Federation in the framework of the basic part of the State job, project No. 1294.

References:
1. Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol 2005;96:673–86.
2. Baurin D.V. et al. Integrated processing of sunflower meal//14th SGEM GeoConference on Nano, Bio And Green-Technologies For A Sustainable Future. 2014. SGEM2014 Conference Proceedings, ISBN 978-619-7105-20-9/ISSN

1314-2704, June 19-25, 2014, vol. 1. P. 419-426.
3. Sharkov V.I., etc. Hydrolysis technology productions//m.: Lesne. industry. 1973.
4. Delgenes J. P., Moletta R., Navarro J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Pichia stipitis, and Candida shehatae //Enzyme and microbial technology. – 1996. – T. 19. – №. 3. – C. 220-225.
5. Banerjee N., Bhatnagar R., Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in Saccharomyces cerevisiae //European journal of applied microbiology and biotechnology. – 1981. – T. 11. – №. 4. – C. 226-228.
6. Bonilla JL, Chica A, Ferrer JL, Jim´enez L, Mart´in A. Sunflower stalks as a possible fuel source. Fuel 1990;69:792–4.
7. Jim´enez L, Bonilla JL. Acid-hydrolysis of sunflower residue biomass. Process Biochem 1993;28:243–7.
8. Tosun A. Dilute acid hydrolysis of sunflower residue (cellulosic wastes) prior to enzymatic hydrolysis. Fresen Environ Bull 1997;6:296–301.
9. Farid MA, Shaker HM, El-Diwany AI. Effect of peracetic acid, sodium hydroxide and phosphoric acid on cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. Enzyme Microb Technol 1983;13:421–4.
10. Kuznetsov Boris Catalytic chemistry of plant biomass//Sorovskij educational journal. 1996. No. 12. P. 47-55.

УДК 637.4.04/.07

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЯИЦ ПЕРЕПЕЛОВ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ

Глинкина И.М.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I»
394087, г. Воронеж, ул. Мичурина, 1
e-mail: glinkina@srd.vsau.ru

Проведено исследование показателей качества яиц перепелов трех генотипов: японских, эстонских и гибридных перепелов, полученных в результате скрещивания эстонских самцов с японскими несушками. Дана сравнительная оценка качества продукции данных генотипов.

Ключевые слова: перепелиные яйца, качество яиц, масса яиц, дефекты яиц, японские перепела, эстонские перепела, гибридные перепела, сравнительная оценка.

Перепелиные яйца обладают рядом достоинств. Качество яиц характеризуется пищевыми и товарными признаками. В зависимости от сроков хранения перепелиные яйца подразделяют по классам на диетические и столовые.

Перепела японской и эстонской породы обладают высокой яичной продуктивностью. При скрещивании этих пород были получены гибриды I поколения. В результате проведенных исследований установлено, что у перепелов различных генотипов имеются особенности в гематологических и биохимических показателях крови [1]. Что, в свою очередь, оказывает влияние на количество и качество яичной продукции.

Целью работы явилось исследование количественных и качественных характеристик, а также показателей безопасности яиц, полученных от перепелов различных генотипов.

На первом этапе проводили оценку качества яиц по внешним признакам. Исследовали такие показатели, как индекс формы, пигментация, цвет, состояние скорлупы, наличие дефектов. Учитывали вид обнаруженных дефектов и пороков, степень их выраженности. В зависимости от данных показателей перепелиные яйца относили к пищевым неполноценным или к техническому браку.

Затем рассматривали соотношение составных частей яиц перепелов различных генотипов. Определяли следующие показатели: состояние воздушной камеры, положение желтка, плотность, цвет белка. Проводили морфологический анализ яиц. Исследовали показатели безопасности [2].

Литература.
1. Котарев В.И, Каширина Н.А. Глинкина И.М. Особенности интерьерных показателей перепелов различных генотипов // Актуальные вопросы технологии животноводства, товароведения и ветеринарной медицины. – 2008. – Вып. 6. – С. 15-16
2. Глинкина И.М. Исследование показателей качества перепелиных диетических яиц // Ветеринарно-санитарные аспекты качества и безопасности сельскохозяйственной продукции. – 2015. – С. 189-192

COMPARATIVE ASSESSMENT OF QUALITY INDICATORS OF EGGS QUAIL DIFFERENT EVALUATION

Glinkina I.M.

Federal state budgetary educational institution of higher professional education «Voronezh state agrarian University named after Emperor Peter I»
394087, Michurina str., 1, Voronezh
e-mail: glinkina@srd.vsau.ru

The researchers studied quality indicators of eggs of quails of the three genotypes: Japanese, Estonian and hybrid quails, obtained by crossing the Estonian males with Japanese hens. The researchers conducted a comparative assessment of the quality of products of these genotypes.

Key words: quail eggs, quality of eggs, weight of eggs, eggs defects, japanese quail, estonian quail, hybrid quail, comparative evaluation.

Quail eggs have many advantages. The quality of the eggs is characterized by food and commercial signs. Depending on periods of storage of quail eggs are divided in classes.

Quail Japanese and Estonian breeds have high egg productivity. When crossing these breeds was obtained hybrids of first generation. The results of the research showed that quail of different genotypes are especially in hematological and biochemical blood indicators [1]. That, in turn, affects the quantity and quality of egg products.

The aim of this work was to study the quantitative and qualitative characteristics, and security characteristics of eggs obtained from quails with different genotypes.

In the first stage, carried out the assessment of egg quality by their appearance. Examined indicators such as the index of the shape, pigmentation, color, condition of the shell, the presence of defects. The type of detected defects and vices, the degree of their severity were taken into account. Depending on data indicators of quail eggs was attributed to defective food or to a technical marriage.

Then he considered the ratio of the constituent parts of eggs of quails of different genotypes. Were determined the following indicators: condition of air cell, position of yolk, density, color protein. Morphological analysis of eggs was performed. Safety indicators were studied [2].

References:
1. Kotarev V.I., Kashirina N.A. Features interior performance of quails of different genotypes // Topical issues of animal husbandry technology, commodity science and veterinary medicine. – 2008. – № 6. – P. 15-16
2. Glinkina I.M. The research of quality indicators of quail dietary eggs // Veterinary and sanitary aspects of quality and safety of agricultural products. - 2015. – P. 189-192

.....

УДК 579.64

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ФИТОГОРМОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММОВ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ

Светкина П.В.

ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева»
302040, г. Орел, ул. 8 Марта, д. 25, кв. 88
e-mail: comawhitemm666@yandex.ru

Целью работы являлось получение веществ ауксиновой и цитокининовой природы путём микробного синтеза бактерий Pseudomonas aureofaciens B2883.

Ключевые слова: микробный синтез, фитогормоны, ауксин, цитокинин

В настоящее время в сельскохозяйственной биотехнологии широкое применение находят стимуляторы роста растений, которые используются с целью ускорения процессов проращивания семян, ускорения роста растений в процессе вегетации, укрепления корневой системы, ускорения бутонизации и цветения, повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам.

Существует несколько путей получения стимуляторов роста:

1) получение синтетических стимуляторов путём химического синтеза;
2) получение природных стимуляторов путём выделения из биологических объектов – микробный синтез.

Целью работы являлось получение веществ ауксиновой и цитокининовой природы путём микробного синтеза бактерий Pseudomonas aureofaciens B2883. Осуществлялось культивирование микроорганизмов в биореакторе на жидкой пептонной среде при температуре 28 °С. По литературным данным синтезируемые микробной культурой ауксины и цитокинины, а также другие биологически активные соединения накапливаются в культуральной жидкости, поэтому изучение ее состава являлось важной задачей при разработке технологии порошка, содержащего фитогормоны.

Для идентификации стимуляторов роста был использован экспресс-метод лазерной флуоресцентной спектроскопии с помощью многофункционального комплекса «ЛАКК-М». Возбуждение флуоресценции осуществлялось оптическим излучением УФ (365 нм), синего (450 нм), зеленого (532 нм) и красного (635 нм) диапазонов длин волн. Применение этого метода позволило идентифицировать, используя стандартные растворы, и определить количество ауксина и цитокинина в культуральной жидкости.

Далее из культуральной жидкости выделяли порошок-препарат фитогормонов, для этого культуральная жидкость подвергалась центрифугированию, отделению осадка, высушиванию в ротационном испарителе. Используя метод флуоресцентной спектроскопии, было установлено, что полученный препарат является источником стимуляторов роста.

Применение синтетических стимуляторов роста ограничивается из-за их химического происхождения. Полученный препарат имеет природное происхождение и безопасен для организма человека и может использоваться в сельскохозяйственных и пищевых технологиях.

Литература.
Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. Физиология растений: учебник для студ. вузов. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 640 с.
Белимов А.А., Кожемяков А.П. Смешанные культуры азотфиксирующих бактерий и перспективы их использования в земледелии. // Сельскохозяйственная биология. – 1992. – 5. – С. 77-87.
Vessey J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. // Plant and Soil – 2003. – 255 – С. 571-586.

TECHNOLOGY DEVELOPMENT OF PRODUCING DRUG USING STRAINS PHYTOHORMONES RHIZOSPHERE BACTERIA

Svetkina P. V.

FGBOU VO «OSU named I.S. Turgenev»
302040, Orel, st. March 8, d. 25, kv. 88
e-mail: comawhitemm666@yandex.ru

The aim is to obtain substances auxin and cytokinin nature through microbial synthesis of bacteria Pseudomonas aureofaciens V2883.

Key words: synthesis of microbial, plant hormones, auxin, cytokinin

Currently in agricultural biotechnology are widely used plant growth stimulants, which are used to accelerate the process of seed germination, plant growth acceleration in the process of growing, strengthen the root system, accelerate the budding and flowering, improving the resistance of plants to adverse factors.

There are several ways to obtain growth promoters:

1) providing a synthetic chemical synthesis by stimulants;
2) obtaining a natural stimulant by isolation from biological objects - microbial synthesis.

The aim is to obtain substances auxin and cytokinin nature through microbial synthesis of bacteria Pseudomonas aureofaciens V2883. Cultivation was performed in a bioreactor microorganism peptone liquid medium at a temperature of 28 ° C. According to the literature synthesized microbial culture auxins and cytokinins and other biologically active compounds accumulated in the culture fluid, so studying its composition is an important task in the development of technology powder containing plant hormones.

Rapid method of laser fluorescence spectroscopy was used to identify the growth factors by means of a multifunctional complex «LAK-M.» Fluorescence excitation was carried out by optical radiation of UV (365 nm) blue (450 nm), green (532 nm) and red (635 nm) wavelength ranges. The use of this method permitted identification

using standard solutions, and determine the amount of auxin and cytokinin in the culture medium.

Further, from the culture liquid-powder drug recovered phytohormones, this culture fluid was centrifuged, separating the precipitate dried in a rotary evaporator. Using the method of fluorescence spectroscopy, it was found that the resulting formulation is a source of growth factors.

The use of synthetic growth stimulants is limited due to their chemical origin. The preparation obtained is of natural origin and is safe for the human body and can be used in the agricultural and food technology.

References:
Alekhine N.D., Balnokin J.V., Gavrilenko V.F. Plant physiology: a textbook for students. universities. - M .: Publishing Center «Academy», 2005. - 640 p.
Belimov A.A., Kozhemyakov A.P. Mixed culture of nitrogen-fixing bacteria and the prospects for their use in agriculture. // Agricultural Biology. - 1992 - 5 - P. 77-87.
Vessey J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. // Plant and Soil – 2003. – 255 – P. 571-586.

УДК 576.851.256.095:579.851

ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ НА ОСНОВЕ БИОГАЗОВОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ ПТИЧЬЕГО ПОМЁТА

Ташбаев Ш.А., Пулатова О.М., Алимова Б.Х., Махсумханов А.А.

В результате термофильной метаногенной ферментации птичьего помёта было получено органическое удобрение. Установлено, что применение термофильного режима биогазовой ферментации способствует гибели бактерий, относящихся к семейству Enterobacteriaceae включая роды Shigella и Salmonella, а также других патогенных бактерий. Изучен химический состав полученного органического удобрения.

Ключевые слова: органическое удобрение, термофильная ферментация, биогаз, птичий помёт.

Одной из наиболее важных проблем, требующих скорейшего решения развития агропромышленного комплекса, является повышение плодородия почв и урожайности сельскохозяйственных культур. В настоящее время во многих птицеводческих хозяйств из-за отсутствия эффективных технологий переработки птичьего помёта,его утилизация превратилась в трудно разрешаемую проблему. Возникает необходимость разработки эффективной биотехнологии для его утилизации.

Цель данной работы – получение органического удобрения на основе термофильной метаногенной ферментации из птичьего помёта.

Термофильное сбраживание куриного помёта фермерского хозяйства (КПФХ) проводили при температуре 55 оСв 10 л анаэростатах без добавления инокулята (образец №1), с добавлением 10% инокулята сбалансированной термофильной метаногенной ассоциации микроорганизмов (СТМАМ) (образец №2) и с 10% СТМАМ + 20% навоза крупнорогатого скота (образец №3). Установлено, что на 2-е сутки сбраживания КПФХ отсутствуют бактерии относящиеся к семейству Enterobacteriaceae включая роды Shigella и Salmonella, а также другие патогенные бактерии. В сухой массе органического удобрения количество кальция в образцах №1, №2 и №3 составило 7.72%, 8.09% и 7.17%; фосфор – 3.07%, 3.37% и 2.93%; калий – 2.45%, 2.72% и 2.39%; азот – от 4.8% до 5.0%, соответственно. Кроме этого, изучено содержание гуминовых и фульвокислот, гиббереллинов и ауксинов. Полученное органическое удобрение представляет собой высушенную массу, темно-серого/черного цвета с комковато-пористой структурой.

UDC576.851.256.095:579.851

PREPARATION OF ORGANIC FERTILIZER BASED ON BIOGAS FERMENTATION OF POULTRY DUNG

Tahbaev Sh.A., Pulatova O.M., Alimova B.Kh., Makhsumkhanov A.A.

In result of the thermophilic methanogenic fermentation of poultry dung an organic fertilizer has been prepared. It was established that the use of thermophilic mode of biogas fermentation contributes to the death of bacteria belonging to the family of Enterobasteriaceae including of genera Shigella and Salmonella, and other pathogens. The chemical composition of the prepared organic fertilizer has been studied.

Key words: organic fertilizer, biogas, poultry dung, thermophilic fermentation.

One of the most important problems of requiring speedy solutions of agricultural development is to increase soil fertility and crop yields. Currently, in many poultry farms due to the lack of effective processing technologies for poultry dung disposal, it has become a difficult solving problem. There is a need for development of effective biotechnology for its disposal.

The aim of this work is to prepare the organic fertilizer based on thermophilic methanogenic fermentation of the poultry dung.

Thermophilic fermentation of the farm's poultry dung (FPD) was carried out at temperature of 55 oCin 10 L anaerobic vessels without adding of inoculum (sample №1), supplemented with 10% inoculum of balanced thermophilic methanogenic microorganisms' association (BTMMA) (sample №2) and 10% BTMMA + 20% cattle manure (sample №3).It was found that on 2nd day of FPD's fermentation no bacteria belonging to the family Enterobasteriaceae including the genera Shigella and Salmonella, and other pathogenic bacteria detected.In dry weight of organic fertilizer amount of calcium in samples №1, №2 and №3 was 7.72%, 8.09% and 7.17%; phosphorus - 3.07%, 3.37% and 2.93%; potassium - 2.45%, 2.72% and 2.39%; nitrogen - from 4.8% to 5.0%, respectively. Moreover, the content of humic and fulvic acids, gibberellins and auxins has been studied. The prepared organic fertilizer has a dried mass of dark gray/black color with a crumpled-porous structure.

УДК 636.4.084.1.

ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ КОРОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ ИМ ПРЕПАРАТА Е-СЕЛЕН

Рассолов С.Н.

Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт, Кемерово, Россия
650056, Сибирский Федеральный округ, Кемеровская область, г. Кемерово,
пос. Новостройка, ул. Центральная, 9а
e-mail: biot@ksai.ru

В опыте, проведенном на коровах черно-пестрого скота, показано, что однократное введение препарата Е-селен в условиях дефицитного рациона по селену, положительно сказалось на повышении их воспроизводительных качеств.

Ключевые слова: селен, микроэлемент, корова, воспроизводство, оплодотворяемость, сервис-период.

Нарушения обменных процессов связанные с дефицитом или избытком питательных и биологически активных веществ в рационах животных, имеют тесную этиопатогенетическую связь и наносят значительный экономический ущерб животноводству.

К числу наиболее важных микронутриентов относится селен. Исследованиями различных авторов доказано, что использование препаратов селена в рационах сельскохозяйственных животных позволяет повысить их жизнеспособность, продуктивность и воспроизводительную функцию. Способность малых доз селена ускорять метаболические процессы обусловила широкое его применение как в качестве лечебно-профилактического средства, так и для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных.

В организме животных и человека существует целый класс Se-содержащих Se-зависимых белков и пептидов, которые контролируют уровень перекисных соединений, синтез АТФ, гликогена, нуклеиновых кислот и протеинов, липидный обмен, процессы иммуногенеза, участвуют в патогенетических механизмах развития воспалительных реакциях [1].

Селен – важнейший элемент антиоксидантной защиты организма. Он входит в состав глютатионпероксидазы – фермента, обезвреживающего самые опасные и агрессивные свободные радикалы, именно те, с которыми другие антиоксиданты справиться не в состоянии. Если селена недостаточно, то это звено антиоксидантной защиты просто не работает [2].

Цель настоящей работы – выявить влияние препарата Е-селена на воспроизводительную способность коров.

В соответствии с поставленной целью в работе ставились следующие задачи:

1. Установить влияние препарата Е-селена на продолжительность родового процесса, время отделения последа у коров.

2. Определить влияние препарата Е-селена на продолжительность сервис-периода, периода от отела до 1-й охоты, оплодотворяемости от 1 осеменения.

Экспериментальные исследования проводили в ООО СХО «Заречье» отделении Новостройка Кемеровской области на стельных коровах черно-пестрой породы. Предварительно произвели подбор групп-аналогов, по происхождению, возрасту, живой массе и физиологическому состоянию. С началом основного периода опыта (за 30 дней до отела), условия содержания и кормления для групп были также одинаковые, но животным опытной группы однократно внутримышечно вводили препарат Е-селен согласно схеме опыта (табл. 1).

Таблица 1. Схема научно-хозяйственного опыта

Группа	Количество, голов	Уровень кормления
Контрольная	10	Основной рацион, принятый в хозяйстве (ОР)
Опытная	10	ОР + однократное внутримышечное введение Е-селена за 30 дней до отела в дозе 1 мл на 50 кг массы тела

Е-селен (E-SELENIUM) – препарат в 1 мл инъекционного раствора которого содержится витамина Е 50 мг и 0,5 мг селена в виде селенита натрия. Прозрачная, бесцветная или желтоватая жидкость.

Для изучения воспроизводительной способности, в период отела, проводили хронометражные наблюдения за продолжительностью родового процесса, временем отделения последа, регистрировались случаи послеродовых заболеваний. Воспроизводительные качества коров оценивали по продолжительности сервис-периода, периода от отела до 1-й охоты, оплодотворяемости от 1 осеменения, по выходу телят. Определение селена в кормах используемых в составе рациона проводили вольтамперометрическим методом в лаборатории микропримесей Томского политехнического института.

Все процессы в организме самки, прямо или косвенно связанные с размножением, находятся в теснейшей зависимости от факторов внешней среды и в первую очередь от организации кормления. Особенно неблагоприятно на воспроизводительную функцию коров и телок влияет неполноценное кормление в конце стельности.

Материалы, характеризующие репродуктивные качества коров представлены в таблице 2.

Таблица 2. Репродуктивные качества коров (M ± m)

Показатель	Группа	
	Контрольная	Опытная
Продолжительность родов, час	2,0±5,66	1,6±4,20
Требовалось родовспоможение, гол	2	1
Продолжительность последовой стадии, час	4,07±0,71	3,68±0,65*
Послеродовые осложнения, гол	3	1
Период от отела до 1 -й охоты, дней	58,6±7,89	54,9±6,69
Сервис - период, дней	96,4±9,85	79,2±5,76*
Оплодотворяемость от 1-го осеменения, %	55	65
Межотельный период, дней	380,5±10,5	355,2±11,8*

Наиболее интенсивно отел прошел у животных, получавших препарат Е-селен. Его продолжительность составила 1,6 часа, что на 0,4 часа меньше, чем у первотелок контрольной группы. Животные опытной группы по сравнению со сверстницами контрольной группы, имели и меньшую продолжительность последового периода - на 0,39 часа ($P<0,05$).

У животных подопытных групп были отмечены случаи родовспоможения. Однако у аналогов опытной группы таких случаев было зарегистрировано меньше. Результаты учета и анализа послеродового периода показало, что более ранние сроки наступления половой охоты наблюдались у коров опытной группы. Продолжительность периода от отела до первой охоты у них была на 3,7 дней меньше, чем у животных контрольной группы. Оплодотворяемость от 1-го осеменения составила в контрольной группе 55%, а в

опытной 65%. В результате у коров опытной группы сервис-период оказался на 17,2 дня (P<0,05), а межотельный период на 25,3 дня короче (P<0,05), по сравнению с коровами контрольной группы.

Таким образом, наши данные согласуются с исследованиями ряда авторов [3,4], которые отмечают, что применение препаратов селена в животноводстве позволяет сократить частоту проявления осложнений родового и послеродового периодов и повысить оплодотворяемость после первого осеменения.

Литература.
1. Отаров А.И. Влияние селенсодержащей добавки Сел-Плекс на эффективность откорма и мясную продуктивность бычков красно-степной породы / А.И. Отаров, Ж.Х. Жашуев, Р.М. Отарова // Аграрный вестник Урала. – 2014. – № 8 (126). – С. 30-33.
2. Тутельян В.А. Селен в организме человека: метаболизм, антиоксидантные свойства, роль в канцерогенезе / В.А. Тутельян, В.А. Княжев и др. - М.: Издательство РАМН, 2002. - 224 с.
3. Джакупов И.Т. Влияние Е-селена на воспроизводительную функцию и продуктивность коров / И.Т. Джакубов, В.В. Кабаков // Ветеринария. – 2004. – № 12. – С. 37-39.
4. Гольцман А.А. Влияние селенсодержащих препаратов на воспроизводительные качества коров / А.А. Гольцман, С.С. Александрова // Аграрный вестник Урала. – 2015. – № 3 (133). – С. 18-20.

UDC 636.4.084.1.

EFFECTS OF PREPARATION E-SELENIUM ON CATTLE GROWTH

Rassolov S.N.

Kemerovo state agricultural Institute,
Kemerovo, Russia
650056, Siberian Federal district, Kemerovo oblast, Kemerovo, POS building, Tsentralnaya str., 9a
e-mail: biot@ksai.ru

In experience, called on on cow black-motley live-stock, is shown that one-shot entering the preparation E-selenium in condition of the deficit ration on selenium, positively told on increasing their reproductive quality.

Key words: selenium, trace element, the cow, reproduction, fertility and service period.

Metabolic abnormalities associated with a deficiency or excess of nutrients and biologically active substances in the diets of animals are closely etiopathogenetic relationship and cause significant economic damage to livestock.

Among the most important micronutrients include selenium. Studies by various authors proved that the use of selenium in the diets of farm animals can improve their viability, productivity, and reproductive function. The ability of small doses of selenium to accelerate the metabolic processes led to wide its application as a preventive medical aid and increase of efficiency of agricultural animals.

In the body of animals and humans there is a class of Se-containing Se-dependent proteins and peptides, which control the level of peroxide compounds, synthesis of ATP, glycogen, nucleic acids and proteins, lipid metabolism, immunogenesis processes involved in pathogenetic mechanisms of development of inflammatory reactions [1].

Selenium is an essential element of antioxidant defense. He is part of glutationperoxydasy enzyme, neutralizing the most dangerous and aggressive free radicals, the ones that the other antioxidants to cope not. If selenium is not enough, then this is the link of the antioxidant protection simply does not work [2].

The objective of this study was to identify the effect of the preparation E-selenium on reproductive ability of cows.

In accordance with the intended purpose of the work was put on the following tasks:

1. To establish the effect of the preparation E-selenium on the duration of the generative process, the time of afterbirth in cows.

2. To determine the effect of the preparation E-selenium on duration of service period, the period from calving to the 1st hunting, impregnation capacity from 1 insemination.

Experimental investigations were carried out in LLC corporate farms «District» office building of the Kemerovo region on pregnant cows of black-motley breed. The pre-made selection of the groups-analogues by origin, age, live weight and physiological state. With the beginning of the main period of experiment (30 days before calving), the conditions of keeping and feeding groups was also the same, but the animals of the experimental group intramuscularly injected medication E-selenium according to the scheme experience.

E-selenium (SELENIUM) drug in 1 ml of injection solution which contains vitamin E 50 mg and 0.5 mg selenium in form of sodium Selenite. Transparent, colorless or yellowish liquid.

For the study of reproductive ability, in the period of calving, spend time observing the duration of the generative process, the time separation of the placenta, been reported cases of postpartum diseases. Reproductive qualities of cows was estimated by the duration of the service period, the period from calving to the 1st hunting, impregnation capacity from 1 insemination, the calf crop. Determination of selenium in feeds used in the composition of the diet was carried out voltammetric method in the laboratory of the trace of the Tomsk Polytechnic Institute.

All processes are in the body of females, directly or indirectly associated with reproduction, are closely dependent on environmental factors and primarily on the organization of feeding. Particularly damaging to the reproductive function of cows and heifers is affected by defective feeding in late pregnancy.

Materials describing the reproductive qualities of cows are presented in table 2.

The most intensively calving took place from the animals treated with the preparation E-selenium. Its duration was 1.6 hours, which is 0.4 hours less than heifers in the control group. Animals of the experimental group in comparison to peers in the control group, and had a shorter duration of the sequence of period - by 0.39 hours ($P<0.05$).

The animals of experimental groups there were cases of obstetrics. However, analogues of the experimental group of such cases were registered less. The results of recording and analysis of the postpartum period have shown that earlier onset of sexual inclination was observed in cows of the experimental group. The duration of the period from calving to the first hunt they had 3.7 days less than the control group. The impregnation rate from 1st insemination was in the control group 55% and experienced a 65%. As a result, the cows of the experimental group the service-period was 17.2 days ($P<0.05$), and meately period of 25.3 days shorter ($P<0.05$) compared to cows in the control group.

Thus, our data are consistent with the studies of some authors [3,4], who note that the use of selenium in animal industries allows to reduce the frequency of manifestations of complications and postnatal periods and increase fertility after the first insemination.

References:
1. Otarov A. I. Influence selectarray additives SEL-Plex on the efficiency of fattening and meat productivity of bull calves of red steppe breed / A. I. Otarov, J. H. Gashev, R. M., Otarov // Agrarian Bulletin of the Urals. – 2014. – № 8 (126). – P.30-33.
2. Tutelian V. A. Selenium in human body: metabolism, antioxidant properties, role in carcinogenesis / V. A. Tutelyan, V. Alexei, and others - M.: Publishing house of Russian Academy of medical Sciences, 2002. - 224 p.
3. Dzhakupov I. T., the Influence of E-selenium on reproductive function and productivity of cows / I. T. Yakubov, V. V. Kabakov // veterinary medicine. – 2004. – No. 12. – Pp. 37-39.
4. Holtzman, A. A. Influence of selenium preparations on reproductive qualities of cows / A. A. Holtzman, S. Alexandrov // journal of Agricultural Urals. – 2015. – № 3 (133). – S. 18-20.

УДК 637.075:637.136.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Ульрих Е.В., Архипов А.Н., Пак Н.Г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт», Кемерово, Россия,
650056, ул. Марковцева, 5,
e-mail: elen.ulrich@mail.ru

Показано, что при получении функциональных молочных продуктов питания важную роль играет использование заквасок на чистых культурах микроорганизмов. Установлены режимы сквашивания. При этом значения pH, близкие к изоэлектрической точке белков молока получены через 10-12 часов сквашивания, увеличение среднего диаметра мицелл казеина с 84 нм до 200-250 нм происходит через 8-10 часов.

Ключевые слова: молоко, пастеризация, мицеллы, казеин.

Важным этапом при производстве функциональных молочных продуктов является использование заквасок, приготовленных на чистых культурах микроорганизмов, которое осложняется тем, что молоко представляет собой сложную биологическую систему, в которой растворенные минеральные соли, углеводы, липиды, азотистые вещества и другие компоненты представляют собой дисперсную систему со взвешенными коллоидными и эмульсионными частицами. Помимо них, содержащиеся в молоке микроорганизмы способны в значительной степени снижать качество получаемых концентратов и пермеата.

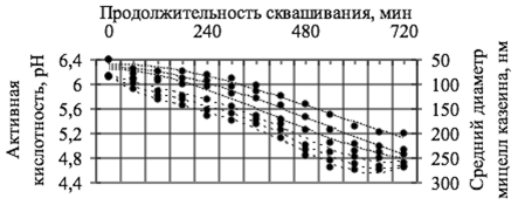
Структура эксперимента по использованию заквасок, приготовленных на чистых культурах микроорганизмов, приведена в табл. 1. Температурные параметры выбраны с учетом существующих рекомендаций, комбинирование заквасок проводили для обеспечения возможности регулировании состава и свойств образующихся белковых сгустков.

Таблица 1. Схема экспериментов по кислотной коагуляции казеина

Серия	Вид закваски	Температура сквашивания, °С
I	Мезофильные молочнокислые стрептококки (*Lactococcus lactis spb. cremoris, Lactococcus lactis spb. lactis, Leuconostoc mesenteroidis spb. cremoris, Lactococcus lactis spb. lactis biovar diacetylactis*)	28±2
II	Термофильные молочнокислые стрептококки и палочки (*Streptococcus termophilus, Lactobacterium delbrueckii spb. bulgaricus*)	43±2
III	Мезофильные молочнокислые стрептококки, термофильные молочнокислые стрептококки и палочки (по серии экспериментов I и II)	33±2

Закваски вносили в молоко в количестве 3-7%, выдерживали при заданной температуре и контролировали значения pH и диаметр мицелл казеина. Полученные результаты приведены на рис. 1.

Рис. 1. Изменение активной кислотности (___) и среднего диаметра мицелл казеина (_ _) в серии экспериментов I с дозой закваски: 1 - 3%; 2 - 5%; 3 - 7%



В серии экспериментов I выявлено, что мезофильные заквасочные культуры не являются интенсивными кислотообразователями: значения pH, близкие к изоэлектрической точке белков молока (4,6-4,8) получены через 10-12 часов сквашивания, увеличение среднего диаметра мицелл казеина с 84 нм до 200-250 нм произошло через 8-10 часов. Тем не менее, использование молочнокислых микроорганизмов рода Lactococcus в производственных условиях будет сдерживаться длительным процессом сквашивания подготовленной для ультрафильтрации смеси.

Литература.
1. Бойнович Л.Б. К теории устойчивости прослоек растворов дипольных молекул в неполярных растворителях. III. Образование адсорбционных монослоев с нормальной к поверхности ориентацией диполей // Коллоидный журнал. - 2004.- №1.- Т. 66.- С. 16-22.
2. Smirnova I.A., Romanovskaya I.V., Shtrigul V.K Method of Obtaining Microparticulated Casein and the Possibility of Its Application in the Production of Nonfat Fermented Milk Products. // Foods and Raw Materials - 2013. - Vol.1 - (No1) -c. 26-33.
3. Bochkarev S, Egorova E. Yu., Reznichenko I. Yu. , Poznyakovskiy V. M. Reasons for the ways of using oilcakes in food industry // Foods and Raw Materials. – 2016. - vol. 4. - no. 1. – c. 4-13.

UDC 637.075:637.136.3

USAGE OF PURE GROWTH OF MICROORGANISMS FOR FUNCTIONAL FOOD PRODUCTION

Ulrih E.V., Arhipov A.N., Pak N.G.

Federal State Budget Educational Institution for Higher Professional Education "Kemerovo state agricultural institute", Kemerovo, Russia
650056, Markovtseva st., 5,
e-mail: elen.ulrich@mail.ru

Abstract: The article shows that the fermentation starter based on pure growth of microorganisms plays an important role in a process of functional dairy products production. The fermentation starter allows obtaining pH value close to the isoelectric point of milk proteins in 10-12 hours of fermentation and increasing of mean diameter of the casein micelles from 84 nm to 200-250 nm in 8-10 hours.

Key words: milk, pasteurization, micelles, casein.

An important step in the process of functional dairy products production is a usage of the fermentation starter based on pure growth of microorganisms, the process is complicated by the fact that the milk is a complex biological system, wherein dissolved mineral salts, carbohydrates, lipids, nitrogenous material and other components present a dispersed system with suspended colloidal and emulsion particles. Moreover, milk contains the microorganisms that can substantially reduce the quality of the concentrates and the permeate.

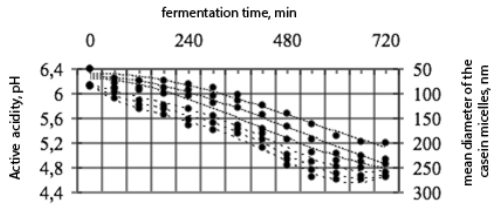
Structure of the experiment of the fermentation starter based on pure growth of microorganisms' usage is shown in Table 1. The temperature parameters were adapted to the existing recommendations, so the fermentation starters were combined performed in order to regulate the composition and properties of the resulting protein clots.

Table 1. Scheme of experiments on the casein acid coagulation

group	Type of fermentation starter	fermentation temperature, °C
I	Mesophilic lactic streptococcus (*Lactococcus lactis spb. cremoris, Lactococcus lactis spb. lactis, Leuconostoc mesenteroidis spb. cremoris, Lactococcus lactis spb. lactis biovar diacetylactis*)	28±2
II	Thermophylic lactic streptococcus and lactobacillus (*Streptococcus termophilus, Lactobacterium delbrueckii spb. bulgaricus*)	43±2
III	Mesophilic lactic streptococcus, thermophylic lactic streptococcus and lactobacillus (as in group I and II)	33±2

Fermentation starters were added to milk in an amount of 7.3%, it was hold at a predetermined temperature and controlled pH values and casein micelle diameter. The results are shown in Fig. 1.

Fig. 1. Dynamic of the active acidity (___) and the mean diameter of the casein micelles (_ _) in I series of experiments with a dose of fermentation starter: 1 - 3%; 2 - 5%; 3 - 7%.



In I series of experiments it was discovered that mesophilic fermentation starters are not intense acidifier: pH value close to the isoelectric point of the milk proteins (4.6-4.8) are obtained in 10-12 hours of fermentation, f the mean diameter of the casein micelles increases from 84 nm to 200-250 nm in 8-10 hours. Nevertheless, the usage of Lactococcus fermentation microorganisms in the production conditions will be restrained by a long process of fermentation of the mixture prepared for ultrafiltration.

References:
4. Boynovich L.B. K teorii ustoychivosti prosloek rastvorov dipolnyih molekul v nepolyarnyih rastvoritelyah. III. Obrazovanie adsorbtsionnyih monosloev s normalnoy k poverhnosti orientatsiey dipoley // Kolloidnyiy zhurnal. - 2004.- №1.- T. 66.- S. 16-22.
5. Smirnova I.A., Romanovskaya I.V., Shtrigul V.K Method of Obtaining Microparticulated Casein and the Possibility of Its Application in the Production of Nonfat Fermented Milk Products. // Foods and Raw Materials - 2013. - Vol.1 - (No1) -c. 26-33.
6. Bochkarev S, Egorova E. Yu., Reznichenko I. Yu. , Poznyakovskiy V. M. Reasons for the ways of using oilcakes in food industry // Foods and Raw Materials. – 2016. - vol. 4. - no. 1. – c. 4-13.

УДК 631.879.3

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ ИЗ КОФЕЙНОГО ЖМЫХА ПУТЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ

Соболева О.М.

Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт, Кемерово, Россия
650056, Кемерово, ул. Марковцева, 5
e-mail: meer@yandex.ru

Разработана технология переработки кофейного жмыха в органическое удобрение путем твердофазного способа ферментации, включающая предобработку сырья с помощью СВЧ. Оптимальная степень деструкции исходного сырья достигается при мощности СВЧ-поля 140 Вт и экспозиции 3 мин.

Ключевые слова: твердофазная ферментация, органическое удобрение, кофейный жмых, ассоциат микромицетов.

Потребление кофе – как натурального, так и растворимого, в России постепенно растет. Авторы исследования [1] прогнозируют для нашей страны в ближайшей перспективе значительный рост потребления кофе в целом. Одним из ключевых моментов развития рынка кофе в нашей стране является увеличивающаяся доля потребления натурального кофе. При этом актуальный вопрос использования натурального кофе – проблема утилизации образующегося кофейного жмыха. Однако состав жмыха не позволяет относить его к категории отходов – скорее, к вторичному сырью, подлежащему дальнейшей переработке и использованию. Следовательно, в свете концепции безотходного производства кофейный жмых может найти потенциально широкое применение в народном хозяйстве нашей страны. Этому будет способствовать и богатый химический состав данного вида сырья: высушенный кофейный жмых содержит около 10% сырого протеина, 21% сырой клетчатки, 44% безазотистых веществ и 8% золы, в составе которой представлено значительное количество макро- и микроэлементов [2]. Из специфических компонентов жмыха следует отметить такие вещества, как танины, кофеин, хлорогеновая и кофеиновая кислоты, антоцианы [3]. За рубежом исследования жмыха, поиски путей его переработки и использования ведутся довольно давно и до сих пор весьма актуальны, в нашей стране работы в данном направлении пока только начинаются.

Литературные данные свидетельствуют о том, что микроволновые технологии применяются для стимуляции процесса экстракции в процессе переработки кофейного шлама [4], образующегося в процессе производства растворимого кофе. Есть сведения, что СВЧ-энергия приводит к увеличению количества и предотвращает окисление танинов [5], которые, находясь в кофейном жмыхе, обеспечивают его антимикробную активность, в том числе, в отношении микромицетов [6]. Однако данных о воздействии сверхвысокочастотной энергии (СВЧ) именно на кофейный жмых обнаружено не было. В связи с вышесказанным была поставлена цель разработать технологию получения органического удобрения из кофейного жмыха путем твердофазного культивирования микромицетов. Для достижения цели поставлен эксперимент, включающий в себя ряд этапов: 1) обработка кофейного жмыха СВЧ-полем при мощности 140 Вт, экспозиции 0 (контроль), 1, 2, 3, 4, 5 мин, 2) засев комбинацией микромицетов, 3) ферментация при температуре 20оС в течение 14 сут., 4) высушивание и гомогенизация полученного материала, 5) выращивание тест-культуры (яровая пшеница) с добавлением и без добавления полученного органического удобрения.

Кофейный жмых получили после варки свежемолотого зернового кофе сорта Арабика, охладили, простерилизовали в автоклаве. Изучались комбинации микромицетов следующих видов: Trichoderma viride, Penicillium chrysogenum, Aspergillus niger в равных вносимых пропорциях инокулята (1:1:1) по массе 1% от массы субстрата. Грибы рода Trichoderma выбраны на основе имеющихся сведений об их высокой ферментативной активности, а также данных, свидетельствующих о прямом стимулирующем действии на рост растения [7]; родов Penicillium и Aspergillus – т.к. являются широко распространенными в природе, имеют мощные ферментативные системы и могут служить источниками естественного засева.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что предобработка сырья СВЧ-энергией увеличивает его биодоступность для ассоциата деструкторов, что выражается в улучшении роста и развития тестовой культуры – повышаются морфометрические (длина и масса ростков и корней в среднем на 28,2%) и витальные (всхожесть в среднем на 16,1%) показатели семидневных проростков яровой пшеницы. Не выявлено визуальной разницы между ростом и развитием мицелия изучаемых микромицетов на контрольном и опытных образцах питательного субстрата – весь его объем был равномерно оплетен гифами и по окончании ферментации представлял собой плотный корж. Это свидетельствует о том, что танины, имеющиеся в жмыхе, не ингибируют развитие подобранного ассоциата.

Литература.
1. Кафтулина Ю.А., Володин В.М. Особенности и перспективы развития российского рынка кофе / Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Общественные науки. – 2016. – №1. – С. 185-195.
2. Elias L.G. Chemical composition of coffee-berry by-products. Coffee pulp: composition, technology and utilization / Int Dev Res Cent Publ. 1979. P. 11-16.
3. Emille R.B.A., Oliveira L.S. Fresh coffee husks as potential sources of Anthocyanins / LWT, 2007. Vol. 40. P. 1555-1560.
4. Терзиев С.Г., Ружицкая Н.В., Макиевская Т.Л.
Использование микроволновых технологий в процессах комплексной переработки кофейного шлама / Харчова наука і технологія. – 2014. – № 3. – С. 85-88.
5. Джаруллаев Д.С., Касьянов Г.И. Влияние СВЧ-энергии на степень выхода качественного сока из яблок / Известия вузов. Пищевая технология. – 2008. – №1. – С. 57-59.
6. Aprilia A.A. Antimicrobial and antioxidant activities of microwave-assisted extracts from coffee ground residue in Chiang Rai Province, Thailand / Bogor agricultural university. 2012. 55 p.
7. Vinale F., Sivasithamparamb K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. Trichoderma – plant-pathogen interactions // F. Vinale / Soil Biology & Biochemistry. 2008. Vol. 40. P. 1-10.

UDC 631.879.3

THE TECHNOLOGY OF PRODUCING ORGANIC FERTILIZER FROM THE COFFEE PULP BY SOLID STATE FERMENTATION

Soboleva O. M.

Federal State Budget Educational Institution for Higher Professional Education "Kemerovo state agricultural institute", Kemerovo, Russia
650056, Markovtseva st., 5,
e-mail: elen.ulrich@mail.ru

Abstract: Developed of processing of coffee pulp into organic fertilizer by solid-phase method of fermentation, including preprocessing of raw materials with the help of MW. The optimal destruction rate of the feedstock is achieved at a power of microwave field is 140 watts and exposure 3 min.

Key words: solid state fermentation, organic fertilizer, coffee pulp, association of micromycetes.

Coffee consumption – both natural and soluble, is gradually growing in Russia. The authors of the study [1] predict for our country in the nearest future a significant increase of coffee consumption as a whole. One of the key moments in the development of the coffee market in our country is the increasing proportion of consumption of natural coffee. In this topical issue of the use of natural coffee – disposal problem of the resulting coffee pulp. However, the composition of the meal does not allow to refer it to the category of waste. Rather, it refers to secondary raw materials subject to further processing and use. Therefore, in the light of the concept of non-waste production of coffee pulp can potentially find wide application in the national economy of our country. This will contribute to the rich chemical composition of this raw material: the dried coffee pulp contains about 10% crude protein, 21% crude fiber, 44% of nitrogen-free substances, and 8% ash, which represented a significant number of macro- and micronutrients [2]. Of specific components of the meal, it should be noted substances such as tannins, caffeine, chlorogenic and caffeic acids, anthocyanins [3]. Abroad studies meal, the ways of its processing and use are quite long and still very relevant in our country work in this direction is just beginning.

Literature data indicate that microwave technology is used to stimulate the extraction process in the processing of coffee sludge [4], resulting in the production process of instant coffee. There is evidence that the microwave energy leads to an increase in the number and prevents the oxidation of tannins [5], who, being in the coffee pulp, provide antimicrobial activity, including against micromycetes [6]. However, data on the effects of microwave energy (microwave) coffee pulp was not detected. In connection with the foregoing, the goal was to develop technology for producing organic fertilizer from the coffee pulp by solid state cultivation of micromycetes. To achieve the goals of the experiment, which includes a number of stages: 1) preparation of the coffee pulp microwave field at a power of 140 W, the exposure 0 (control), 1, 2, 3, 4, 5 min, 2) seeding the combination of micromycetes, 3) fermentation at a temperature of 20oC for 14 days., 4) drying and homogenization of the material obtained, 5) production of test crops (spring wheat) with and without addition of the received organic fertilizer.

Coffee pulp obtained after brewing of freshly ground coffee beans Arabica beans have cooled, sterilized in an autoclave. Studied combinations of micromycetes of the following types: Trichoderma viride, Penicillium

chrysogenum, Aspergillus niger contributed equally to the inoculum (1:1:1) by weight 1% by weight of the substrate. Fungi of the genus Trichoderma selected on the basis of available information about their high enzymatic activity, as well as evidence of a direct stimulatory effect on plant growth [7]; the genera Penicillium and Aspergillus, because are widespread in nature, have a powerful enzymatic system and can serve as sources of natural seeding.

The results obtained indicate that pretreatment of raw materials of microwave energy increases its bioavailability to the associate decomposers, resulting in improving the growth and development of the test culture, the rise of the morphometric (length and weight of sprouts and roots on average by 28.2%) and vital (viable for the average 16.1%) indicators of the seven-day spring wheat seedlings. Revealed no visual difference between the growth and development of mycelium of the investigated micromycetes in the control and experimental samples of a nutrient substrate – the entire volume was evenly braided hyphae and at the end of fermentation was a dense pulp. This suggests that the tannins present in the meal, does not inhibit the development of selected associates.

References:
Cartulina Y. A., Volodin V. M. Peculiarities and prospects of development of Russian market of coffee / news of higher educational institutions. Povolzhskiy region. Social Sciences. – 2016. – No. 1. – S. 185-195.
Elias L.G. Chemical composition of coffee-berry by-products. Coffee pulp: composition, technology and utilization / Int Dev Res Cent Publ. 1979. P. 11-16.
Emille R.B.A., Oliveira L.S. Fresh coffee husks as potential sources of Anthocyanins / LWT, 2007. Vol. 40. P. 1555-1560.
Terziev S. G., Różycki N. In. T. L. Makievskaya The use of microwave technologies in the processes of complex processing of coffee sludge / Harchova science and technology. – 2014. – No. 3. – P. 85-88.
jaroullaev D. S., Kasyanov G. I. the Influence of microwave energy on the degree of output quality juice from apples / Izvestiya vuzov. Food technology. – 2008. – No. 1. – P. 57-59.
Aprilia A.A. Antimicrobial and antioxidant activities of microwave-assisted extracts from coffee ground residue in Chiang Rai Province, Thailand / Bogor agricultural university. 2012. 55 p.
Vinale F., Sivasithamparamb K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. Trichoderma – plant-pathogen interactions // F. Vinale / Soil Biology & Biochemistry. 2008. Vol. 40. P. 1-10.

УДК 579.64 + 57.063.7

СИМБИОТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И АКТИВНОСТЬ ГРИБОВ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ ПРИ РАЗНЫХ УРОВНЯХ ФОСФОРА В ПОЧВЕ

Юрков А.П.[1,2,3], Якоби Л.М.[1,2], Степанова Г.В.[4], Крюков А.А.[1], Шишова М.Ф.[2]

[1]Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Россия
196608, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д.3;
[2]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия
199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9;
[3]Российский государственный гидрометеорологический университет, Россия
195196, г. Санкт-Петербург, Малоохтинский пр., д. 98;
[4]Всеросссийский научно-исследовательский институт кормов им. В.Р. Вильямса, Россия
141055, Московская область, Научный городок, г. Лобня, корпус 1
e-mail: yurkovandrey@yandex.ru

В статье проведено сравнение роста грибов арбускулярной микоризы и их симбиотической эффективности при различных уровнях фосфора в почве в вегетационных условиях. Проведен корреляционный анализ взаимосвязей между параметрами симбиотической эффективности и параметрами микоризации в вегетационных опытах, а также между эффективностью и уровнем плодородия почв в полевых экспериментах географической сети опытов ВНИИСХМ.

Ключевые слова: симбиотическая эффективность, арбускулярная микориза, биопрепарат, Rhizophagus irregularis, идентификация

Арбускулярная микориза является самым распространенным симбиозом, формируемым высшими растениями с грибами отдела Glomeromycota [1]. АМ-грибы способствуют усилению минерального (особенно фосфорного) питания растений, защите их от патогенов и ускорению развития [1-2]. Применение инокулятов АМ-грибов в сельском хозяйстве в качестве биопрепаратов-усилителей роста растений имеет

широкие перспективы [3]. Целью настоящего исследования была оценка условий формирования эффективного симбиоза между высшими растениями и грибами АМ.

Проведено исследование симбиотической эффективности и активности развития 10 штаммов грибов арбускулярной микоризы на сильно микотрофной линии люцерны хмелевидной при двух уровнях доступного фосфора (P) в почве. По результатам исследования выделены 5 эффективных штаммов родов Rhizophagus и Glomus и 5 неэффективных штаммов родов Glomus и Funneliformis. Отмечено, что симбиотическая эффективность первых по сухому весу надземных частей существенно (в среднем на 69,9%) выше на почве с низким уровнем P, чем на почве с добавлением P-удобрения, а неэффективные штаммы обладали более сильным откликом (в среднем на 60,7%) на почве с добавлением P. Корреляционные взаимосвязи симбиотической эффективности с индексами микоризации положительны и более существенны в эксперименте на почве с низким уровнем P.

Впервые проведен корреляционный анализ результатов многолетних экспериментов, проводимых в рамках географической сети опытов с землеудобрительными биопрепаратами ВНИИСХМ. Инокулят АМ-гриба (штамм RCAM00320, идентифицированный как Rhizophagus irregularis) был эффективным на кормовых культурах различных семейств в силу неспецифичности взаимодействия с растениями. Средняя эффективность АМ-инокулята варьировала по урожайности семян в диапазоне +5,8…+47,2%. Результаты анализа корреляционных взаимосвязей между показателями эффективности, урожая с агрохимическими показателями почвы показали, что характерно наличие отрицательной корреляции между симбиотической эффективностью биопрепарата и содержанием доступного калия в почве (r = -0,58), фосфора (r = -0,53), уровнем pH (r = -0,40). Эти данные согласуются с гипотезой о ключевой роли АМ в фосфорном питании растений, и свидетельствуют о том, что разрабатываемый прототип микоризного препарата будет иметь существенную эффективность на почвах с низким уровнем доступного для питания растений фосфора. По результатам исследования авторы рекомендуют применение АМ-инокулята для ячменя обыкновенного (Hordeum vulgare), ржи посевной озимой (Secale cereale), овсяницы красной (Festuca rubra), пшеницы мягкой яровой (Triticum aestivum) и люцерны изменчивой (Medicago x varia).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ-офи-м №15-29-02753 и гранта Президента РФ НШ-6759.2016.4.

Литература.
4. Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. 3rd Edn. Academic Press, New York, 2008.
5. Smith S.E., Smith F.A., Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. // Plant Physiology. - 2003. - V. 133. - P. 16-20.
6. Bauma C., El-Tohamy W., Gruda N. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. // Scientia Horticulturae. - 2015. - V. 187. - P. 131-141.

SYMBIOTIC EFFICIENCY AND ACTIVITY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI UNDER CONDITION OF DIFFERENT PHOSPHORUS LEVEL IN SOIL

Yurkov A.P.[1,2,3], Jacobi L.M.[1,2], Stepanova G.V.[4], Shishova M.F.[2]

[1]All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Russia
196608, Saint-Petersburg, Pushkin, Podbelsky shausse, 3;
[2]Saint Petersburg State University, Russia
199034, Saint-Petersburg, Universitetskaya embankment, 7-9;
[3]Russian State Hydrometeorological University, Russia
195196, Saint-Petersburg, Maloochtinsky prospect, 98;
[4]All-Russia Williams Fodder Research Institute, Russia
141055, Moscow region, Lobnya, 1 corps
e-mail: yurkovandrey@yandex.ru

The comparison of arbuscular mycorrhizal fungi growth and their symbiotic efficiency under different phosphorus level in the soil was provided. The correlation analyses of the relationships between symbiotic efficiency and parameters of mycorrhization in pot tests, as well as between efficiency and level of soil fertility in the field experiments in ARRIAM geographical experiment net were performed.

Key words: symbiotic efficiency, arbuscular mycorrhiza, biopreparation, Rhizophagus irregularis, identification

Arbuscular mycorrhiza is the most widespread symbiosis formed by higher plants with Glomeromycota fungi [1]. AM fungi application guarantees increased mineral (especially phosphorus) plant nutrition, protection against pathogens and fine plant development [1-2]. AM fungi inoculant usage as biopreparations promoting of plant growth has wide perspectives in current agriculture [3]. The aim of this study was to assess the conditions for formation of effective symbiosis between higher plants and AM fungi.

The study of symbiotic efficiency and development activity for ten strains of arbuscular mycorrhizal fungi in highly mycotrophic lines of black medic under conditions of two available phosphorus (P) levels in the soil was carried out. As a result of the study we identified 5 effective Rhizophagus and Glomus strains, and 5 ineffective Glomus and Funneliformis strains. Noted that symbiotic efficiency of top five strains for dry above-ground mass was significantly (on average about 70%) higher under low P level in the soil than under conditions of P fertilizer application, but next five ineffective strains had a strong response (on average about 61%) under conditions of P fertilizer application than otherwise there. Correlations of symbiotic efficiency with mycorrhization indices were positive and more significant in the experiment under low P level in the soil.

For the first time the correlation analysis was carried out for the results of long-term experiments which conducted in the framework of geographical experiment net of All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology. AM fungal inoculum (RCAM00320 strain, identified as R. irregularis) was effective for forage crops from different families because of lack of specificity in interactions with plants. AM inoculum average efficiency in seed mass varied in the range of +5,8..+47,2%. The results of the correlation analysis for symbiotic efficiency parameters and harvest with agrochemical parameters of soil showed negative correlations between symbiotic efficiency of biopreparation and content of available potassium in the soil (r = -0,58), phosphorus (r = -0,53), pH (r = -0,40). Obtained data were consistent with the hypothesis about key role of AM in phosphate plant nutrition and indicate that the developed mycorrhizal biopreparation prototype will have significant efficiency under condition of lower level of phosphorus available for plants. According to study results, authors recommend AM inoculum application primarily for barley (Hordeum vulgare), winter rye (Secale cereale), red fescue (Festuca rubra), spring common wheat (Triticum aestivum) and alfalfa (Medicago x varia). The work was supported by grants of RFBR (15-29-02753) and the President of the Russian Federation (НШ-6759.2016.4).

References:
4. Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. 3rd Edn. Academic Press, New York, 2008.
5. Smith S.E., Smith F.A., Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. // Plant Physiology. - 2003. - V. 133. - P. 16-20.
6. Bauma C., El-Tohamy W., Gruda N. Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. // Scientia Horticulturae. - 2015. - V. 187. - P. 131-141.

УДК 575:577.21. 636.08.212

ОЦЕНКА СЕМЯН СОРТОВ СОИ НА СОДЕРЖАНИЕ В НИХ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ТРАНСФОРМАЦИЙ

Павловская Н.Е., Горькова И.В., Гагарина И.Н., Гнеушева И.А., Солохина И.Ю., Яковлева И.В.

Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина, Орёл, Россия
302019, Орел, ул. Генерала Родина, д.69
e-mail: obc1-2010@mail.ru

Предложена методика оценки семян сортов сельскохозяйственных культур (сои, кукурузы) на содержание в них генно-инженерных трансформаций по гемагглютинирующей активности лектинов. Показано, что в семенах ГМО-сои и ГМО-кукурузы, содержание гликопротеинов выше, чем в семенах не генно-модифицированных. Разработан алгоритм оценки семян данным методом.

Ключевые слова: генно-инженерные трансформации, лектины, семена, ГМО

Увеличение использования генно-инженерных трансформаций в сельском хозяйстве для получения продукции с новыми свойствами делает всё более актуальным вопрос разработки эффективных методов идентификации трансгенной ДНК, в частности для определения в семенах сельскохозяйственных культур [1].

Существует несколько методических подходов при определении ГМО. Это экспресс-анализ на наличие

ГМО с помощью тест-полосок, ПЦР-анализ (классическая ПЦР) и ПЦР в режиме реального времени для определения количественного содержания ГМО в сельскохозяйственном сырье [2, 3].

Метод ПЦР, имеющий несколько модификаций, является в настоящее время наиболее распространенным, т.к. модифицированная ДНК синтезируется во всех частях ГМО. Однако и в данном случае ДНК трудно определить в семенах сельскохозяйственных растений, так как протравитель, которым обработаны ГМО-семена, ингибирует полимеразную цепную реакцию. Данный факт ограничивает возможности этого метода при использовании семенного материала, так как нет возможности полно «смыть» протравитель. Что и противоречит правилам забора проб.

Предложена методика оценки семян сортов сельскохозяйственных культур (сои, кукурузы) на содержание в них генно-инженерных трансформаций по гемагглютинирующей активности лектинов. Показано, что в семенах ГМО-сои и ГМО-кукурузы, содержание гликопротеинов выше, чем в семенах не генно-модифицированных. Разработан алгоритм оценки семян данным методом.

Работа выполнена в ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина» по заказу Минсельхоза по теме: «Разработка методики оценки семян сортов на содержание в них генно-инженерных трансформаций» в 2016 г.

Литература.
1. Тромбицкий, И.И. Генетически модифицированные организмы и обеспечение биологической безопасности / И.Игнатьев, И. Тромбицкий. – Бендеры: Экоспектр, 2007.
2. Рамазанова С.А. Идентификация сортов сои с использованием молекулярно-генетических методов: Автореф. дис. .. канд. биолог. наук 06.01.05 / Рамазанова Светлана Алексеевна; ФГОУ ВПО «Кубанский государственный аграрный университет». - 2008. - 26 с
3. Farid E. Ahmed, PhD Editor Testing of genetically modified organisms in foods //Food Products Press, an imprint of The Haworth Press. – 2004. - P.163-165.

UDC 575:577.21. 636.08.212

EVALUATION OF SEEDS OF SOYBEAN VARIETIES ON THE CONTENT OF GENETIC ENGINEERING TRANSFORMATIONS

Pavlovskaya N. E., Gorkova I.V., Gagarina I.N., Gneusheva I.A., Solokhina I.Yu., Yakovleva I.V.

Orel State Agrarian University named after N.V. Parahina, Orel, Russia
302019, Orel, Generala Rodina, 69 D.
E-mail: obc1-2010@mail.ru

The proposed method of assessing seed crops (soy, corn) to the contents of genetically engineered transformations of them hemagglutinine activity of lectins. It is shown that in the seeds of GMO soybeans and GMO corn, the content of the glycoproteins is higher than in the seeds are not genetically modified. The algorithm for the evaluation of seed by this method.

Key words: genetic engineering transformation, lectins, seeds, GMOs

The increase in genetic engineering the use of transformations in agriculture to produce products with new properties makes more urgent the question of the development of effective methods for the identification of transgenic DNA, in particular for the determination in the seeds of agricultural crops [1].

There are several methodological approaches for the identification of GMO. This rapid analysis for the presence of GMOs with the help of test strips, PCR-analysis (classical PCR) and PCR in real time to quantify the GMO content in agricultural raw materials [2, 3].

PCR method with a few modifications, is currently the most common, because the modified DNA is synthesized in all parts of the GMOs. However, in this case DNA is difficult to determine in the seeds of agricultural plants, as a disinfectant, which processed GMO seeds, inhibits the polymerase chain reaction. This fact restricts the possibilities of this method when using a seed as possible completely there is no «flush» the protectant. And contrary to the rules of sampling.

The proposed method of assessing seed crops (soy, corn) to the contents of genetically engineered transformations of them hemagglutinine activity of lectins. It is shown that in the seeds of GMO soybeans and GMO corn, the content of the glycoproteins is higher than in the seeds are not genetically modified. The algorithm for the evaluation of seed by this method.

Work is performed in the shared research center «Orel regional centre of agricultural biotechnology» by order of the Ministry of agriculture on the topic: «Development of methods for the assessment of seed varieties for their content of genetic engineering transformation» in 2016

References:
1. The Trombitsky, I. Genetically modified organisms and biological safety / I. Ignatiev, I. Trombitsky. Bender : Ekospektr 2007,.
2. Ramazanov S. A. Molecular genetic Identification of soybean varieties using methods: abstract. dis. kand. biologist. Sciences 06.01.05 / Ramazanova Svetlana Alekseevna; FGOU VPO «Kuban state agrarian University». - 2008. - 26
3. E. F. Ahmed, candidate of technical Sciences, editor testing of genetically modified organisms in food products //Food products Press, an imprint of the Haworth press. – 2004. - P. 163-165.

УДК 621.039.75

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ТРАНСФОРМАЦИЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Павловская Н.Е., Солохина И.Ю., Гнеушева И.А., Лушников А.В., Костромичева Е.В., Агеева Н.Ю.

Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина, Орёл, Россия
302019, Орел, ул. Генерала Родина, д.69
e-mail: obc1-2010@mail.ru

В рамках исследования влияния генно-инженерных трансформаций сельскохозяйственных культур на активность ацетилхолинэстеразы, провели серию постановок, показавших изменения активности фермента в образцах ГМО-сои. Рекомендовано использовать этот анализ в качестве биохимического рутинного метода предварительной верификации сельскохозяйственных культур на наличие генно-инженерных трансформаций.

Ключевые слова: генно-инженерные трансформации, ацетилхолинэстераза, семена, сельскохозяйственные культуры

Холинэстеразы – семейство ферментов, относящееся к классу гидролаз, которые катализируют гидролиз эфиров холина и играет ключевую роль в метаболизме ацетилхолина.

Исследования по определению активности ацетилхолинэстеразы в проростках и корнях сои с генно-инженерными трансформациями на ранних этапах вегетации (до 3-х суток) актуальны, поскольку изменение концентрации этерифицированного холина пропорционально изменению активности ацетилхолинэстеразы.

Способностью к холинэстеразной активности обладают листья, корни, семена и цветки растений, а так же данная активность свойственна на стадии дифференцировки основных частей растения.

У представителей семейства бобовых особенно часто обнаруживается холинэстеразная активность. Среди бобовых особый интерес представляет соя – самая распространенная зернобобовая и белково-масличная культура. На сегодняшний день соя является одной из сельскохозяйственных культур, над которой производятся генетические изменения.

В рамках исследования влияния генно-инженерных трансформаций сельскохозяйственных культур на активность ацетилхолинэстеразы, провели серию постановок, показавших изменения активности фермента в образцах ГМО-сои. Рекомендовано использовать этот анализ в качестве биохимического рутинного метода предварительной верификации сельскохозяйственных культур на наличие генно-инженерных трансформаций.

Исследования проводились в ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет» в рамках темы по заказу Министерства сельского хозяйства РФ «Исследование влияния генно-инженерных трансформаций сельскохозяйственных культур на изменения обмена белков, активность антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных компонентоврастений и контроль безопасности сельскохозяйственной продукции на белых лабораторных мышах».

Литература.
1. Еременко А.В., Прокопкина Т.А., Касаткин В.Э., Осипова Т.А., Курочкин И.Н. Планарные тиол-чувствительные сенсорные элементы для определения активности бутирилхолинэстеразы и анализа ее ингибиторов// Вестник

Московского университета. – Сер. 2. – Химия. – 2014. – Т.55. - №3. – С. 174-175.
2. Рощина В.В. «Нейротрансмиттеры – биомедиаторы и регуляторы растений» Учебное пособие. - Пущино: Институт биофизики клетки РАН, 2010.

UDC 621.039.75

STUDY OF THE IMPACT OF GENETICALLY ENGINEERED CROPS TRANSFORMATIONS ON ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY

Pavlovskaya N. E. Solokhina I. Yu., Gneusheva I. A., Lushnikov, A. V., Kostromichova E.V., Ageeva N. Yu.

Orel state agrarian University named after N. V. Parahina, Orel, Russia
302019, Orel, Generala Rodina, 69 D.
e-mail: obc1-2010@mail.ru

The study of the impact of genetically engineered crops transformations on the activity of acetylcholinesterase, held a series of performances showing the change of enzyme activity in samples of GMO soybeans. It is recommended to use this analysis as a biochemical routine pretreatment verification of agricultural crops for the presence of genetically engineered transformations.

Key words: genetic engineering transformation, acetylcholinesterase, seeds, crops

Cholinesterase is a family of enzymes belonging to the class of hydrolases, which catalyze hydrolysis of esters of choline and plays a key role in the metabolism of acetylcholine.

Studies on determination of acetylcholinesterase activity in seedlings and roots of soybean genetically engineered transformations in the early stages of vegetation (up to 3 days) to date, since the change in the concentration of esterified choline is proportional to the change in the activity of acetylcholinesterase.

Ability to cholinesterase activity possess leaves, roots, seeds, and flowers of plants, and this activity is characteristic for the stage of differentiation of the basic parts of a plant.

The representatives of the legume family especially often found cholinesterase activity. Among legumes of particular interest is the soy – bean is the most common and protein-oil crops. Today, soya is one of the crops which are produced by genetic changes.

The study of the impact of genetically engineered crops transformations on the activity of acetylcholinesterase, held a series of performances showing the change of enzyme activity in samples of GMO soybeans. It is recommended to use this analysis as a biochemical routine pretreatment verification of agricultural crops for the presence of genetically engineered transformations.

The studies were conducted in the CSC «Orel regional centre of agricultural biotechnology» of the «Orel state agrarian University» under the theme for the Ministry of agriculture of the Russian Federation «study of the impact of genetically engineered transformations of agricultural crops to changes in the metabolism of proteins, activity of antioxidant enzymes and low-molecular componentlistener and safety control of farm products in the white laboratory mice».

References:
1. Eremenko A.V., Prokopchina T. A., Kasatkin E. V., Osipova T. A., Kurochkin I. N. Planar thiol-sensitive sensor elements for determining the activity of butyrylcholinesterase and its inhibitors analysis// Bulletin of Moscow University. – Ser. 2. Chemistry. – 2014. – T. 55. - No. 3. – S. 174-175.
2. Roshchina, V. V., «The Neurotransmitters – biomedicare and regulators of plants» tutorial. - Pushchino: Institute of cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, 2010.

УДК 632.938.2

БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Горькова И.В., Костромичева Е.В., Бородин Д.Б.

ФГБОУ ВО Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина, Орел, Россия, 302019, ул. Генерала Родина 69.
e-mail: ninel.pavlovsckaya@yandex.ru

Получены биологические средства защиты растений на основе лектинов и ингибиторов протеиназ. Показано, увеличение урожайности гороха и гречихи, снижение заболеваемости и повреждения вредителями при предпосевной обработке семян средствами на основе лектинов и ингибиторов протеиназ.

Ключевые слова: средства защиты растений, биотехнология, лектины, ингибиторы.

В условиях повышения уровня неблагоприятных экологических стресс-факторов, особенно в условиях действия экстремальных климатических и техногенных нагрузок. Одним, из наиболее эффективных подходов корректировки различных нарушений является использование природных компонентов[1].

Важным этапом создания новых препаратов является выделение активных веществ и их испытание на биологическую активность. Нами разработаны и адаптированы технологии выделения физиологически активных компонентов из бобовых культур, в частности лектины и ингибиторы протеиназ. Выход лектинов составляет 32 мг/100г, ингибиторов протеиназ 18 мг/100 г.

Лектины и ингибиторы протеиназбобовых проявляют биологическую активность и индуцируют иммунитет гороха и гречихи, основанный на активизации ферментов антиоксидантной системы. Полевые испытания показали увеличение урожайности гороха и гречихи на 17% и снижение заболеваемости и повреждения вредителями на 15-19%.Лектины сои проявляют биологическую активность и биопестицидные свойства в отношении возбудителя мучнистой росы пшеницы, а также улучшают ростовые показатели проростков пшеницы.

Оптимальной дозой применения лектинов является концентрация 10-7% (Патент РФ №237276).

Литература.
1.Сытников Д.М., Коць С.Я. Участие лектинов в физиологических процессах растений//Физиология и биохимия культ. Растений.-2009.-Т. 41.- № 4.-с.279-296.

UDC 632.938.2

BIOTECHNOLOGY OF PLANT PROTECTION PRODUCTS ON NATURAL INGREDIENTS

Pavlovskaya N.E., Gagarina, I.N., Gorkova, I.V., Kostromichova E.V., Borodin D.B.

FGBOU VO Orel state agrarian university name N.V. Parahina Orel, Russia
302019, st. General Rodina 69
e-mail: i-gagarina@list.ru

Derived biological plant protection agents based on lectin and protease inhibitors.It demonstrated an increase in the yield of peas and buckwheat and decrease the incidence of pests and damage during preplant seed treatment agents based on lectins and protease inhibitors.

Key words: plant protection products, biotechnology, lectins, inhibitors.

In the context of increasing levels of adverse environmental stressors, especially in conditions of extreme climatic and anthropogenic loads, one of the most effective approaches correction of various disorders is the use of natural ingredients [1].

An important step in the creation of biological products is a complete release of the active substances and the test for biological activity. We have developed and adapted technologies isolation of biologically active components of legume lectins and in particular proteinase inhibitors based techniques KosenkoMelnikova and with modifications. Lectins Yield is 32 mg / 100g, protease inhibitors 18 mg / 100 g

Proteinase inhibitors, lectins and legumes exhibit biological activity and induce immunity peas and buckwheat, as shown in the activity of antioxidant enzymes. Field tests have shown an increase in the yield of peas and buckwheat by 17% and reduced the incidence of pests and damage 15-19%. Soybean lectins show biological activity and properties of the biopesticidal against the pathogen of powdery mildew of wheat, and improve growth poazateli wheat seedlings.The optimal dose of application is the concentration of 10-7%. (Patent RF №237276).

References:
1. Sytnikov DM, Kots SY Participate in physiological processes lectins // Plant physiology and biochemistry of the cult. Rasteniy.- 2009.- T. 41.- № 4.- s.279-296

УДК 632.938.2

ВЫДЕЛЕНИЕ ФАКТОРОВ ВЫЗЫВАЮЩИХ АПОПТОЗ ИЗ РАСТЕНИЙ

Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Горькова И.В., Костромичева Е.В., Нагур М.Ю.

Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина, Орёл, Россия
302019, Орел, ул. Генерала Родина, д.69
e-mail: ninel.pavlovsckaya@yandex.ru

Получены сравнительны данные выделения факторов вызывающих апоптоз из растительных объектов. Показано, что самый высокий выход сухого вещества из растительных объектов отмечен при экстракции водой.
Ключевые слова: апоптоз, монстера, колеоптили, антиоксидантная система

На сегодняшний день выявлен ряд веществ, способных активировать или замедлять развитие апоптоза. Растения имеют специфические индукторы апоптоза - этилен, цитокинины, ауксины, гиббереллины, жасмонат, салицилат, элиситоры, CN-вещества и т. д.[1].

Для подготовки вытяжек предполагаемых индукторов апоптоза использовали колеоптили этиолированных проростков пшеницы и ячменя на 4- 5 сутки проращивания и молодые листья монстеры (Monstera deliciosa L.).

С целью выделения из растительных объектов и выявления природы факторов, вызывающих апоптоз, были использованы неорганические (вода, 0,1н NaCl, щелочь) и органический (этиловый спирт) растворители.

Из полученных данных следует, что самый высокий выход сухого вещества отмечен при экстракции водой листа монстеры составляет 12 мг, колеоптиля пшеницы 13,1 мг, колеоптиля ячменя 14,2 мг.

Результаты испытаний активности антиоксидантных ферментов полученные на проростках пшеницы и ячменя, показали, что динамика изменения активности по всем вариантам обработки сохраняет одинаковую тенденцию: активность повышается до 5-х суток и падает к 10-м суткам проращивания, следовательно, индуктор апоптоза, выделенный из разных растительных объектов, во-первых, водорастворимый, во-вторых, идентичный у монстеры, ячменя и пшеницы, в-третьих вызывает одинаковые изменения в активности трех высокомолекулярных антиоксидантов.

Литература.
1.Ванюшин, Б. Ф. Апоптоз у растений / Б. Ф. Ванюшин // Успехи биологической химии – 2001. – Т. 41. – С. 3-38.

UDC 632.938.2

ISOLATION FACTORS INDUCES APOPTOSIS FROM PLANTS

Pavlovskaya N.E., Gagarina I.N., Gavrilova A.Y., Gorkova, I.V., Kostromichova E.V., Nagur M.Y.

FGBOU IN Orel State Agrarian University. NV Parahina, Orel, Russia
302019, Orel, Generala Rodina, 69 D.
e-mail: ninel.pavlovsckaya@yandex.ru

Comparative data obtained separation factors causing apoptosis of plant facilities. It is shown that the highest yield of solids from vegetable objects marked with the extraction water.

Key words: apoptosis, monstera, koleoptili, antioxidant system

To date, it identified a number of substances that can activate or slow the progression of apoptosis. Plants have specific inducers of apoptosis - ethylene, cytokinins, auxins, gibberellins, jasmonate, salicylate, elicitors, CN-substances and so on [1].

To prepare extracts suspected of apoptosis inducers used koleoptili etiolated seedlings of wheat and barley on 4- 5 hours of germination and young leaves of Monstera (Monstera deliciosa L.).

For isolation from vegetable nature and identify objects factors causing apoptosis, inorganic (water, 0.1N NaCl, alkali) was used, and the organic (ethyl alcohol) solvents. From these data it follows that the highest yield in the extraction of dry veschestvaotmechen monstera leaf with water is 12 mg, 13.1 mg coleoptile wheat, barley coleoptile 14.2 mg. Activity test results antioxidant enzymes obtained from seedlings of wheat and barley have shown that the dynamics of the activity changes in all treatment options maintains the same trend: the activity is increased to 5 th day, and falls to the 10-th day of germination, therefore, apoptosis inducer, isolated from different plant objects, firstly, the water-soluble, second, identical in monstera, barley and wheat, and thirdly causing changes in the activity of the same three antioxidants macromolecular.

References:
1.Vanyushin, BF Apoptosis in plants / BF Vanyushin // Advances Biological Chemistry - 2001. - V. 41. - P. 3-38.

УДК 58.01/.08

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ КОТОВНИКА ГУСТОЦВЕТКОВОГО (NEPETA DENSIFLORA KAR. ET KIR) IN VITRO

Мырзагалиева А.Б., Оразов А.Е.

Восточно-Казахстанский государственный университет им. С.Аманжолова, Казахстан
070002, Усть-Каменогорск, ул. 30-й Гвардейской дивизии, д.34
e-mail: anara_vkgu@mail.ru

В статье обсуждается выбор способа размножения in vitro котовника густоцветкового. Исследование относится к области биотехнологии и может найти применение при выращивании сырья для фармакологии и сохранении редких и эндемичных видов растений.

Ключевые слова: микроклональное размножение, in vitro, стерилизация, эксплант, питательная среда

Несомненными преимуществами клонального микроразмножения растений является возможность производить в больших количествах вегетативное потомство у трудно размножаемых в обычных условиях видов редких, исчезающих и хозяйственно-ценных растений [1-2].

Котовник густоцветковый многолетнее растение семейства Lamiaceae Dumort. Выбор данного вида в качестве объекта исследования выбран необходимостью сохранения вида, вид относится к редким эндемикам Алтайской Горной Страны, встречается на территории Монгольского Алтая, Казахстанского Алтая и Китая [3]. Растет в альпийском поясе на каменистых местах и у ручьев. Котовник густоцветковый на Казахстанском Алтае встречается только на хребте Нарын, на горе Жайдак.

В качестве объекта для внедрения в культуру были использованы корневищные почки. Почки прошли полный процесс очищения по нескольким схемам стерилизации, гипохлорит натрия в сочетании с этанолом эффективен при стерилизации.

В качестве питательной среды была использована питательная среда по прописи Мурасиге-Скуга без добавления регуляторов роста. Экспланты начали проявлять жизнеспособность на 3 день культивирования, начали прорастать в среде. Во время культивирования за 20 дней у эксплантов развились вегетативные органы, стебли и листы. После истечения 34 дней культивирования на агаризованной среде микрорастение было расчеренковано на жидкую среду по прописи М/С с добавлением регуляторов роста (6-бензиламинопурин 1 мг/л, индолилмасляная кислота 0,2 мг/л, гиббереловой кислота 0,5 мг/л, кинетин 0,5 мг/л).

Было отмечено, что развитие микрорастений из микрочеренков на жидкой среде происходит быстрее и через 15 дней вновь образованное микрорастение пригодно для повторного черенкования. Рост корней активизируется на 25 день культиваций. Далее осуществлялась высадка полученных микрорастений в грунт, использовались два вида грунта: простой грунт для цветочных культур, грунт на основе песка и перлита в соотношение 1/1. Почва из песка и перлита показала себя гораздо лучше, чем простой грунт.

Предложенный способ микроклонального размножения котовника густоцветкового выгодно отличается отсутствием гормонов роста и сахарозы в начальной стадии, что способствует уменьшению риска возникновения сомаклональной изменчивости и удешевлению процесса тиражирования больших объемов растения. Котовник густоцветковый содержит различные соединения (включая биологически активные вещества), которые могут быть применены в фармакологии. Таким образом, при-

менение метода микроклонального размножения позволит решить актуальную проблему быстрого воспроизведения редкого эндемика и сохранения его путем введения в широкую культуру.

Литература.
1. И.В. Митрофанова и др. Морфогенез и регенерация растений котовника in vitro // Проблемы дендрологии, садоводства и цветоводства: Тезисы доклады международной конференции молодых ученых. 25-27 сентября 1995. - Крым. Ялта. – С.75.
2. Садовская Т.В., Налюбова В. Л. Способ микроклонального размножения полукустарниковых растений // Патент Беларуси № BY, 8688, C1. 30 декабря 2006.
3. Бекет У., Оланова М.В. Редкие и исчезающие растения Монгольского Алтая и новый подход к проблеме их охраны // Grand Altai Research & Education. – 2014. - №1. - С.114-128.

MICROCLONAL REPRODUCTION OF NEPETA DENSIFLORA KAR. ET KIR IN VITRO

Myrzagaliyeva A.B, Orazov A.E.

Sarsen Amanzholov East Kazakhstan State University, Kazakhstan. 070002, Ust-Kamenogorsk 30th Gvardeiskaya Divisia st., house №34 . E-mail: anara_vkgu@mail.ru

In this article, we will discuss the way of reproduction of Nepeta densiflora. The research related to the biotechnology and can be used for growing row materials for pharmacology and for saving rare and endemic species of plants.

Key words: microclonal reproduction, in vitro, sterilization, explant, nutrient medium.

Doubtless advantage of microclonal reproduction of plants is possibility to produce vegetative progeny of difficult propagated plants in usual conditions such as rare, threatened and economically valuable plant [1-2].

Nepeta densiflora is a perennial herb of the Lamiaceae Dumorts's family. The choice of this type as an object of the research is chosen because of the need to preserve the species, the species belongs to the rare endemics of Altay Mountains, found in the territory of the Mongolian Altai, Altai Kazakhstan and China [3]. It grows in the alpine zone on stony ground and streams. Nepeta densiflora is found only on the ridge of the Naryn, on the Mount Zhaydak in Altai Kazakhstan.

The rhizome buds were used as an object for introduction into the culture. Buds underwent a complete purification process for several sterilization's schemes, sodium hypochlorite in combination with ethanol more efficient in sterilization.

The nutrient medium according to Murashige and Skoog recipe without the addition of growth regulators was used as the nutrient medium. Explants started showing viability on day 3 of cultivation, began to grow in the medium. During the 20 days of cultivation in the explants have developed vegetative organs, stems and leaves. After 34 days of cultivation microplant was grafted on an agar medium into a liquid medium according to the prescription of M/S with the addition of growth regulators (6-benzylaminopurine 1 mg/l indolebutyric acid 0,2 mg/l gibberellic acid 0.5 mg/l kinetin 0.5 mg/l).

It was noted that the development of microplants from micrografts in the liquid medium is faster and after 15 days, the newly formed microplants are suitable for re-grafting. The growth of the roots is activated on the 25th day of the cultivations. Then received microplants were planted out into the ground, two types of soil were used: a simple primer for flower crops, the soil on the basis of sand and perlite in a ratio of 1/1. The soil of sand and perlite proved much better than the simple soil.

The proposed method microclonal reproduction of Nepeta densiflora is profitably different with the absence of growth hormones and sucrose in an initial stage that helps to reduce the risk of somaclonal variability and reduce the cost of replicating large amounts of the plant's process. Nepeta densiflora contains various compounds (including biologically active agents) which can be used in pharmacology. Thus, the use of the method of the microclonal reproduction will solve the actual problem of the rapid reproduction of rare endemic and save it by introducing into the broader culture.

References:
1. Mitrofanova I.V., Rabotyagov V.D., Aksenov Yu.V. Morphogenesis and regeneration of catnip plants in vitro // processing of medicinal raw materials and the production of herbal remedies for medicine and agriculture: Abstracts Int. scientific-practical. Conf. - Almaty, 1996. - P. 75.
2. Sadovskaya T.V., Nalyubova V.L. Method of microclonal reproduction of subdumi plants // Patent Belarus BY clause number, 8688, P1. December 30th, 2006.
3. Beket U., Olanova M.V. Rare and Endangered Plants of the Mongolian Altai and new approach to the problem of their protection // Grand Altai Research & Education. – 2014. - №1. - P.114-128.

УДК 579.873.11.082.56

ВЛИЯНИЕ СПОСОБОВ ХРАНЕНИЯ НА ПРОДУЦЕНТ БИОПРЕПАРАТА НИГРОЦИДА- АКТИВНОГО ПРОТИВ ФИТОПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ.

Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Гальченко В.Ф.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
119071 Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2
e-mail: svfilipova@mail.ru

Установлены оптимальные способы среднесрочного и длительного хранения штамма-продуцента биопрепарата нигроцида. Хранение в виде почвенных культур в течение 6 мес позволяет сохранять исходный уровень жизнеспособности и антибиотической активности продуцента. Для длительного хранения (в течение 2 лет) рекомендован способ хранения в лиофильно высушенном состоянии.
Ключевые слова: штамм-продуцент, биопрепарат, фитопатогенная микрофлора хранение, жизнеспособность, антибиотическая активность,

Совместно с Всероссийским НИИ селекции и семеноводства овощных культур (ВНИИССОК) и МСХА им. К.А.Тимирязева была проведена разработка нового биопрепарата нигроцида для борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений. Проведенные испытания показали высокую эффективность биопрепарата при использовании его для борьбы с заболеваниями репчатого лука, земляники садовой, гвоздики ремонтантной, вызываемых фитопатогенными грибами, а также сосудистым бактериозом проростков капусты. Нигроцид представляет собой лиофильно высушенную культуральную жидкость штамма-продуцента Streptomyces sp. Для изучения влияния способов и условий хранения на изменение уровня жизнеспособности и антибиотической активности культуру продуцента закладывали на хранение в лиофильно высушенном состоянии, в виде почвенных культур, под слоем вазелинового масла. Установлено, что среднесрочное хранение в виде почвенных культур в течение 6 мес обеспечивает сохранение исходного уровня жизнеспособности и антибиотической активности продуцента, однако, увеличение срока хранения (до 2 лет) приводит к значительному снижению выживаемости (50%). Хранение под слоем вазелинового масла вызывает падение антибиотической активности. Хранение в лиофильно высушенном состоянии (в течение 2 лет) обеспечивает высокий уровень (75%) выживаемости и антибиотической активности (90%) продуцента, что позволяет рекомендовать этот способ для длительного хранения продуцента.

EFFECT OF METHODS OF STORAGE ON STRAIN - PRODUCENT OF NIGROCID ACTIVE AGAINST FITOPATOGENIC MICROOORGANISMS

Filippova S. N., Surgucheva N. A., and Gal'chenko V. F.

Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences. 33, bld. 2 Leninsky Ave., Moscow 119071, Russia

Abstract— It was established the best ways to store of strain - producent of nigrocid. The strain stored as soil cultures maintain the initial level of viability and antibiotic activity within 6 months. For long-term storage (2 years) is recommended method of storage in a lyophilized state.
Key words: strain – producent, storage, viability, antibiotic activity, fitopatogenic microoorganisms

Together with All-Russian Scientific Research Institute of vegetable breeding and seed production (VNIISSOK) and Moscow Timiryazev agricultural Academy it was carried out to develop a new biological product «nigrotsid» for diseases of crop plants. Tests have shown high efficiency of nigrotsid, when used to combat diseases of onion, strawberry, clove remontant caused by harmful fungi and vascular bacteriosis of cabbage seedlings. Nigrotsid is a freeze-dried producing strain of Streptomyces sp. culture broth. To study the effect of the methods and storage conditions on the viability and the level of antibiotic activity of the strain-producent culture producer stored in lyophilized state, under mineral oil, and as soil cultures. It is found that medium-term storage of cultures in soil for 6 months maintains the baseline viability and producing antibiotic activity, however, increased the storage time (up to 2 years) leads to a significant reduction in survival (50%). Storage under a layer of mineral oil causes a decrease antibiotic activity. Storage in a freeze dried state (within 2 years) provides a high level (75%) of antibiotic activity and survival (90%) of the producer, which allows to recommend the method for producing long-term storage.

УДК 631.95:577.391; 621:039.58

ПРИМЕНЕНИЕ БИОНАНОКАПСУЛЬНЫХ ФОРМ АНТИОКСИДАНТОВ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Ильязов Р.Г[1], Пахомова В.М.[2]

[1] НПЦ «Липосомальные технологии», Елабуга, Т. Гиззата, 16, 423602
[2] Казанский государственный аграрный университет, Казань, Россия
Казань, ул. К. Маркса, 420015
e-mail: pahomovav@mail.ru

Разработаны бионанокапсульные формы антиоксидантов (β-каротина, астаксантина, омега-3) для повышения продуктивности и здоровья сельскохозяйственных животных, а также улучшения качества их продукции.

Ключевые слова: бионанокапсулы, антиоксиданты, животноводство

Разработанные ООО НПЦ «Липосомальные технологии» бионанокапсульные формы антиоксидантов (β-каротина, астаксантина, омега-3) представляют собой новые многофункциональные регуляторные препараты для сельскохозяйственных животных и обладают высокой биодоступностью (96%). Они обеспечивают увеличение молочной продуктивности на 2-5 л молока от каждой коровы в сутки; улучшение параметров качества молока (массовой доли жира с содержанием полиненасыщенных жирных кислот Омега-3 и белка); увеличение приростов живой массы в овцеводстве от 100 г на 1 овцу в сутки; улучшение пищеварения рубца за счет оптимизации кислотности рубца для жизнедеятельности микробной флоры – целлюлитиков при pH 7,4; устранение ацидоза у животных; предотвращение кетоза после отела; профилактику гепатозов и их устранение; снижение расходов концентратов, зерна, шротов на 15-20 %; значительное уменьшение затрат на медикаменты; повышение оплодотворяемости животных и увеличение репродуктивной функции животных; нормализацию обмена веществ в связи с улучшением конверсии корма; повышение жизнеспособности молодняка крупного рогатого скота.

UDC 631.95:577.391; 621:039.58

APPLICATION OF BIONANOCAPSULES OF ANTIOXIDANTS IN ANIMAL BREEDING

Ilyazov R.G., Pakhomova V.M.

Kazan State Agrarian University, Kazan, Russia
420015, Kazan, st. Karl Marx, 65
e-mail: pahomovav@mail.ru

Bionanocapsules of antioxidants (β-carotene, astaxanthin, omega-3) improved livestock productivity and animal health , as well as the quality of animal productions were developed.

Keywords: bionanocapsules, antioxidants, livestock

Bionanocapsules of antioxidants (β-carotene, astaxanthin, omega-3) as a new multifunctional regulatory drugs for farm animals with a high bioavailability (96%) were developed by SPC «Liposomal Technology». They provide increased milk production by 2-5 liters of milk per cow per day; improvement of milk quality parameters (mass fraction of fat with polyunsaturated fatty acids and protein); an increase in weight gain in sheep from 1 100 g per sheep per day; improved digestion rumen by optimizing pH for the life of microbial cellulitical flora at pH 7.4; elimination of acidosis in animals; prevention of ketosis after calving; steatosis prevention and elimination; reduction of costs of concentrated food, grain and oil-seed meal by 15-20%; a significant reduction in the cost of medicines; increase of the fertility of animals and reproductive functions of animals; normalization of metabolism due to improved feed conversion; increase vitality of young horned cattle.

СЕКЦИЯ

ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

SECTION

FOOD BIOTECHNOLOGY

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 663.813

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ НАПРАВЛЕННОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК РАСТИТЕЛЬНОГО И МИКРОБНОГО СЫРЬЯ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ ЦЕННЫХ ПРИРОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Курбатова Е.И., Римарева Л.В., Борщева Ю.А., Давыдкина В.Е.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального бюджетного государственного учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии», Москва, Россия
111033 Москва, ул.Самокатная, д.4Б
e-mail: elenaivkurbatova@gmail.com

На основании полученных экспериментальных данных разработаны биотехнологические основы направленного ферментолиза полимеров клеточных стенок сырьевых источников растительного и микробного происхождения с целью получения продуктов, обогащенных биологически активными веществами в качестве компонентов функционального питания и БАД

Ключевые слова: биокатализ, биологически активные вещества, функциональные продукты, ферментативные системы

Одним из приоритетных направлений деятельности агропромышленного комплекса является развитие производства пищевых продуктов, способных корректировать недостаток эссенциальных элементов в рационе питания населения, способствующих сохранению здоровья, улучшению качества жизни и профилактике различных заболеваний. При этом ассортимент продукции, отвечающей заявленным требованиям, включает широкий спектр пищевых продуктов, обогащенных незаменимыми компонентами: специализированных, диетических, продуктов функционального назначения и биологически активных добавок к пище. Перспективным направлением в развитии индустрии продуктов питания биокоррегирующего действия является получение натуральной продукции на основе возобновляемых природных ресурсов.

На основании экспериментальных данных влияния ферментных систем различной субстратной специфичности на выход биологически активных компонентов из плодово-ягодного, зернового и микробного сырья подобраны оптимальные мультиэнзимные системы для деструкции биополимеров растительного сырья. Экспериментально подтверждена эффективность использования подобранных ферментных систем для гидролиза различных групп плодово-ягодного сырья для получения ферментолизатов заданного состава. Показана возможность получения ферментолизатов с повышенным содержанием витаминов, каротиноидов, фенольных веществ, токоферолов, аминокислот, стеринов. Так, в процессе обработки зернового сырья получены ферментолизаты, обогащенные токоферолами, аминокислотами. Установлена возможность снижения аллергенных свойств зерновых ферментолизатов в результате деструкции белковых фракций глиадинов и глютенинов.

Использование биокаталитических систем заданного состава в процессе ферментолиза дрожжевой биомассы позволяет получать ферментолизаты с повышенным содержанием белковых веществ,

низкомолекулярных пептидов, аминокислот, витаминов, нуклеотидов, а также препараты с высоким содержанием биологически ценных полисахаридов.

Таким образом, изученные закономерности биокатализа растительного и микробного сырья позволили разработать биотехнологические основы направленной ферментативной деструкции внутриклеточных полимеров с целью получения продуктов с повышенным содержанием биологически ценных природных компонентов.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-16-00104.

Литература.
1. Серба Е.М., Поляков В.А., Римарева Л.В., Курбатова Е.И., Юскина О.В., Погоржельская Н.С. Биотехнологические методы получения пищевых добавок на основе биоконверсии микробной биомассы //Вопросы питания. – 2016. – т.85. - №2. – С 149-150.
2. Курбатова Е.И., Римарева Л.В., Соколова Е.Н., Давыдкина В.Е., Серба Е.М.,Погоржельская Н.С., Поляков В.А. Снижение аллергенности белков пшеницы на основе их биокаталитической конверсии //Вопросы питания. – 2016. – т.85. - №2. – С 201.

UDC 663.813

BIOTECHNOLOGICAL BASES OF PLANT AND MICROBIAL RAW MATERIALS CELL WALLS ENZYMATIC DEGRADATION TO OBTAIN PRODUCTS WITH BIOLOGICALLY VALUABLE NATURAL SUBSTANCES HIGH CONTENT

Kurbatova E.I., Rimareva L.V., Borhcheva Y. A., Davydkina V. E.
Russian scientific research Institute of food biotechnology - branch of Federal state budget institution of science Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnologie and Food Safety, Moscow, Russia
111033 Moscow, Samokatnaya, 4b
e-mail : elenaivkurbatova@gmail.com

The biotechnological bases of directed enzymatic hydrolysis of cell walls plant and microbial raw materials polymers have been developed on the basis of the obtained experimental data. Developed biotechnological bases allow to obtaining biologically active substances enriched products and use it as components of functional foods and dietary supplements.

Key words: biocatalysis, biologically active substances, functional products, enzymatic systems

One of the main agricultural sector priorities is food products development which are able to correct essential elements lack in the population diet, to contribute the preservation of health, to improve of life quality and prevention of various diseases. At the same time, the groups of products that meet these requirements include wide range of food essential components enriched products, specialized, diet products, functionality and biologically active additives to food. The perspective direction of the food biocorrectors development is natural products obtaining based on renewable natural resources using. Due to experimental data of the different enzymes action influence to the biologically active components yield from plant materials optimum enzymatic systems were selected for the plant and microbial raw materials biopolymers degradation. Selected enzyme systems using for different fruits and berries groups hydrolysis allows to obtain hydrolysates of specified content. The results showed that multienzyme systems application allows to obtain extracts with a high content of vitamins, carotenoids, phenolic, tocopherol, amino acids, sterols. So, according to the results of research, the grain raw materials enzymatic processing helps to obtain tocopherol, amino acids enriched hydrolyzates and with reduced amount of gliadin and glutenins allergenic fractions.

The results indicate that enzyme systems with specified composition using for yeast biomass bioconversion provide to obtain enriched extracts with high concentration of proteins, low molecular weight peptides, amino acids, vitamins, nucleotides and also biologically polysaccharides preparations by yeast biomass hydrolysis.

Furthermore, biotechnological bases of cell polymers directed enzymatic hydrolysis have been developed on the basis of plant and microbial raw materials biocatalyst regularities. Developed biotechnological bases application allows to obtaining enriched products with high content biologically active substances.

The research was supported by Russian Sciency Foundanion, grant № 16-16-00104.

References:
1. Serba E.M., Polyakov V.A., Rimareva L.V., Kurbatova E.I., Uskina O.N, Pogorzhelskaya N.S. Biotechnological methods of food supplements obtaining based on the microbial biomass bioconversion. Scientific and practical journal «Problems of Nutrition» – 2016. – т.85. - №2. – P. 149-150.
2. Kurbatova E.I., Rimareva L.V., Sokolova E.N., Davydkina V. E., Serba E.M., Pogorzhelskaya N.S., Polyakov V.A. Allergenic wheat proteins decreasing based on their biocatalytic conversion // Scientific and practical journal «Problems of Nutrition». – 2016. – т.85. - №2. – P 201.

УДК 663.5:006.354

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕКТРОМЕТРИИ ПРИ СОЗДАНИИ НОВЫХ ВИДОВ РЕЦЕПТУР ЛИКЕРОВОДОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Приёмухова Н.В., Абрамова И.М., Савельева В.Б., Поляков В.А.

«Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии» - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, Москва, ул. Самокатная, д. 4-б
e-mail: tehnohimkontrol@mail.ru

Применение спектрофотометрического метода идентификации эфирных масел и определение его количественного содержания в ароматных спиртах, применяемых для создания рецептур ликероводочных изделий.

Ключевые слова: спектрофотометрический метод анализа, ликероводочная продукция, эфирные масла, ароматные спирты, идентификация.

У многих народов, проживающих на территории нашей страны, существуют многовековые традиции приготовления ликероводочных изделий с применением ароматобразующего сырья, придающего напитку специфический вкус и аромат [1].

На основании научно-исследовательских работ нашего института и опыта работы ликероводочных заводов был составлен сборник «Рецептуры ликероводочных изделий и водок», в котором уточнены рецептуры изделий, технологические инструкции, нормативы на полуфабрикаты и сырье. С каждым годом растет популярность ликероводочных изделий, в связи с этим появляется необходимость создания новых видов рецептур [2].

В нашем веке высоких технологий разработаны инструментальные методы анализа, которые возможно использовать не только для осуществления контроля качества продукции на всех этапах его производства и в процессе дальнейшего хранения, но и при создании рецептуры ликероводочного изделия. Одним из таких методов является метод спектрофотометрии, который широко используется в различных отраслях пищевой промышленности [3].

В целях создания ликероводочных изделий высокого качества, в рецептурах приготовления которых используется растительное эфиромасличное сырье, был разработан спектрофотометрический метод определения эфирного масла в ароматном спирте. Данный метод позволяет получить объективные данные о содержании эфирного масла в используемых ароматных спиртах.

В результате работы были проведены измерения спектров поглощения различных эфирных масел и ароматных спиртов и на основе полученных данных создана цифровая база [4].

Используя данную базу, мы можем определить наличие заявленного эфирного масла в ароматном спирте с целью его внесения в рецептуру для улучшения аромата и качества напитка при разработке нового вида изделия.

Литература.
1. Бобрышев, Ю.И. Золотая книга элитарных вин и водок России. – М.: Кругозор – наука, 2000. – 606 с.
2. Рецептуры ликероводочных изделий и водок. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 346 с.
3. Пругло, Г.Ф Оптические методы анализа: учебно-методическое пособие. – СПб.: ГОУВПО СПбГТУРП, 2010. – 52 с.
4. СТО 2-02-2010 Ароматные спирты. Метод идентификации эфирного масла и количественного определения его объемной доли с применением УФ-спектрофотометрии. – М.: 2010.

UDK 663.5:006.354

THE USE SRECTROMETRY FOR CREATING NEW TYPES OF LIQUORS

Priemukhova N.V., Abramova I.M., Savelyeva V.B, Polyakov V.A.

All-Russian Research Institute of Food Biotechnology «- a branch of the Federal State budget institution of science of federal research centre of food, biotechnology and food safety, Moscow, Russia
111033, Moscow, Samokatnaya st., 4-b
e-mail: tehnohimkontrol@mail.ru

The use of spectrophotometric method for the identification of essential oils and determination of its quantitative content in aromatic alcohols used to create formulations of alcoholic beverages.

Key words: spectrophotometric method of analysis alcoholic beverages, essential oils, aromatic alcohols, identification.

Many people living in our country, essentially, by the centuries-old traditions of cooking liquors to-Application-tion aromatobrazuyuschego raw materials, gives the drink a distinctive taste and aroma.

Based on the research work of our institute and experience distilleries was compiled the book «Recipes liqueur products and vodka,» in which was clarified the recipes of products, technological instructions, specifications for semi-products and raw materials. From year to year growing the popularity of liquors, in this regard, there is a need to create new kinds of recipes.

In this age of high technology developed instrumental methods of analysis which may be used not only to monitor product quality at all stages of production and during further storage, but also when creating recipes liquors. One of the one-cal methods is the method of spectrophotometry, which is widely used in various sectors of the food industry.

In order to create high-quality alcoholic beverage products, prescription-tures cooking which uses vegetable raw materials essential oil, it was developed spectrophotometric method for the determination of essential oils in flavored alcohol. This method allows you to obtain objective data on the co-holding the essential oil used in aromatic alcohols.

As a result, work was carried out measurements of the absorption spectra of the time-personal of essential oils and aromatic alcohols and on the basis of the data created a digital database.

Using this database, we can determine the presence of the claimed ester-foot oil in flavored alcohol with a view to its inclusion in the formulation to improve the flavor and quality of the drink in the development of a new type of product.

References:
1. Bobrishev, YI The Golden Book of elite wines and vodkas in Russia. - M.: Horizon Science, 2000. - 606 p.
2. Formulations liquors and vodkas. – M.: Light and food industries, 1981. - 346 p.
3. Pruglo, GF Optical methods of analysis: a teaching aid. – SPb.: VPO SPbGTURP, 2010. - 52 p.
4. STO 02/02/2010 fragrant alcohols. Method of identification of essential oil and its quantitative determination of volume fractions using UV spectrophotometry. - M.: 2010.

УДК 579.083.13: 579.25

ПОДБОР ШТАММОВ - АНТАГОНИСТОВ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЗЕРНОПРОДУКТОВ

Чижаева А.В., Дудикова Г.Н., Амангельды А.А.

Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности, Алматы, Казахстан
050060, Алматы, пр. Гагарина,238 «Г»,
e-mail: anna_chizhaeva@mail.ru

Исследованы антагонистические свойства пяти штаммов - *Lactobacillus casei KC1, Lb. pontis 67, Lb. paracasei 35, Pediococcus acidilactici П8* и *Pediococcus acidilactici РЖ1* в отношении *B. subtilis* и грибов родов *Aspergillus, Mucor, Penicillum*. Показана целесообразность включения этих культур в состав препарата -пробиотика.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, антагонизм, зернопродукты.

Микробиологическое качество зерна и муки в Казахстане с каждым годом ухудшается. Наряду с присутствием в зерне плесневых грибов, наличие в зерне, муке, а также хлебе и хлебобулочных изделиях мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов - возбудителей картофельной болезни хлеба не только ухудшает технологические свойства зернопродуктов, но вредно для здоровья людей и животных по причине образования токсинов этой группой микроорганизмов. В связи с этим хлебопекарные и перерабатывающие предприятия нуждаются в эффективных отечественных препаратах, способных бороться со спонтанной микрофлорой муки, характерной для нашего региона и обеспечивать полноценное качество хлеба, хлебобулочных изделий и зернопродуктов. Традиционно молочнокислые бактерии входили с состав заквасок для пшеничного и ржаного хлеба. Молочнокислые бактерии могут образовывать антибиотические вещества и за счёт этого оказывать бактериостатическое и бактерицидное действие на вредную микрофлору. С этой целью нами исследовалась антагонистическая активность 5 культур молочнокислых бактерий. Для исследования антагонистической и бактериоцинногенной активности культур молочнокислых бактерий Lactobacillus casei КС1, Lb. pontis 67, Lb. paracasei 35, Pediococcus acidilactici П8 и Pediococcus acidilactici РЖ1 к возбудителю картофельной болезни хлеба B. subtilis использовали метод диффузии в агар, с небольшой модификацией с использованием тест – культуры для определения антибиотической активности Bacillus subtilis ATCC 6633 (1х106 КОЕ/мл). Результаты анализа антагонизма МКБ представлены в таблице 1. Антагонистическая активность к тест-культуре Bacillus subtilis ATCC 6633 была стабильна у всех пяти штаммов, немного снижалась, но не ингибировалась при pH 6,0 и в присутствии каталазы, т.е. была обусловлена продукцией и секрецией бактериоцинов исследуемыми штаммами.

Таблица 1 *– Антагонистическая активность культур молочнокислых бактерий к возбудителю картофельной болезни хлеба Bacillus subtilis*

Штамм	Зоны угнетения роста Bacillus subtilis ATCC 6633 (мм)		
	супернатант без добавок	супернатант +NaOH (pH 6,0)	супернатант +NaOH (pH 6,0) +каталаза
Lactobacillus casei КС1	25±0,9	24±0,5	23±0,5
Lb. pontis 67	21±0,7	19±0,9	19±0,8
Lb. paracasei 35	23±0,9	22±0,8	21±0,7
Pediococcus acidilactici П8	23±0,8	22±1,0	22±1,0
Pediococcus acidilactici РЖ1	24±0,9	23±0,8	23±0,8

Изучение антагонизма молочнокислых бактерий в отношении плесневых грибов родов Aspergillus, Mucor, Penicillum,- возбудителей заболевания хлеба проводилось совместно с РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы. Все исследуемые молочнокислые бактерии обладали довольно высокой антагонистической активностью в отношении M. pusillus A. niger и Penicillium cyclopium (таблица 2).

Таблица 2 *- Антагонистическая активность молочнокислых микроорганизмов (мм) в отношении плесневых грибов - возбудителей заболевания хлеба*

Штаммы	Зоны угнетения роста тест-культур, мм		
	Mucor pusillus	Aspergillus niger	Penicillium cyclopium
Lb. pontis 67	20±0,8	11±0,3	17±0,6
Lb. paracasei 35	18±0,5	11±0,4	15±0,5
Lactobacillus casei КС1	16±0,7	11±0,4	17±0,3
Pediococcus acidilactici П8	13±0,3	14±0,4	15±0,3
Pediococcus acidilactici РЖ1	13±0,2	14±0,3	14±0,4

Таким образом, применение исследованных культур молочнокислых бактерий-антагонистов к B. subtilis и плесневым грибам в сост аве пробиотического препарата может обеспечивать микробиологическую безопасность зернопродуктов.

UDC 579.083.13: 579.25

SELECTION OF STRAINS - ANTAGONISTS FOR ENSURING MICROBIOLOGICAL SAFETY OF GRAIN PRODUCTS

Chizhayeva A.V., Dudikova G.N., Amangeldi A.A.

The Kazakh research institute of the processing and food industry, Almaty, Kazakhstan
050060, Almaty, Gagarin Ave., 238 «G»,
e-mail: anna_chizhaeva@mail.ru

Antagonistic properties of five strains - Lactobacillus casei of KC1, Lb. pontis 67, Lb. paracasei 35, Pediococcus acidilactici P8 and Pediococcus acidilactici RZh1 concerning B. subtilis and fungi of the genus Aspergillus, Mucor, Penicillum are investigated. Expediency of inclusion of these cultures in composition of preparation - probiotics is shown.

Keywords: lactic acid bacteria, antagonism, grain products

Microbiological quality of grain and flour in Kazakhstan worsens every year. Along with presence at grain of mold fungi, existence in grain, flour, and also bread and bakery products of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms - causative agents of potato disease of bread not only worsens processing behavior of grain products, but is unhealthy people and animals because formation of toxins by this group of microorganisms. In this regard baking and processing enterprises need the efficient domestic preparation capable to fight against a spontaneous microflora of flour the characteristic of our region and to provide full-fledged quality of bread, bakery and grain products. Traditionally lactic acid bacteria entered about composition of dough sour for white and rye bread. Lactic acid bacteria can form antibiotic substances and at the expense of it to have bacteriostatic and bactericidal effect on a harmful microflora. For this purpose we investigated antagonistic activity of 5 cultures of lactic acid bacteria. For the research of antagonistic and bacteriocinogenic activity of lactic acid bacteria Lactobacillus casei KC1, Lb. pontis 67, Lb. paracasei 35, Pediococcus acidilactici P8 and Pediococcus acidilactici RZh1 to the causative agent of potato disease of bread - B. subtilis used the diffusion method in an agar, with small modification with use the test – cultures for definition of antibiotic activity Bacillus subtilis ATCC 6633 (1x106 GFU). Results of the analysis of LAB antagonism are presented in table 1. Antagonistic activity to test culture Bacillus subtilis ATCC 6633 was stable at all five strains, decreased a little, but was not inhibited at pH 6,0 and in the presence of a catalase, i.e. was caused by production and secretion of bacteriocines by studied strains.

Table 1 *– Antagonistic activity cultures of lactic acid bacteria to the causative agent of a potato disease of bread Bacillus subtilis*

Strain	Zones of growth inhibition of Bacillus subtilis ATCC 6633 (mm)		
	supernatant without additives	supernatant +NaOH (pH 6,0)	supernatant +NaOH (pH 6,0) +catalase
Lactobacillus casei KC1	25±0,9	24±0,5	23±0,5
Lb. pontis 67	21±0,7	19±0,9	19±0,8
Lb. paracasei 35	23±0,9	22±0,8	21±0,7
Pediococcus acidilactici П8	23±0,8	22±1,0	22±1,0
Pediococcus acidilactici РЖ1	24±0,9	23±0,8	23±0,8

Studying of lactic acid bacteria antagonism concerning mold fungi of the genus Aspergillus, Mucor, Penicillum-causative agents of a disease of bread was carried out together with RSE «Institute of Microbiology and Virology» CS of MES RK, Almaty. All studied lactic acid bacteria had quite high antagonistic activity concerning M. pusillus A. niger и Penicillium cyclopium (table 2).

Table 2 *- Antagonistic activity of lactic microorganisms (mm) concerning mold fungi - causative agents of a disease of bread*

Strains	Zones of growth inhibition of test-cultures (mm)		
	Mucor pusillus	Aspergillus niger	Penicillium cyclopium
Lb. pontis 67	20±0,8	11±0,3	17±0,6
Lb. paracasei 35	18±0,5	11±0,4	15±0,5
Lactobacillus casei КС1	16±0,7	11±0,4	17±0,3
Pediococcus acidilactici П8	13±0,3	14±0,4	15±0,3
Pediococcus acidilactici РЖ1	13±0,2	14±0,3	14±0,4

Thus, use of the studied cultures of lactic acid bacteria antagonists to B. subtilis and mold fungi in structure of probiotic preparation can ensure microbiological safety of grain products.

UDC 579.083.13: 579.25

CONSORTIUM OF LACTOBACILLI AS BASIS OF PROBIOTIC FEED ADDITIVE FOR FARM ANIMALS, BIRDS AND FISHES

Chizhayeva A.V., Dudikov G. N., Alimkulov Zh.S., Amangelda A.A., Gubareva S. S.

Kazakh research institute of the processing and food industry, Almaty, Kazakhstan 050060, Almaty, Gagarin Ave., 238 «G»
E-mail: anna_chizhaeva@mail.ru

The consortium from three strains of lactobacilli Lactobacillus helveticus 4Sh1, Lb. fermentum 3Sh1 and Lb. pontis 9K3 for probiotic feed additive is created. Its antagonistic and bacteriocinogenic properties are investigated.

Key words: lactobacilli, consortium, probiotics, antagonism.

Probiotics is considered as an effective element of the production technology of safe production of animal husbandry, poultry farming and fish breeding. The consortium of lactobacilli Lactobacillus pontis 67, Lb. casei 22, Lb. paracasei 104 for receiving the probiotic feed additive was created. Antagonistic activity to Bacillus subtilis ATCC 6633 - test culture for determination of antibiotic activity was stable at all three strains and their consortium, wasn't inhibited at pH 6,0 and in the presence of a catalase. Primary research of the nature and activity of extracellular metabolites of lactic acid bacteria and their consortium carried out with use of Vivaflow 50 ultrafiltrational system (« Sartorius» firm) and filters with sizes of pore - 30 000 D, 10 000 D, 5 000 D. It is established that cultures of Lactobacillus paracasei-104 and Lb. casei 22 produce metabolites with a molecular weight of 30000 of D, 10000 D and 5000 D approximately in equal quantities, and the culture of Lactobacillus pontis - 67 synthesizes mainly low- molecular peptides, the consortium produces metabolites with a molecular weight of 30000 D and 10000 D on 45%, 5000 D-10%. From monocultures the greatest bacteriocinogenic activity to test culture possesses the strain of Lactobacillus paracasei-104 (fraction 30000D, 10000 D and 5000D). The consortium of lactobacilli possesses the strongest bacteriocinogenic activity (fraction 10000D and 5000D) in comparison with monocultures that confirms effect of synergism in consortium.

УДК 664; 616-084; 616.39

ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ И АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Кочеткова А.А., Мазо В.К., Саркисян В.А., Воробьева В.М., Сидорова Ю.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14,
E-mail: kochetkova@ion.ru

В докладе будут освещены вопросы классификации и методов определения отличительных признаков специализированных пищевых продуктов. Будет показано, каким образом подтверждение отличительных признаков встраивается в общий алгоритм оценки эффективности специализированных пищевых продуктов.

Ключевые слова: Специализированные пищевые продукты; алгоритм оценки эффективности; доклинические исследования; клинические исследования.

По своему определению, информация об отличительных признаках пищевой продукции – это сведения о пищевой продукции, которые свидетельствуют о наличии свойств, позволяющих отличить ее от другой пищевой продукции [1]. В случаях, при которых заявленным отличительным свойством пищевого продукта являются сведения о химическом составе, пищевой ценности или регионе происхождения, алгоритм подтверждения заявленных отличительных признаков является хорошо описанной простой задачей [2]. Для подтверждения подобных свойств необходимо осуществить поиск наиболее подходящих аналитических методов исследований, который с определенной точностью позволят установить подлинность заявленных признаков.

В случаях, при которых заявленным отличительным признаком является положительный эффект для здоровья, подтверждение биологического эффекта в большинстве случаев является затруднительным [3]. Данное обстоятельство привело к появлению широкого спектра пищевых продуктов, для которых заявленный положительный эффект для здоровья является слабо доказанным.

С целью систематизации подходов к разработке новых специализированных пищевых продуктов с подтверждением их эффекта, начиная с 1999 года под руководством Международного института наук о жизни, создается Европейская комиссия по согласованному действию в области наук о функциональных пищевых продуктах [4].

Комиссией был установлен порядок подтверждения свойств для пищевых продуктов, в соответствии с которым, на основании анализа имеющихся научных данных должна проводиться оценка действия пищевых продуктов для установления положительного эффекта. Достигнутые в ходе работы Комиссии результаты стали основой для международной позиции по оценке эффективности специализированных пищевых продуктов.

Коллективом авторов доклада было проведено обобщение накопленного международного опыта в данной области, что позволило выработать четкий алгоритм, включающий проведение доклинических и клинических исследований при оценки эффективности новых пищевых продуктов. Применение данного алгоритма позволяет избежать неполноты или избыточности исследований, а также существенно сократить время, необходимое для подтверждения или опровержения заявленного эффекта.

В докладе будет рассмотрено применение алгоритма на конкретных примерах специализированных пищевых продуктов.

Литература.
1. ТР ТС 022/2011 Пищевая продукция в части ее маркировки. 2011.
2. Sarkisyan V., Bessonov V., Kochetkova A. Chapter 11 – Raw materials analysis and quality control // Developing New Functional Food and Nutraceutical Products. 2017. P. 195–211.
3. Tutelyan V. et al. Chapter 12 – Strategize the research investigations: pre-clinical and clinical evaluations // Developing New Functional Food and Nutraceutical Products. 2017. P. 213–229.
4. ILSI. Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. // Br. J. Nutr. 1999. Vol. 81 Suppl 1. P. S1-27.

UDC 664; 616-084; 616.39

FEATURES AND ALGORITHM FOR ESTIMATING THE EFFECTIVENESS OF SPECIALIZED FOOD

Kochetkova AA, Mazo VK, Sarkisyan VA, Vorobyov VM, Sidorov YuS

Federal State Institution of Science Federal Research Centre for Biotechnology of food and food security, Moscow, Russia 109240, Moscow, Ustyinsky proezd, 2/14,
E-mail: kochetkova@ion.ru

The report will highlight the issues of classification and methods of determining the hallmarks of specialized food products. It will be shown how the confirmation distinguishing features embedded in the overall effectiveness evaluation algorithm specialized food products.

Key words: foods for special dietary uses; efficacy evaluation algorithm; preclinical studies; clinical researches.

By its definition, the information on the distinctive signs of food - is an information about a food product that indicates the presence of properties whereby one can distinguish it from other food products [1]. In cases, when claimed feature of the food product is an information about the chemical composition, nutritional value or region of origin, verification algorithm is straightforward well-described task [2]. To confirm these properties it is necessary to search for the most appropriate analytical research methods, which will allow establishing the authenticity of the stated features with known accuracy.

In cases when the claimed feature is a positive health effect, the confirmation of the biological effect typically is rather complicated [3]. This fact has led to the emergence of a wide range of food products for which the claimed beneficial health effect is weakly proven.

In order to systematize the approaches to the development of new foods for special dietary uses confirming their efficacy, since 1999 under the leadership of the International Life Sciences Institute, created by the European Commission on concerted action in the field of functional food science [4].

The Commission established the procedure for confirming the properties of food, that is a knowledge-based analysis of food product efficacy. The results achieved in the course of the Commission's findings have become the basis for an international position to assess the effectiveness of specialized food products.

The team of authors of the report has generalized the international experience in this field, which allowed to develop a clear algorithm of preclinical and clinical studies to assess the efficacy of new food products. The use of this algorithm allows to avoid redundancy or incomplete investigations, as well as reduce the time to confirm or confute the claimed effect.

The report will include the specific examples of foods products, developed using the described algorithm.

References:
1. TR CU 022/2011 Food products in terms of their labeling. 2011.
2. Sarkisyan V., Bessonov V., Kochetkova A. Chapter 11 - Raw materials analysis and quality control // Developing New Functional Food and Nutraceutical Products. 2017. P. 195-211.
3. Tutelyan V. et al. Chapter 12 - Strategize the research investigations: pre-clinical and clinical evaluations // Developing New Functional Food and Nutraceutical Products. 2017. P. 213-229.
4. ILSI. Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. // Br. J. Nutr. 1999. Vol. 81 Suppl 1. P. S1-27.

УДК 57.042:57.081 +612.0871

АПРОБАЦИЯ МОДЕЛИ СНИЖЕНИЯ АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO

Шестакова С.И., Садыкова Э.О, Тимонин А. Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
109240, Москва, Устьинский проезд, дом 2/14
e-mail: tnv@ion.ru

Экспериментально подтверждено направленное повышение чувствительности лабораторных животных к воздействию токсических факторов на фоне снижения адаптационного потенциала.

Ключевые слова: токсикологические исследования, адаптационный потенциал

Модель снижения адаптационного потенциала лабораторных животных была апробирована в эксперименте с интоксикацией заведомо действующей дозой кадмия. Исследования длительностью ~65 дней проведены на крысах линии Вистар. Животные были разделены на шесть групп – три контрольных и три опытных по 30 самцов и самок в каждой. Животные 1-й контрольной и опытной групп получали рацион с 75% содержанием витаминов B1, B2, B3, B6 и минеральных веществ – Fe^{3+} и Mg^{2+}, самцы 2-й и 3-й групп – рационы с 30 и 19%-ным содержанием вышеперечисленных эссенциальных веществ, самки 2-й и 3-й групп – с 28 и 18%-ным содержанием, соответственно. Животные опытных групп получали Cd^{2+} в количестве 1 мг/кг массы тела.

В рамках данного эксперимента были изучены зоометрические, гематологические, биохимические, морфологические показатели, а также показатели антиаксидантного и иммунного статуса, показатели активности апоптоза.

Анализ результатов исследований физиолого-биохимических параметров выявил целый ряд различий между контрольными и опытными группами, большинство этих различий варьировало в диапазоне от 3 до 65% и находилось в диапазоне физиологических колебаний. Тем не менее, отмечены явные закономерности отклонения некоторых показателей от контрольных величин, выражавшиеся в усилении эффекта от токсического действия кадмия на фоне снижения обеспеченности эссенциальными веществами (в ряду от 75% к 18/19%). Такие изменения демонстрировали эритроцитарный и тромбоцитарный профили крови, содержание железа в сыворотке крови, комплекс показателей системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов крови и печени.

Таким образом, было экспериментально подтверждено направленное повышение чувствительности лабораторных животных к воздействию токсических факторов на фоне снижения адаптационного потенциала. Предложенная модель может быть использована в токсикологических исследованиях при изучении объектов с неизвестной токсичностью.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №16-16-00124.

TESTING OF THE ADAPTIVE POTENTIAL MODEL REDUCING IN THE EXPERIMENT IN VIVO

Shestakova S. I, Sadykova E. O., Timonin A. N.

Federal State Institution of Science «Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety» Moscow, Russia 109240 Moscow, Ustinsky Proezd, 2/14

A directional increase in the sensitivity of laboratory animals to the effects of toxic factors on the background of reduction of adaptive capacity was confirmed in the experiment

Key words: toxicological studies, adaptation potential

The model of adaptive potential reducing was tested in the experiment with intoxication by certainly acting dose of cadmium. The study with a duration of ~65 days was conducted in Wistar rats. The animals were divided into six groups (1st, 2nd, 3rd control groups and 1st, 2nd, 3rd test groups) 30 rats/gender in each. Animals of the 1st control and test groups received a diet with 75% dosage of vitamins B1, B2, B3, B6 and minerals – Fe3+ and Mg2+, the animals of the 2nd and the 3rd groups – diets with 30% and 19% for males, 28% and 18% for females. Animals of 1-3th test groups received Cd2+ at a dose of 1 mg/kg body weight.

In the framework of the experiment were studied the wide range of parameters: zoometric, morphological picture of peripheral blood in rats,biochemical parameters, indicators of hormonal status, the indicators of antioxidant status, the indicators of apoptosis activity

Analysis of the data revealed a number of differences between control and test groups, the majority of these differences were in the range of physiological fluctuations and ranged from 3 to 65%. However, a highly significant patterns of deviation of some parameters from the control values, which were expressed in increase of cadmium toxic effect on the background of essential substances amount reducing (in the range from 75% to 18/19%). The parameters that demonstrate such changes, included erythrocyte and platelet profiles, the iron content in the blood serum, a complex of indicators of the antioxidant defense system and lipid peroxidation of blood and liver.

Thus, the directed increase of the laboratory animals sensitivity to the effects of toxic factors on the background of adaptive potential reducing has been confirmed. The proposed model can be used for toxicological research of objects with unknown toxicity.

The project was funded by the Russian Science Foundation grant №16-16-00124.

УДК: 57.083.12

СЕЛЕКЦИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цугкиев Б.Г., Рамонова Э.В., Кабисов Р.Г., Петрукович А.Г., Хозиев А.М.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Горский государственный аграрный университет», 362040, г. Владикавказ, ул. Кирова 37.
E-mail: zugkiev@mail.ru

В статье представлены результаты селекции производственно-ценных штаммов микроорганизмов, выделенных из содержимого желудочно-кишечного тракта диких животных.

Ключевые слова: селекция, штаммы, микроорганизмы, пробиотики.

Перспективным и востребованным направлением микробиологии является поиск новых штаммов лактобактерий для создания продуктов функционального питания [1]. Для повышения лечебно-профилактического действия функциональных продуктов все шире используют пробиотические бактерии [2].

Видовую принадлежность выделенных штаммов бактерий определяли по Л.А. Банниковой (1975). Из содержимого кишечника тура кавказского выделены Enterococcus durans ВКПМ-11827, Enterococcus hirae ВКПМ-11829, Enterococcus thailandicus ВКПМ-11832 и ВКПМ-11826, Enterococcus mundtii ВКПМ-11828. Из содержимого кишечника европейской косули выделены: Enterococcus durans ВКПМ-11960, Enterococcus hirae ВКПМ-11835, а из содержимого кишечника бурого медведя - Enterococcus hirae ВКПМ-11834 и ВКПМ-11831, Enterococcus thailandicus ВКПМ-11833. Все штаммы бактерий депонированы в ВКПМ ФГУП ГосНИИ-Генетика после их идентификации и защищены патентами Российской Федерации на изобретения.

Литература.
Соловьева И.В. Изучение биологических свойств новых штаммов рода Lactobacillus // Общая биология. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, 2010. – № 2 (2). – С. 462–468.
Цугкиев Б.Г. и др. Видовое разнообразие микроорганизмов, сбраживающих лактозу, в Республике Северная Осетия-Алания и их практическое использование. Монография. – Владикавказ: Издательство ФГБОУ ВО «Горский госагроуниверситет», 2015. – 240 с.

УДК: 57.083.12

SELECTION OF PROBIOTIC MICROBIAL STRAINS

Tsugkiev B.G., Ramonova E.V., Kabisov R.G., Petrukovich A.G., Hoziev A.M.

State Federal-Funded Educational Institution of Higher Professional Education "Gorsky State Agrarian University"
Bld 37, Kirov str., Vladikavkaz, 362040
E-mail: zugkiev@mail.ru

Present article is subjected to discussion of the selection results of the productive-valuable microbial strains being isolated from gastrointestinal contents of wildlife animals.

Keyword: selection, strains, microorganisms, probiotics.

Research of new lactobacterium strains for the development of functional nutrition products is promising and high-demanded direction in microbiology [1]. Probiotic bacteria are more widely used for enhancing the therapeutic effect of functional nutrition products [2].

Identification of isolated microorganisms on the species level was done according to Bannikova L.A. method (1975). Enterococcus durans ВКПМ-11827, Enterococcus hirae ВКПМ-11829, Enterococcus thailandicus ВКПМ-11832 and ВКПМ-11826, Enterococcus mundtii ВКПМ-11828 have been isolated from the gastrointestinal contents of Caucasian tur. Enterococcus durans ВКПМ-11960, Enterococcus hirae ВКПМ-11835 have been isolated from the gastrointestinal contents of European roe deer, and Enterococcus hirae ВКПМ-11834, ВКПМ-11831 and Enterococcus thailandicus ВКПМ-11833 have been isolated from the gastrointestinal contents of brown bear. All bacteria strains are deposited with Federal state unitary enterprise "Russian National Collection of Industrial Microorganisms GosNIIGenetika" after their identification and are covered by Russian Federation patent of invention.

References:
Solovyiova I.V. Reserching the biological properties of new strains related to the Lactobacillus genus// General biology. Bulletin of Nizhny Novgorod University by N.I. Lobachevsky, 2010. –No. 2 (2). – p. 462–468.
Tsugkiev B.G. and others. Species diversity of lactose-fermenting microorganisms in the Republic of North Ossetia-Alania, and their practical use. Monograph. – Vladikavkaz: Publishing house of FSBEI of Higher Education "Gorsky State Agrarian University", 2015. – 240 p.

УДК 66-987:66-988:66-963

СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К БИОТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ БЕЛКОВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ С СОХРАНЕНИЕМ НАТИВНОЙ СТРУКТУРЫ

Банникова А. В.[1], Евдокимов И.А.[2], д.т.н., профессор

[1]ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», 410005, г. Саратов, ул. Б. Садовая 220
[2]ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», 355009, г. Ставрополь, ул Пушкина 1

Представлено исследование по влиянию высокого давления на вторичную конформацию сывороточных белков. Показано, что благодаря этому методу создается белковая структура с нативной конформацией в конденсированных системах, что является основой для развития этого метода при получении функциональных белковых ингредиентов.

Ключевые слова: белки, нативная конформация, денатурация, высокое давление

За последние два десятилетия обработка высоким давлением была показана в качестве способа сохранения продуктов от микробиологической порчи, однако отмечается и изменение физических и функциональных свойств пищевых систем [1, 2]. Контроль температуры процесса обработки высоким давлением является важным фактором, влияющим на изменение ряда свойств продуктов, включающих стабильность белка, жира, переход в гель или кристаллическое состояние, а также на равномерное распределение давления в целях инактивации нежелательных микробов и ферментов [2].

Учитывая, что высокое давление является инновационной нетермической технологией, позволяющей получать пищевые продукты с улучшенной функциональностью, нами были проведены исследования по влиянию высокого давления на свойства глобулярных белков в системах с относительно низким содержанием сухих веществ (<10%). Это, в первую очередь, позволит определить степень изменения вторичной структуры, связанной с частичной или полной денатурацией. На основании анализа априорной информации по применению высокого давления, параметров обработки аналогичных белковых систем, в т.ч. глобулярных белков, а также с учетом предварительных исследований высококонцентрированных белковых композиций нами были выбраны следующие технологические параметры: давление (600 ± 0,2) МПа; продолжительность обработки (15±1) мин; температура обработки (22±2) °С [2].

В качестве функциональной белковой составляющей нами выбраны составляющие сывороточных белков – иммуноглобулины и альбумины. Было изучено влияние высокого гидростатического давления на степень денатурации конденсированных образцов белка с помощью методов дифференциальной сканирующей калориметрии и ИК-спектроскопии [2]. Экспериментальные данные показали, что обработка высоким давлением проявляла частичный эффект на морфологию и вторичную структуру сывороточных белков. Было высказано предположение, что данное явление связано с отсутствием свободных SH-групп, и относительно высокой молекулярной массой иммуноглобулина, тогда как стабильность к высокому давлению сывороточного альбумина обусловлено наличием 17 дисульфидных групп в молекуле.

Таким образом, проведенные исследования показывают перспективы в создании инновационных функциональных продуктов за счет обработки высоким давлением сывороточных белков, которые потом используются в качестве замены термически обработанных концентратов и изолятов. Сывороточные белки, обработанные высоким давлением, были использованы для модификации технологических и сенсорных свойств молочных продуктов (молока питьевого, кисломолочных напитков, десертов), а также при экспериментальных выработках сухих завтраков, каш и батончиков.

Литература.
Банникова, А. В., Евдокимов И.А. Инновационные технологии функциональных продуктов с применением высокого давления для сохранения нативной структуры белков / А.В. Банникова, И.А. Евдокимов // Молочнохозяйственный вестник. - 2016. - № 2 (22). - С. 67-76.
George, P. Effect of high hydrostatic pressure on structural properties and bioactivity of immonoglobulins extracted from whey protein / P. George, A. Bannikova, N. Mantri, S. Kasapis, M. Palmer & B. Meurer // Food Hydrocolloids. – 2013. – 32. – P. 286-293.

MODERN APPROACH IN BIOTECHNOLOGY OF PROTEIN INGREDIENTS WITH RETENTION OF THEIR NATIVE STRUCTURE

Bannikova A.V.[1], Evdokimov IA[2], DSc, professor

[1]Saratov State Agrarian University. Saratov, Russia
410005, Saratov, ul. Bolshaya Sadovaya 220
[2]North-Caucasian Federal University
355009, Stavropol, Pushkin Street 1

The study describes the effect of high pressure on the secondary conformation of whey proteins. It is shown that this method may create a protein structure with native conformation in condensed systems, which is the basis for the development of functional protein ingredients.

Key words: proteins native conformation, denaturation, high pressure

Over the past two decades, high pressure treatment has been shown as a method of preserving the food against microbiological spoilage, but this method may change the physical and functional properties of food systems [1, 2]. Control of temperature in the high pressure treatment process is an important factor in the modification of some properties of products, including stability of protein, fat, transition to gel or crystalline state, as well as a uniform pressure distribution in order to inactivate undesirable microorganisms and enzymes [2].

Given that the high pressure is nonthermal innovative technology to obtain food with improved functionality, the influence of high pressure on the properties of globular proteins in systems with relatively low dry matter (<10%) was studied. In the literature to date there is no molecular understanding on the structural and functional properties of globular proteins subjected to high pressure. Thus, the purpose of this work was to evaluate the effect of high pressure on the secondary conformation of globular proteins at higher concentrations. This primarily allow to determine the changes in the degree of secondary structure associated with partial or complete denaturation. Based on the analysis of information on the utilizing the high pressure and processing parameters on similar protein systems, including globular proteins as well as the preliminary studies of highly concentrated protein formulations, the following process parameters have been chosen: the pressure (600 ± 0,2) MPa; the duration of treatment (15 ± 1) min; treatment temperature (22 ± 2) ° C [2].

The functional protein component of this study was selected to be whey proteins - albumin and immunoglobulins. The effect of high hydrostatic pressure on the degree of denaturation of protein samples was estimated using methods of differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy [2]. Experimental data showed that treatment of high pressure results in partial effect on the secondary structure and morphology of whey proteins. It has been suggested that this phenomenon of immunoglobulin stability is due to a lack of free SH-groups and a relatively high molecular weight, while the structure of serum albumin was maintained under high pressure due to the presence of 17 disulfide groups in the molecule.

Thus, our studies show a perspectives in the development of innovative products using high pressure treatment which are then used as a substitute for the heat-treated concentrates and isolates. Whey proteins treated with high pressure may be used to modify the sensory properties and processing of dairy products (dairy beverages, desserts) as well as in cereals and bars.

References:
1. Bannikova, A.V., Evdokimov I.A. Innovative technology of functional products using high pressure to preserve the native structure of proteins / A.V. Bannikova, I.A. Evdokimov // Molochnohosyastvenny vestnik. - 2016. - № 2 (22). - S. 67-76.
2. George, P. Effect of high hydrostatic pressure on structural properties and bioactivity of immonoglobulins extracted from whey protein / P. George, A. Bannikova, N. Mantri, S. Kasapis, M. Palmer & B. Meurer // Food Hydrocolloids . - 2013 - 32. - P. 286-293.

УДК 615.664.54:06

НОВЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ ТОКСИЧНЫХ ПИЩЕВЫХ КОНТАМИНАНТ

Урусов А.Е., Петракова А.В., Таранова Н.А., Кузнецова Д.А., Губайдуллина М.К., Жердев А.В, Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект 33
e-mail: urusov.alexandr@gmail.com

Предложены новые схемы высокочувствительного иммунохроматографического анализа. Изменены геометрия движения жидкостей на тест-полоске, состав и порядок формирования детектируемых комплексов. На примерах детекции микотоксинов в экстрактах зерновых продуктов показано, что данные подходы обеспечивают более чем 100-кратное снижение предела обнаружения, рост детектируемого сигнала и воспроизводимости анализа, сокращение расхода иммунореагентов. При этом сохраняются основные преимущества иммунохроматографии: простота использования, стабильность при хранении и возможность визуальной оценки результатов.

Ключевые слова: иммунохроматография, микрофлюидика, тест-полоски, микотоксины, реакция антиген-антитело.

Иммунохроматографические тест-полоски, совмещая простоту анализа, низкую стоимость и визуальную оценку результатов, часто уступают традиционным иммунохимическим и физико-химическим аналитическим методам по чувствительности. Нами предложен и охарактеризован ряд новых методических решений, позволяющих преодолеть это ограничение.

Осуществлена замена традиционных конъюгатов специфических антител с окрашенной наночастицей на свободные специфические антитела, а метка в этом случае вводится через антивидовые антитела или биотин-стрептавидин. Данный подход позволяет существенно повысить чувствительность конкурентной иммунодетекции и сократить расход специфических иммунореагентов. На примере системы определения зеараленона достигнут предел обнаружения 50 пг/мл (в традиционной схеме анализа – 1 мкг/мл), а расход специфических антител составил 10 нанограммов на тест.

Для управления скоростью движения и локальной концентрацией иммунореагентов применено лазерное травление микрофлюидных каналов на рабочей нитроцеллюлозной мембране тест-полоски. Это позволяет изменять как ширину потока, так и его направление, благодаря чему достигается 5-кратное увеличение чувствительности теста.

В рамках конструкции традиционной тест-полоски подобраны концентрации иммунореагентов, при которых происходит инвертирование контрольной и аналитической зоны: с иммобилизованным антигеном меченые антитела связываются всегда (тестовая зона становится контрольной), а интенсивность окрашивания контрольной линии определяется содержанием антигена в пробе (контрольная зона становится тестовой). В результате предел детекции тест-системы значительно снижается, для микотоксина дезоксиниваленола – в 100 раз по сравнению с традиционной схемой анализа (с 200 до 2 нг/мл).

Показано, что разработанные системы обеспечивают полноту выявления микотоксинов в препаратах кукурузы не ниже 90% при времени анализа 15 минут и возможности его проведения во внелабораторных условиях, что свидетельствует о перспективности предложенных подходов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-08-07913_а.

NEW APPROACHES FOR HIGHLY SENSITIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DETECTION OF TOXIC FOOD CONTAMINANTS

Urusov A.E., Petrakova A.V., Taranova N.A., Kuznecova D.A., Gubaidullina M.K., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology, Russian Acad. Sci., Moscow, Russia
Leninsky prospect 33, 119071 Moscow
e-mail: urusov.alexandr@gmail.com

New schemes for highly sensitive immunochromatographic assay are proposed. Geometry of the liquid's movement at the test strip was changed in these schemes, as well as the composition of detectable complexes and the procedure of their forming . Detection of mycotoxins in cereal extracts demonstrated as example that these approaches provided more than 100-fold reduction in the limit of detection, the increasing of detected signal and the reproducibility of the analysis, and the reduction of immunoreagents use. At the same time all main advantages of immunochromatography, such as easy use, storage stability and possibility of visual results evaluation are stored.

Key words: immunochromatography, microfluidics, test strips, mycotoxins, antigen-antibody reaction

Immunochromatographic strips, combining ease of analysis, low cost, and visual assessment of the results, are often inferior to common immunochemical and physic-chemical analytical methods in sensitivity. We have proposed and characterized a number of new methodological solutions to overcome this limitation.

Commonly used specific antibodies conjugated to gold nanoparticles were replaced with a combination of native specific antibodies and secondary (antispecies) antibodies conjugated or streptavidin to gold nanoparticles. This approach improves the sensitivity of a competitive immunodetection significantly and reduces the consumption of specific immunoreagents. In the example of test system for zearalenone, a detection limit of 50 pg/ml was reached (in the traditional scheme of analysis it was equal to 1 ug/ml), and the consumption of specific antibody was 10 ng per test.

To control the speed of movement and local concentration of immunoreagents, laser etching of microfluidic channels in the working nitrocellulose membrane of the test strips was used. This approach makes it possible to change width of the flow and its direction, thus achieving five-fold increase in the test sensitivity.

Within the structure of traditional test strip concentrations of immunoreagents were selected at which control and analytical zones were inversed: labeled antibodies bind always the immobilized antigen (test zone becomes a control one) and the intensity of the control line dyeing is determined content of the antigen in the sample (control zone becomes a test one). As a result, the detection limit of the test system is significantly reduced; for mycotoxin deoxynivalenol – in 100 times in comparison with traditional analysis (2 vs 200 ng/ml).

The developed systems shown fullness (not lower than 90%) detection of mycotoxins in corn preparations at 15 minutes and the possibility of its holding in non-laboratory conditions. These characteristics indicate the prospects of the proposed approaches.

This work was supported by the RFBR grant No 15-08-07913_a.

УДК 613.26:575.113+57.08:57.088

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ГМ КАРТОФЕЛЯ В ФОРМАТЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Тышко Н. В., Голомидова А. К., Садыкова Э. О., Шестакова С. И., Французов П. А., Никитин М. М., Батурин А. К.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия 109240, Москва, Устьинский проезд, дом 2/14
e-mail: tnv@ion.ru

Разработаны тест-системы для выявления ГМ картофеля методом ПЦР. Подобраны оптимальные условия проведения ПЦР в реальном времени для выявления генетических маркеров p35S, tNOS, pFMV, cry3A, cp4 epsps, tE9 и nptII.

Ключевые слова: ГМ картофель; полимеразная цепная реакция (ПЦР); методы выявления ГМО; референтный образец; генетический элемент.

Были разработаны тест-системы для выявления ГМ картофеля методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией на основе маркеров p35S, tNOS, pFMV, cry3A, cp4 epsps, tE9 и nptII.

Также были апробированы система праймеров и зонд на видоспецифичный ген УГФ-глюкозопирофосфорилазы (UGPase) картофеля.

Подбор праймеров осуществляли при помощи программы Oligo 6, специфичность праймеров проверяли с использованием базы данных BLAST.

Отработку методов выявления ГМ картофеля проводили с использованием референтных образцов, содержащих следующие генетические элементы:

- образец 1 – гены cry3A, cp4 epsps и nptII, промоторы pFMV и p35S, терминаторы tNOS и tE9;

- образец 2 – гены cry3A и nptII, промотор pFMV, терминатор tNOS;
- образец 3 – гены cry3A и nptII, промотор pFMV, терминатор tNOS.

Для подбора оптимальных условий проведения ПЦР в реальном времени были отработаны состав реакционной смеси (концентрация праймеров, зондов, Taq-полимеразы, Mg2+) и программа амплификации (температура отжига праймеров, продолжительность каждого шага в одном цикле, количество циклов, длительность предварительной денатурации).

Концентрации компонентов, входящих в реакционную смесь, варьировали в диапазонах:
- смесь праймеров от 2 до 5 пМ/мкл;
- концентрация зонда от 1 до 5 пМ/мкл;
- Taq-полимераза: от 0,5 до 5 ед. на пробу;
- концентрация ионов Mg2+ от 1,5 до 6 мМ.

В результате, оптимальным был признан следующий состав смеси (общим объемом 25 мкл): 2,5 мкл ×10 ПЦР-буфера (2,5 мМ Mg2+), 1 мкл смеси дНТФ (10 мМ), 3 мкл смеси олигонуклеотидов (5 пмоль/мкл каждого праймера и 2,5 пмоль/мкл зонда), 0,5 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл) и 13,5 мкл деионизованной воды, 5 мкл матрицы (ДНК);

Режим термоциклирования для ПЦР в пробирках оптимизировали по продолжительности каждого этапа реакции (денатурация: от 1,5 до 5 мин; отжиг/амплификация: от 30 до 80 с), а также по температуре отжига/амплификации (от 58 до 62 ºС).

В результате, оптимальным был признан следующий режим термоциклирования: 94 ºС 3 мин; 45 циклов: 94 ºС 15 с, 59 ºС 60 с.

Для проведения ПЦР использовали 6-канальный амплификатор нуклеиновых кислот в режиме реального времени «Rotor-Gene 6000» с широким спектром возбуждения и детекции флюоресценции.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №16-16-04123.

THE DEVELOPMENT OF METHODS FOR GM POTATO DETECTION IN THE FORMAT OF POLYMERASE CHAIN REACTION

Tyshko N. V., Golomidova A. K., Sadykova E. O., Shestakova S. I, Frantcuzov P. A., Nikitin M. M., Baturin A. K.

Federal State Institution of Science «Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety» Moscow, Russia 109240 Moscow, Ustinsky Proezd, 2/14

The test system for GM potato PCR detection has been developed. There were carried out an optimum conditions for identifying of genetic markers p35S, tNOS, pFMV, cry3A, cp4 epsps, nptII and tE9.

Key words: GM potatoes; polymerase chain reaction (PCR); GMOdetection methods; reference material; genetic markers.

The test-system for GM potato PCR detection with hybridization and fluorescence revealing of genetic markers p35S, tNOS, pFMV, cry3A, cp4 epsps, nptII and tE9 has been developed.

Also the system of primers and probe for gene UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) potatoes was tested. The selection of primers was performed with using of the program Oligo 6, the specificity of primers was checked with the use of BLAST database.

The development of methods for GM potato detection was performed with the use of reference material which contain the following genetic elements:
- sample 1 – cry3A, cp4 epsps and nptII genes, pFMV and p35S promoters, tNOS and tE9 terminators;
- sample 2 – cry3A and nptII genes, pFMV promoter, tNOS terminator;
- sample 3 – cry3A and nptII genes, pFMV promoter, tNOS terminator.

For the real-time PCR optimal conditions selection the composition of the reaction mixture (concentration of primers, probes, Taq polymerase, Mg2+) and the amplification program (primer annealing temperature, the duration of each step in one cycle, number of cycles, the duration of pre-denaturation) has been worked out.

The concentration of the reaction mixture components was varied in the following ranges:
- a mixture of primers from 2 to 5 pM/µl;
- the concentration of the probe from 1 to 5 pM/µl;
- Taq polymerase from 0.5 to 5 U per sample;
- the concentration of Mg2+ from 1.5 to 6 mm.

As a result of the mix composition (total volume 25 µl) which includes 2.5 µl of ×10 PCR buffer (2.5 mM

Mg2+), 1 µl of the mixture dNTP (10 mM), 3 µl mix of oligonucleotides (5 pmol/µl of each primer and 2.5 pmol/µl of probe), 0.5 µl Taq polymerase (5 U/µl) and 13.5 µl of deionized water, 5 µl of the matrix (DNA) was admitted as optimal

The thermocycling mode for PCR in test tubes was improved for the duration of each stage of the reaction (denaturation: from 1.5 to 5 min; the annealing/amplification: from 30 to 80 sec.), and the temperature of the annealing/amplification (from 58 to 62 ºC).

As a result the following thermocycling mode 94 ° C 3 min; denaturation 94 ° C 3 min; denaturation – 94 ° C 15 sec. and primer annealing – 59° C 60 sec. (45 cycles).

The 6 channels real-time analyser PCR «Rotor-Gene 6000» with a wide of range excitation and fluorescence detection was used for the research.

The project was funded by the Russian Science Foundation grant № 16-16-04123

УДК 577.1; 577.1.08; 31.19.29

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОГО КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕТА-АГОНИСТОВ

Зверева Е.А., Колосова А.Ю., Шпакова Н.А., Еремин С.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д.33
e-mail: zverevaea@yandex.ru

Разработаны методы поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для детекции бета-агонистов (рактопамин, сальбутамол, кленбутерол) в продуктах питания. Методы апробированы для контроля контаминации мясной продукции.

Ключевые слова: Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, бета-агонисты, продукты питания

Агонисты бета-адренорецепторов (бета-агонисты) в настоящее время активно используются в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных животных и птицы. Однако неконтролируемое поступление соединений этой группы в организм человека с мясными продуктами может приводить к нарушениям обмена веществ и рискам сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим востребованными становятся методы контроля пищевой продукции на наличие бета-агонистов.

В работе реализовано сочетание гомогенного иммуноанализа, характеризующегося высокой экспрессностью, и применения флуоресцентных маркеров для высокочувствительной детекции. Разработаны методы поляризационного флуоресцентного иммуноанализа рактопамина, кленбутерола, сальбутамола. Так, анализ рактопамина характеризовался пределом обнаружения 1.5 нг/мл и диапазоном определяемых концентраций 3–60 нг/мл, что удовлетворяет требованиям санитарно-гигиенического контроля. Продолжительность тестирования – 10 мин; проведение анализа не требует стационарного оборудования. Показана возможность использования разработанных методов для тестирования мясных продуктов; проведена сравнительная оценка эффективности различных способов пробоподготовки. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения разработанных методов для обеспечения безопасности пищевой продукции.

UDK 577.1; 577.1.08; 31.19.29

FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY FOR THE RAPID CONTROL OF BETA-AGONISTS

Zvereva E.A., Kolosova A.U., Shpakova N.A., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky prospect, 33
e-mail: zverevaea@yandex.ru

The methods were developed for fluorescence polarization immunoassay of beta-agonists (ractopamine, salbutamol, clenbuterol) in food. The possible application of the developed FPIA was demonstrated with testing of meat products.

Key words: Fluorescence polarization immunoassay, beta-agonists, food

Currently agonists of beta-adrenoreceptors (beta-agonists) are widely used as growth promoters in livestock and poultry. However, an uncontrolled flow of the compounds of this group in the human body with meat products can lead to metabolic disorders and risks of cardiovascular diseases. In this connection methods of food control for the presence of beta-agonists are demanded.

In the present work a homogeneous immunoassay characterized by the high rapidity was combined with the use of fluorescent markers for the highly sensitive detection. The methods of fluorescence polarization immunoassay for ractopamine, clenbuterol, salbutamol were developed. Thus, the ractopamine assay was characterized by a detection limit of 1.5 ng/mL and a range of detectable concentrations of 3–60 ng/mL, which were in accordance with the requirements of sanitary controls. The assay duration was 10 min; it did not require the use of stationery equipment. The possibility of the developed methods application for meat products testing was demonstrated; of the effectiveness of different methods of sample preparation was comparatively evaluated. The results indicate the prospects of application of the developed methods to ensure food safety.

УДК 544.3.03:544.032: 544.77

КОМПОЗИЦИОННЫЕ ПИЩЕВЫЕ ИНГРЕДИЕНТЫ НА ОСНОВЕ БИОПОЛИМЕРОВ, БИОАКТИВНЫХ ЛИПИДОВ И РАСТИТЕЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ: ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ

Зеликина Д. В., Антипова А.С., Мишарина Т. А., Пальмина Н. П., Мартиросова Е. И., Семёнова М.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ);
119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.
e-mail.: dusman.05@mail.ru

Разработаны композиционные пищевые ингредиенты, включающие биологически активные липиды, содержащие эквимассовые комбинации ω-3 и ω-6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК: смеси индивидуальных ω-3 и ω-6 ПНЖК, а также ω-3 и ω-6 ПНЖК из фосфолипидов и триглицеридов), а также пищевые биополимеры и растительные антиоксиданты для обогащения продуктов питания с низким содержанием жира адекватным количеством незаменимых ПНЖК. Оценка структурных параметров композиционных частиц позволила предположить механизмы их формирования и функциональности в водной среде.

Ключевые слова: пищевые композиционные ингредиенты функционального назначения, биологически активные липиды, полиненасыщенные жирные кислоты, пищевые биополимеры, растительные антиоксиданты, структура, функциональные свойства.

В целях обогащения продуктов питания с низким содержанием жира эссенциальными ω-3 и ω-6 ПНЖК были разработаны композиционные ингредиенты на основе натуральных и широко используемых в пищевой технологии биополимеров и липидов (казеината натрия, картофельного мальтодекстрина, соевых фосфолипидов, масла льна), обогащённых до эквимассового уровня альфа-линоленовой и линолевой жирными кислотами, с добавлением и без добавления эфирного масла гвоздики. Для сформированных композиционных супрамолекулярных частиц были установлены основные взаимосвязи их общей (массы, размеров, архитектуры, плотности, заряда) и локальной (состояние инкапсулированных липидов) структуры с такими основными функциональными свойствами, как растворимость в водной среде, защита ПНЖК от окисления и контролируемая доставка ПНЖК в желудочно-кишечном тракте in vitro. Предложены молекулярные механизмы формирования таких частиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 14-16-00102.

УДК 544.3.03:544.032: 544.77

COMPOSITE FOOD INGREDIENTS BASED ON BYOPOLYMERS, BIOACTIVE LIPIDS AND PLANT ANTIOXIDANTS: CORRELATIONS BETWEEN STRUCTURE AND FUNCTIONALITY

Zelikina D.V., Antipova A.S., Misharina T.A., Palmina N.P., Martirosova E.I., Semenova M.G.

N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences;
119334, Moscow, Kosygin str, 4.
e-mail.: dusman.05@mail.ru

Composite food ingredients, containing bioactive lipids, having the equimass combinations of ω-3 and ω-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs: mixtures of individual ω-3 and ω-6 PUFA, as well as PUFAs from phospholipids, and triglycerides) along with food biopolymers and plant antioxidants were developed for the fortification of the low-fat foods by the adequate amount of the essential PUFAs. Both the mechanisms of the particles formation and the basis of their functionality in an aqueous medium were suggested according to the structural parameters of the particles found.

Key words: composite functional food ingredients, bioactive lipids, polyunsaturated fatty acids, food biopolymers, plant antioxidants, structure, functional properties

In order to enrich low-fat foods with the essential ω-3 and ω-6 polyunsaturated fatty acids the compositional ingredients, based on both the natural and widely used in a food industry biopolymers and lipids (such as sodium caseinate, potato maltodextrin, soy phosphatidylcholine, flaxseed oil), in addition fortified up to the equimass amount of ω-3 and ω-6 PUFAs by the individual alfa-linolenic and linoleic fatty acids, were designed in the presence and absence of the essential oil of clove. The key relationships between both the total (molar mass, size, architecture, density, charge) and the local (molecular organization of the encapsulated lipids) structure of the formulated composite supramolecular particles and their basic functionality (such as solubility in an aqueous medium, protection of the PUFAs against oxidation, and the controlled delivery of the PUFAs in the gastrointestinal tract in vitro) have been established. The molecular mechanisms of the composite particles formation have been suggested.

This work was financially supported by the Russian Scientific Foundation, grant 14-16-00102.

УДК 637.524

ФУНКЦИОНАЛЬНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЫРОКОПЧЕНЫХ КОЛБАС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН

Неупокоева А.С. [2], Миколайчик И.Н.[2], Морозова Л.А. [2], Ильтяков А.В. [2], Прянишников В.В.[1]

ЗАО «Могунция-Интеррус» г. Москва, Россия
ФГБОУ ВО «Курганская государственная сельскохозяйственная академия имени Т.С. Мальцева»
г. Курган, Россия
641300, Курганская область, с. Лесниково
E-mail: min_ksaa@mail.ru

Введение 1% пшеничной клетчатки «Витацель WF 400» в полидисперсную фаршевую систему благоприятно влияет на его функционально-технологические свойства, а именно увеличивается влагосвязывающая способность на 1,68%, усиливается динамика снижения уровня pH до 4,8 ед., снижается массовая доля влаги в процессе сушки сырокопченых колбас на 2,48%, улучшая ее органолептические показатели.

Ключевые слова: сырокопченая колбаса «Салями элитная», пшеничная клетчатка «Витацель WF 400» функционально-технологические свойства.

Особенности питания современного человека и широкое распространение высокорафинированных пищевых продуктов постепенно привели к дефициту в питании грубоволокнистых балластных веществ.

Отсутствие пищевых волокон в рационе может вызвать развитие ряда заболеваний пищеварительной и эндокринной системы [1-4].

Были исследованы два образца сырокопченой колбасы: контрольный образец – сырокопченая колбаса «Салями элитная», приготовленная по традиционной технологии и опытный образец – сырокопченая колбаса «Салями элитная», обогащенная пшеничной клетчаткой «Витацель WF 400». Исследования проводились на МПП «Велес».

В соответствии с рекомендуемым уровнем введения пшеничной клетчатки в мясные продукты мы заменили в рецептуре сырокопченой колбасы «Салями элитная» 1% мясного сырья (свинину нежирную) на 1% пшеничной клетчатки «Витацель WF 400».

Клетчатка «Витацель WF 400» использовалась в сухом виде. Ее вносили на нежирное сырье после введения нитритной соли на первую стадию куттерования.

С целью изучения влияния «Витацель WF 400» на функционально-технологические свойства были исследованы два образца модельных фарша. В результате проведенных исследований установлено, что контрольный образец модельного фарша по ВСС превосходит опытный с добавлением пищевых волокон «Витацель WF 400». Показатель ВСС опытного образца имеет тенденцию к снижению по сравнению с контрольным образцом на 1,68%.

Наиболее важными показателями, характеризующими скорость процесса созревания сырокопченых колбас, является величина pH и содержание влаги в продукте. Так, исследования физико-химических свойств свидетельствуют о том, что введение в мясное сырье «Витацель WF 400» приводит к более выраженному изменению величины pH в модельном фарше опытного образца по сравнению с контролем. Анализ уровня pH фарша свидетельствует о накоплении органических кислот и через 120 часов ферментации pH снижается до 4,8 единиц.

В процессе сушки, наиболее выраженное обезвоживание отмечено в опытном образце. Значение данного показателя достигло регламентированных требований на 26 день сушки, в то время как в контрольном массовая доля влаги снижалась менее активно, и достигла регламентируемого уровня лишь на 30 сутки.

В ходе дегустации было установлено, что колбаса сырокопченая «Салями элитная», обогащенная пшеничной клетчаткой «Витацель WF 400» по органолептическим качествам превосходит контрольный образец.

Литература.
Технологические основы переработки мяса: учебное пособие / Миколайчик И.Н., Морозова Л.А., Ильтяков А.В. [и др.]. – Курган: изд-во Курганской ГСХА, 2016. – 366 с.
Прянишников В.В. Пищевые волокна «Витацель» в мясной отрасли // Мясная индустрия. – 2006. – №9. – С. 43.
Прянишников В.В. Пищевая клетчатка в инновационных технологиях мясных продуктов // Пищевая промышленность. – 2011. – №5. – С. 20-21.
Теория и практика переработки мяса / Лисицын А.Б., Липатов Н.Н., Кудряшов Л.С. [и др.]. – М.: ВНИИМП. – 2004. – 378 с.

УДК 637.524

FUNCTIONAL AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF SMOKED SAUSAGES REINFORCED WITH DIETARY FIBER

Neupokoyeva A. S. [2], Mikolaychik I. N.[2], Morozova L. A.[2], Iltyakov A. V.[2],Pryanishnikov V. V.

«Moguntia-Interrus», Moscow, Russia
Kurgan State Agricultural Academy by T.S. Maltsev, Russia
Kurgan, Russia
641300, Kurgan region, with Lesnikovo,
E-mail: min_ksaa@mail.ru

Introducing «Vitacel WF 400» wheat fiber into a polydisperse system of mincemeat at a 1% concentration has a positive effect on the functional and technological properties of that system. These positive effects include an increase in water-binding capacity by 1.68%, an enhancement of the pH lowering dynamics to 4.8 units, a reduction in the moisture mass fraction throughout the drying process of smoked sausage by 2.48%, and an improvement of the organoleptic properties of the sausage.

Key words: smoked sausage «Salami elite», wheat fiber «Vitacel WF 400», functional and technological properties.

The peculiarities of modern nutrition trends and the wide-spread availability of highly refined foods have gradually led to a shortage of dietary fiber in the diet of an average person. This shortage of dietary fiber is

associated with the development of numerous diseases pertaining to the digestive and endocrine systems [1-4].

Two varying smoked sausage products were subject to an investigation: a control sample – smoked sausage «Salami elite», prepared according to the traditional recipe, and a prototype sample – smoked sausage «Salami elite», enriched with «Vitacel WF 400» wheat fiber. This research was conducted at «Veles».

In compliance with the recommended level of wheat fiber content in meat products, we have altered the recipe of the smoked sausage «Salami elite» by substituting 1% of the lean pork with «Vitacel WF 400» wheat fiber.

«Vitacel WF 400» wheat fiber was implemented in its dry form. It was introduced to the raw meat system after the introduction of the nitrite salt during the first stage of mincing.

To study the influence of the «Vitacel WF 400» wheat fiber on the functional and technological properties of a mincemeat system, two different mincemeat systems were subject to the investigation. Based on the results of the water binding capacity criteria, it was established that the control sample was more superior to the prototype sample by 1.68%.

However, the more important indicators by which efficacy of the sausage preparation processes is judged are the pH level and the moisture content of the product. In this case, the study of the physical and chemical properties of the two sample types indicate that introduction of the «Vitacel WF 400» wheat fiber to the raw meat system yields a more pronounced decrease in the pH level within the prototype sample as compared to the control sample. A temporal pH analysis indicates an initial accumulation of organic acids followed by a reduction in the pH level to 4.8 units after 120 hours of fermentation.

In the process of drying, a more pronounced level of dehydration was observed for the prototype sample (Figure 1). For this sample, the appropriate level of dehydration was achieved by the 26th day of the drying process, whereas the same level of dehydration for the control sample was achieved only by the 30th day, due to a lower rate of moisture content loss.

During degustation, it was determined that the smoked sausage «Salami elite» enriched with «Vitacel WF 400» wheat fiber is more superior to the control sample in relation to its organoleptic properties.

References:
Technological bases of processing of meat: a tutorial / Mikolaychik, I. N., Morozova L. A., Iltyakov A. V., et al. – Kurgan: publishing of Kurgan State Agricultural Academy, 2016 – p. 366.
Pryanishnikov V. V. Dietary Fiber «Vitatsel» in the meat industry // Meat industry – 2006 – №9. – p. 43.
Pryanishnikov V. V. Dietary fiber in innovative technologies of meat products // Food processing industry – 2011 – №5 – pg. 20-21.
Theory and practice of processing meat / Lisicin A. B., Lipatov N. N., Kudryashov L. S., et al. – M. - 2004 – p. 378.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 577.1; 577.1.08; 31.19.29

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ПРЯМОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ ЗАВИСИМОСТЬЮ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЗОКРАСИТЕЛЯ СУДАН I

Берлина А.Н., Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект, д.33
e-mail: berlina.anna@gmail.com

Разработана иммунохроматографическая тест-система с прямой калибровочной зависимостью для селективного определения судана I в продуктах питания. При отсутствии аналита в пробе наблюдается отсутствие полосы в тестовой зоне, при добавлении и повышении его концентрации появляется заметное окрашивание.

Ключевые слова: судан I, азокраситель, антитела, конъюгат, иммунохроматографический анализ

Применение азокрасителей группы судана в пищевой промышленности запрещено вследствие ранее

обнаруженных токсических эффектов. Нелегальное использование судана I недобросовестными производителями требует разработки методик для его обнаружения и количественного определения. Основными преимуществами иммунохроматографического анализа (ИХА) являются быстрота, возможность количественной детекции, простота проведения анализа.

Для разработки конкурентного ИХА были синтезированы два конъюгата коллоидного золота методом физической адсорбции (а) со специфическими к судану I моноклональными антителами и (б) с конъюгатом судан-овальбумин. Основным отличием данного метода от ранее разработанных в нашей лаборатории методик конкурентного ИХА, когда интенсивность окрашивания тестовой зоны иммунохроматографической мембраны обратно пропорциональна концентрации аналита, является наличие прямой зависимости сигнала от содержания аналита в пробе. Оптимизация соотношения синтезированных иммунореагентов позволила снизить предел визуального обнаружения судана I до 0,25 нг/мл, а предел инструментального определения до 7,6 пг/мл, время анализа составило менее 15 мин.

Полученные данные демонстрируют перспективность метода ИХА, а также возможность повышения чувствительности, что крайне важно в случае анализа пищевых проб на содержание запрещенных препаратов и контаминант.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 14-03-00753_а.

UDK 577.1; 577.1.08; 31.19.29

DEVELOPMENT OF LATERAL FLOW IMMUNOASSAY WITH A DIRECT CALIBRATION DEPENDENCE FOR THE DETERMINATION OF AZO DYE SUDAN I

Berlina A.N., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
119071, Moscow, Leninsky prospect, 33
e-mail: berlina.anna@gmail.com

Lateral flow immunoassay with a direct calibration dependence for the selective determination of Sudan I in food was developed. In the absence of analyte in a sample there is no test line in the test area, while adding and increasing of analyte concentration induces noticeable coloration.
Key words: Sudan I, azo dye, antibody, conjugate, lateral flow immunoassay

The use of Sudan azo dyes in the food industry is prohibited due to previously detected toxic effects. The illegal use of Sudan I by unscrupulous manufacturers requires the development of techniques for its detection and quantitation. The main advantages of lateral flow immunoassay (LFIA) are the low duration, the possibility of quantitative detection, ease of analysis.

To develop competitive LFIA two colloidal gold conjugates have been synthesized by physical adsorption method (a) with the specific monoclonal antibody to Sudan I and (b) with Sudan-ovalbumin conjugate. The main difference of this method from the previously developed in our laboratory competitive LFIAs when the intensity of the coloration of the test zone of a membrane is inversely proportional to an analyte concentration, is a direct dependence of the signal on the analyte content in the sample. The optimization a ratio of the synthesized immunoreagents made possible to reduce the limit of visual detection Sudan I to 0.25 ng/mL, and the limit of instrumental determination to 7.6 pg/ml, the analysis time was less than 15 minutes.

These data demonstrate the promising LFIA methods, as well as the possibility of increasing the sensitivity, which is extremely important in the case of the analysis of food samples for prohibited substances and contaminants.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant number 14-03-00753_a.

УДК 544.3.03: 544.032: 544.77

PH ЗАВИСОМОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ КОМПЛЕКСОВ ХИТОЗАНА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ЛИПИДАМИ

Чеботарёв С.А.[1], Смотрова Н.В.[1], Ганзориг Г.[1], Антипова А.С.[2], Пальмина Н. П.[2], Богданова Н.Г.[2], Каспаров В.В.[2], Семёнова М.Г[2].

[1] Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9
[2] Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ), 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4
e-mail: smotrovanataliya@yandex.ru

Установлена pH зависимость функциональных свойств (растворимости в водной среде и защиты от окисления включённых в комплекс полиненасыщенных жирных кислот) комплексов хитозана с комбинацией биологически активных липидов (липосом фосфатидилхолина (ФХ), наполненных незаменимой (омега-3) алфа-линоленовой жирной (АЛК)).

Ключевые слова: полиненасыщенные жирные кислоты, хитозан, комплекс, функциональные свойства, структурные параметры

В настоящее время хитозан представляет большой интерес для молекулярного дизайна систем доставки нутрицевтиков на основе пищевых биополимеров в связи с уникальностью его свойств, во-первых, как природного катионного полисахарида (сополимера глюкозоамина и N-ацетил-глюкозоамина, pKa = 6.3) [1], и, во-вторых, как полисахарида, обладающего мукоадгезивной [2] активностью в желудочно-кишечном тракте, что может увеличивать усвоение различных нутрицевтиков.

Было найдено, что хитозан способен формировать водорастворимые и наноразмерные (≤ 400 нм по данным динамического светорассеяния) комплексы в широком диапазоне pH (от 2 до 6), с липосомами фосфатидилхолина (ФХ), наполненными незаменимой (омега-3) альфа-линоленовой кислотой (АЛК). При этом во всём изученном диапазоне pH такие комплексы имели достаточно высокий положительный заряд, что отражалось в величине их дзета-потенциала (≥ 30) и свидетельствовало о покрытии хитозаном наполненных АЛК липосом ФХ, которые в отсутствии хитозана в диапазоне pH от 5 до 2 частично теряли свою растворимость в водной среде (по литературным данным [3] изоэлектрическая точка липосом ФХ находится в районе pH = 4.15).

Данные электронно-парамагнитной-резонансной спектроскопии (ЭПР) указывают, что инкапсулирование наполненных АЛК липосом ФХ хитозаном, приводило, как правило, к некоторому увеличению времён вращательной корреляции τC1 и τC2 спинового зонда (16-доксилстеариновой кислоты), а следовательно микровязкости в бислоях наполненных липосом, что может быть связано с уплотнением бислоя за счет встраивания участков молекулы хитозана. Важно также отметить, что добавление определённых концентраций хитозана к комплексу казеината натрия с наполненными липосомами также способствовало формированию немного более вязкого и плотного слоя, что особенно проявлялось в возрастании τC2.

По данным количественной оценки образования первичных (гидроперекисей) и вторичных (кетодиенов и малонового диальдегида (МДА)) продуктов автоокисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), свободных и инкапсулированных хитозаном, (хранение при комнатной температуре и на свету) максимум защитных способностей хитозана по отношению к ПНЖК наблюдался в диапазоне pH от 2 до 4 включительно.

Литература.
1. Helgason T., Gislason J., McClements D. J., Kristbergsson K., Weiss J. Influence of molecular character of chitosan on the adsorption of chitosan to oil droplet interface in an in vitro dijestion model // Food Hydrololloids. 2009. № 23. P. 2243-2253.
2. Garcia-Fuentes M.,. Alonso M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand?//J Control Release. 2012. № 161. P. 496-504.
3. Brzozowska I., Figaszewski Z. A. The influence of pH on phosphatidylcholine monolayer at the air/aqueous solution interface// Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2003. № 27. P. 303-309.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 14-16-00102. Рабо-

та Ганзориг Г. поддерживалась финансово РХТУ им. Д. И. Менделеева. Каспаров В. В. участвовал в проведении измерений на приборе ((Bruker EMX spectrometer (Germany)) в центре коллективного использования научного оборудования ИБХФ РАН в рамках работ по госбюджетному финансированию.

UDK 544.3.03: 544.032: 544.77

PH DEPENDENCE OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE COMPLEXES OF CHITOSAN WITH BIOLOGICAL ACTIVE LIPIDS

Chebotarev S. A.[1], Smotrova N. V[1]., Ganzorig G.[1], Antipova A. S.[2], Palmina N. P.[2], Bogdanova N. G.[2], Kasparov V. V.[2], Semenova M. G.[2]

[1] D. I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Miusskaya sq., 9
[2] N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Kosygin str., 4
e-mail: smotrovanataliya@yandex.ru

pH dependence of the functional properties (solubility in an aqueous medium and protection against oxidation of the polyunsaturated fatty acids involved into the complex) of the complexes of chitosan with a combination of biologically active lipids (phosphatidylcholine liposomes (PC) loaded by the essential(omega-3) alpha-linolenic acid (ALA)) has been studied.

Key words: polyunsaturated fatty acids, alpha-linolenic acid, chitosan, complex, functional properties, structural parameters

By now chitosan is of great interest in the molecular design of the delivery systems for nutraceuticals, based on food-grade biopolymers, owing to its unique properties primarily, as a cationic polysaccharide (copolymer of N-acetyl-D-glucose amine and D-glucose amine) pKa = 6.3) [1], and, secondly, as a biopolymer having the mucoadhesive activity [2] in the gastrointestinal tract that can increase the absorption of nutraceuticals.

It was found that chitosan formed complexes with a combination of biologically active lipids (phosphatidylcholine liposomes (PC) loaded by the essential (omega-3) alpha-linolenic acid (ALA)), which were both soluble in an aqueous medium and nanosized (≤ 400 nm on the light scattering basis) in the wide range of pH (from 2 to 6). As this takes place these complexes have rather high positive charge in the whole range of the pH studied that is mirrored in the values of the Zeta-potential (≥ 30 mV). This result could be attributable to the chitosan covering of the PC liposomes loaded by ALA, which in the absence of the chitosan loses their solubility in an aqueous medium at acidic pH (2 <pH<5) (the isoelectric point of PC liposomes on the literature ground [3] is in the vicinity of pH = 4.15).

The ESRS data indicated that the complex formation of the PC liposomes, loaded by ALA, with chitosan, caused a slight increase in the rotational correlation times (τC1 and τC2) of the 16-doxylstearic acid radical (16-DSA was used as a spin probe) that, in turn, could indicate the slight increase in the microviscosity of the PC bilayers that could be attributed to the compaction of the bilayers due to the incorporation of the parts of the chitosan molecules into the PC bilayers. It is important to note here that an addition of specific concentration of chitosan to the complex of sodium caseinate with (PC + ALA) has led to the further increase in the in the rotational correlation times and especially in the τC2.

The conducted quantitative measurements of the primary (dienoic hydroperoxides) and secondary (cetodiens and malonic dialdehyde) products of the autooxidation (in a day light at room temperature) of both the involved into the complex particles with chitosan and free polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have shown the maximum of the chitosan protective ability in the range of pH from 2 to 4.

References:
1. Helgason T., Gislason J., McClements D. J., Kristbergsson K., Weiss J. Influence of molecular character of chitosan on the adsorption of chitosan to oil droplet interface in an in vitro dijestion model // Food Hydrololloids. 2009. № 23. P. 2243-2253.
2. Garcia-Fuentes M.,. Alonso M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand?//J Control Release. 2012. № 161. P. 496-504.
3. Brzozowska I., Figaszewski Z. A. The influence of pH on phosphatidylcholine monolayer at the air/aqueous solution interface// Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2003. № 27. P. 303-309.

This work was performed under the financial support of the Russian Science Foundation (Grant № 14-16-00102). Ganzorig G. has been supported financially by the D. I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia. Kasparov V. V. has performed measurements as an operator in the Center of the Collective use of the

scientific equipment (IBCP RAS): ESR ((Bruker EMX spectrometer (Germany)) in the framework of the state budget financing.

УДК 544.3.03: 544.032: 544.77

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСА ИЗОЛЯТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ С ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ

Ганзориг Г.[1], Ульянов Д.С.[1], Хурумова А. А.[1], Смотрова Н.В.[1], Антипова А.С.[2], Семёнова М.Г[2].

[1] Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9
[2] Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ), 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4
e-mail: gantuya_may@yahoo.com

Изучены функциональные свойства (растворимость в водной среде и защита от окисления включённых в комплекс полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК)) комплексов изолята сывороточных белков с эквимассовой комбинацией омега-6 и омега-3 ПНЖК (арахидоновой кислоты с докозагексаеновой (омега-3) или с алфа-линоленовой (АЛК) жирными кислотами).

Ключевые слова: полиненасыщенные жирные кислоты, изолят сывороточных белков, комплекс, функциональные свойства, структурные параметры

Одними из широко использующихся в разработке продуктов питания ингредиентов являются сывороточные белки молока. В нашей работе мы изучили функциональные свойства комплексов изолята сывороточных белков (основные компоненты: 54% β-лактоглобулина и 21% α-лактоальбумина; минорные компоненты: сывороточный альбумин, лактоферрин, иммуноглобулин) со следующей комбинацией омега-3 и омега-6 ПНЖК: (1) альфа линоленовая кислота (АЛК) + арахидоновая кислота (АК) и (2) докозагексаеновая кислота (ДКГ) + арахидоновая кислота (АК). При этом мы использовали, как нативный изолят сывороточных белков (ИСБн), так и предварительно прогретый при 600С (10 мин) (ИСБ60С).

Было найдено, что как ИСБн, так и ИСБ60С формировали водорастворимые и наноразмерные (≤ 180 нм и 140 нм по данным динамического светорассеяния) комплексы в нейтральной области pH = 7 с изученными комбинациями ПНЖК. При этом такие комплексы имели достаточно высокий отрицательный заряд, что отражалось в величине их дзета-потенциала (> - 28 мВ) и также способствовало их хорошей растворимости в водной среде (pH = 7.0, ионная сила = 0.001М).

Количественная оценка образования первичных (гидроперекисей) и вторичных (кетодиенов и малонового диальдегида (МДА)) продуктов автоокисления ПНЖК, свободных и инкапсулированных белком, (хранение при комнатной температуре и на свету) свидетельствовало о защите белком от окисления (на 20 день хранения) 75.2 - 83.3% (для комбинации АЛК + АК) и 79.2- 79.3% (для комбинации ДГК + АК) ПНЖК. При этом умеренно прогретый белок обладал немного более высокой долговременной защитной способностью, что, вероятно было связано с небольшим увеличением гидрофобности мест связывания на белке для ПНЖК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант 14-16-00102. Работа Ганзориг Г. и Хурумовой А. А. поддерживалась финансово РХТУ им. Д. И. Менделеева.

UDK 544.3.03: 544.032: 544.77

FUNCTIONAL PROPERTIES OF COMPLEXES OF WHEY PROTEIN ISOLATE WITH POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

Ganzorig G.[1], Ulyanov D.S.[1], Hurumova A.A.[1], Smotrova N. V[1]., Antipova A. S.[2], Semenova M. G.[2]

[1] D. I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Miusskaya sq., 9
[2] N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Kosygin str., 4
e-mail: gantuya_may@yahoo.com

Functional properties (solubility in an aqueous medium and protection against oxidation of the polyunsaturated fatty

acids (PUFAs) involved into the complex) of the complexes of whey protein isolate with an equimass combination of omega-3 and omega-6 PUFAs (alpha- linolenic acid (ALA)) + arachidonic acid (AA); docosahexaenoic acid (DHA) + arachidonic acid (AA)) have been studied.

Key words: polyunsaturated fatty acids, whey protein isolate, complex, functional properties, structural parameters

Whey milk proteins are among the widely used ingredients in the food formulation. In our work we have studied the functional properties of the complexes of the whey protein isolate (WPI) (the major WPI components are 54% β-lactoglobulin and 21% α-lactalbumin; the minor WPI components are serum albumin, lactoferrin, immunoglobulin) with the following combination of omega-3 and omega-6 PUFAs (alpha- linolenic acid (ALA)) + arachidonic acid (AA); docosahexaenoic acid (DHA) + arachidonic acid (AA)). As this take place, we have used both native (WPIn) and primarily heated (600C,10 min) (WPI60C) protein.

It was found that the both (WPIn) and (WPI60C) formed both the soluble in an aqueous medium and nanosized (≤ 180 and ≤ 140 nm, respectively, on the light scattering basis) complexes at neutral pH = 7.0 (ionic strength = 0.001M). As this took place these complexes had rather high negative charge that was mirrored in the values of the Zeta-potential (> - 28 mV).

The conducted quantitative measurements of the primary (dienoic hydroperoxides) and secondary (cetodiens and malonic dialdehyde) products of the autooxidation (in a day light at room temperature) of both the involved into the complex particles with WPI and free polyunsaturated fatty acids (PUFAs) have shown the protection of the PUFAs against oxidation (after 20 days of storage) 75.2 – 83.3% (for the combination ALA + AA) and 79.2 - 79.3% (for the combination DHA + AA). As this took place, the WPI60C demonstrated the higher protective ability that could be likely attributable to its higher hydrophobicity due to the partial denaturation of the globular proteins.

This work was performed under the financial support of the Russian Science Foundation (Grant № 14-16-00102). Ganzorig G. and Hurumova A.A. have been supported financially by the D. I. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia.

УДК 621.039.75

НОВЫЕ ВЭЖХ-МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В ЗЕРНОВОМ СУСЛЕ И БРАЖКЕ

Медриш М. Э., Абрамова И. М., Поляков В. А., Гаврилова Д. А., Павленко С. В.

«Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии» - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, Москва, ул. Самокатная, д. 4-б
e-mail: tehnohimkontrol@mail.ru

Разработана методика определения массовой концентрации углеводов и органических кислот в зерновом сусле и бражке с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Диапазон измерений массовой концентрации мальтозы, глюкозы, фруктозы - 0,001 – 40 г/дм3, уксусной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты – 0,001-50 г/дм3.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; сусло; бражка; углеводы; мальтоза; глюкоза; фруктоза; органические кислоты.

Современные технологии производства спирта из зернового сырья направлены на получение максимально возможного выхода готового продукта с хорошими органолептическими показателями. Актуальным направлением современных исследований является разработка метода анализа, который бы позволил упростить и удешевить процедуру определения сбраживаемых углеводов и органических кислот, обеспечить возможность постоянного мониторинга изменения состава углеводов и органических кислот зернового сусла при его сбраживании.

Использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением спектрофотометрического детектирования для определения содержания органических кислот и рефрактометрического детектирования для определения содержания углеводов позволяет проводить высокочувствительный и точный анализ зернового сусла и бражки.

Применение разработанных методик также позволяет прослеживать динамику изменения углеводного состава и состава органических кислот в зерновом сусле и бражке на всех стадиях технологического процесса производства спирта.

UDK 621.039.75

NEW HPLC METHODS FOR DETERMINING CARBOGIDRATES AND ORGANIC ACIDS IN GRAIN WORT AND MASH

Medrish M. E., Abramova I. M., Polyakov V. A., Gavrilova D. A., Pavlenko S. V.

All-Russian Research Institute of Food Biotechnology «- a branch of the Federal State budget institution of science of federal research centre of food, biotechnology and food safety, Moscow, Russia
111033, Moscow, Samokatnaya st., 4-b
e-mail: tehnohimkontrol@mail.ru

This work presents the method used for the determination of mass concentration of carbohydrates and organic acids in grain wort and mash using the method of high performance liquid chromatography. The measuring range of the mass concentration of maltose, glucose, fructose - 0.001 - 40 g/dm3, acetic acid, lactic acid, malic acid - 0.001-50 g/dm3.

Key words: high performance liquid chromatography; wort; mash; carbohydrates; maltose; glucose; fructose; organic acids.

Current ethanol production technology from grain raw materials directed at getting the maximum possible output of the finished product with high organoleptic characteristics. Thus, the actual direction of current research is to develop method of analysis, which would allow simplifying and reducing the cost of the procedure for determining fermentable carbohydrates and organic acids, providing possibility of continuous monitoring of changes in the composition of carbohydrates and organic acids in grain wort during fermentation.

Using high-performance liquid chromatography method with spectrophotometric detection for the determination organic acids content and refractometric detection for determination carbohydrate content allows high sensitivity and precision analysis of grain wort and mash.

Application the developed methods also allow to monitor the dynamics of changes in carbohydrate and organic acids composition in the grain wort and mash at all stages of the alcohol production process.

УДК 602.68:57.083

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИММУНОАНАЛИЗА СТРЕПТОМИЦИНА И ДИГИДРОСТРЕПТОМИЦИНА В ЖИВОТНОВОДЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Серченя Т.С., Широчина И.В., Свиридов О.В.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
220141, Минск, ул. академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.2
e-mail: serchenya@iboch.bas-net.by

Для технологий иммуноанализа антибиотиков стрептомицина и дигидрострептомицина в животноводческой продукции получены и охарактеризованы специфические антитела, проведено сравнительное исследование двух иммуногенов и продемонстрирована эффективность использования иммуногена на основе стрептомицина и модифицированного альбумина для получения высокоаффинных антител в короткие сроки.

Ключевые слова: поликлональные антитела, иммуноанализ, стрептомицин, дигидрострептомицин

Современная биотехнология разработки иммуноаналитических систем количественного определения антибиотиков в животноводческой продукции для ветеринарно-санитарного контроля, медицинского и экологического мониторинга включает получение и характеристику специфических иммунореагентов и

направлена на совершенствование средств иммунодиагностики. Характеристики применяемых антител играют чрезвычайно важную роль и обуславливают аналитические параметры самого метода определения низкомолекулярных соединений – селективность выявления конкретного антибиотика или их групповое распознавание, чувствительность и диапазон измерений.

В работе проведено сравнительное исследование иммуногенов и разработана эффективная технология получения антител к антибиотикам группы аминогликозидов – стрептомицину и дигидрострептомицину. Для получения антител проводили иммунизацию животных с применением двух иммуногенов, различающихся по полипептидному носителю гаптена и схожих по методу синтеза. В синтезе белковых конъюгатов стрептомицина с нативным и катионизированным (аминоэтиламидированным) альбумином человека использовали активированные эфиры карбоксиметилоксимов, полученных модификацией альдегидной группы антибиотика. Для каждого иммуногена было проведено 10 циклов иммунизации на трех животных. Динамику антителогенеза оценивали в твердофазном иммуноферментном анализе с иммобилизованным гетерологичным по белку конъюгатом стрептомицина. Установлено, что при применении иммуногена на основе нативного альбумина происходит постепенное нарастание титра специфических антител, в то время как иммунизация конъюгатом гаптена с катионизированным альбумином приводит к резкому и скачкообразному увеличение концентрации антител в антисыворотках. Так, уже после третьего введения иммуногена на основе катионизированного альбумина титр антител к стрептомицину составил 1:200 000 с дальнейшим нарастанием до 1:800 000. Эти результаты практически важны в случае массового производства иммунохимических тест-систем и для антигенов, характеризующихся трудностями в выделении и соответственно высокой стоимостью, например, микотоксинов. Полученные антитела к стрептомицину, конъюгированному с нативным и модифицированным альбумином, характеризуются идентичной и высокой специфичностью по отношению к стрептомицину и его ближайшему структурному аналогу дигидрострептомицину, но различаются аффинностью взаимодействия с антигеном. Перекрестная реактивность полученных антител с другими аминогликозидами, тетрациклинами, пенициллином, ампициллином и хлорамфениколом составила не более 0.01%. При применении конъюгата стрептомицина с альбумином, модифицированным этилендиамином, были получены антитела с более высокими значениями сродства к антибиотику. В условиях прямого конкурентного иммуноферментного анализа с использованием конъюгата стрептомицина с пероксидазой предел определения стрептомицина составил 0.04 нг/мл.

Таким образом, получены специфические антитела к стрептомицину и дигидрострептомицину, предложена конструкция иммуногена на основе стрептомицина и катионизированного альбумина человека и продемонстрирована эффективность ее использования для получения в короткие сроки антител с высоким сродством к гаптену, которые подходят для разработки тест-систем с хорошими метрологическими характеристиками определения стрептомицина и дигидрострептомицина в продукции животного происхождения.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Х16М-080).

УДК 602.68:57.083

BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF OBTAINING ANTIBODIES AGAINT STREPTOMYCIN AND DIHYDROSTREPTOMYCIN FOR IMMUNOASSAY

Serchenya T.S., Shyrochyna I.V., Sviridov O.V.

Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk
5/2 Academician V.F. Kouprevich St., Minsk, 220141, Belarus
e-mail: serchenya@iboch.bas-net.by

To develop immunoassay technology of antibiotics streptomycin and dihydrostreptomycin in foods of animal origin the specific antibodies have been obtained and characterized. Two immunogens with different carrier proteins and identical methods of synthesis have been investigated and compared. The efficiency of streptomycin conjugate with modified albumin as an immunogen for receiving high affinity antibodies with large titres in short immunization terms has been shown.

Key words: polyclonal antibodies, immunoassay, streptomycin, dihydrostreptomycin

Modern biotechnology of the development of immunoassay systems for quantitative determination of antibiotics in foods of animal origin comprises obtaining and characterization of specific immunoreagents and aims at the advancement of immunodiagnostic kits. The features of antibodies used in immunochemical systems

play an extremely important role and are the basic factors of analytical characteristics of immunoassay methods – selectivity or group recognition of antibiotics, detection limit and measurement range.

The effective technology for receiving high affinity and specific antibodies to aminoglycoside antibiotics streptomycin and dihydrostreptomycin has been developed. Two immunogens with different carrier proteins and identical methods of synthesis have been investigated and compared. The polyclonal antibodies to streptomycin and dihydrostreptomycin were generated in rabbits using streptomycin conjugates. Protein conjugates were prepared by coupling streptomycin-carboxymethyloxime to native and cationized (aminoethylamidated) human albumin. For each immunogen, ten immunization cycles were conducted. The dynamics of antibodies production were analyzed by solid phase enzyme immunoassay on plates coating streptomycin conjugated with heterologous carrier protein. It has been established that the antibody titre increased gradually when streptomycin–native human albumin was used as an immunogen, while the concentration of antibodies to the immunogen based on streptomycin- cationized human albumin conjugate rose sharply in the antiserum. After the third injection of the immunogen based on streptomycin-cationized albumin conjugate the antibody titre was 1:200 000 and grow up to the value of 1:800 000. These results are important in the case of mass production of immunochemical test for antigens, characterized difficulties in isolation and correspondingly high price, for example, micotoxine. The polyclonal antibodies to streptomycin conjugated with native and modified human albumin have identical high specificities to streptomycin and its close structural analogue dihydrostreptomycin and differ in the affinity for the antigen. The antibodies obtained using the streptomycin–modified human albumin conjugate had a higher binding affinity for the antibiotic. The cross-reactivities of the antibodies with other aminoglycoside antibiotics as well as with tetracyclines, penicillin, ampicillin, chloramphenicol were no more than 0.01%. In a competitive assay using a streptomycin-peroxidase conjugate, the detection limit for streptomycin was 0.04 ng/ml.

Thus, the specific antibodies have been obtained and characterized, and the structure of the immunogen on the basis of streptomycin and cationized human albumin has been suggested. The efficiency of streptomycin conjugate with modified albumin as an immunogen for receiving high affinity antibodies with large titres in short immunization terms has been demonstrated. These antibodies are very suitable for the development of test-systems possessing good metrological characteristics of streptomycin and dihydrostreptomycin determination in foods of animal origin.

This work was supported by BRFFR (project X16M-080).

ПУБЛИКАЦИИ

PUBLICATIONS

УДК 637.5.033+664.8.022.3

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ ИЗ БЕРЕЗОВОГО ГРИБА ЧАГА (INONOTUS OBLIQUUS) В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ

Ли Н.Г., Каленик Т.К., Ищенко С.А., Михеева Н.А., Моткина Е.В., Давыденко А.В.

ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины
Владивосток, Россия, 690950, ул. Суханова, 8, e-mail: li.ng@dvfu.ru

Получен лиофилизированный экстракт из водного и водно-спиртового извлечений чаги. Показана целесообразность и эффективность использования экстракта чаги в качестве пищевой антиоксидантной добавки.

Ключевые слова: окисление липидов; мясные продукты, Inonotus obliguus; экстракт чаги; антиоксиданты; антирадикальная активность.

В последние годы в качестве антиоксидантов для пищевой промышленности биотехнологи рассматривают различные вещества растительного происхождения, которые не только содержат биологически активные соединения, но и выступают как вкусоароматические добавки, хорошо сочетаясь с другими компонентами пищи [1]. Одним из перспективных источников с высокой антиоксидантной активностью является березовый гриб чага [2].

В результате исследования антирадикальной активности лиофилизированного экстракта в различных концентрациях установлено, что экстракт в концентрациях от 0,06 мг/мл до 1 мг/мл оказывает высокое антирадикальное действие, ингибируя от 67 до 90% свободных радикалов DPPH. При введении лиофилизированного экстракта в опытные образцы мясного фарша из говядины в соотношении 0,01% экстракта к

массе фарша, обнаружено снижение перекисного числа на 11,4% и 21,05% на вторые и пятые сутки эксперимента соответственно по сравнению с контролем.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (Соглашение № 14-50-00034).

Литература.
Каленик Т.К., Вершинина А.Г., Кушнерова Н.Ф. К вопросу об использовании экстрактов дикорастущих растений в качестве антиоксидантов для удлинения сроков хранения масложировых продуктов [масложировая основа маргарина] // Вопросы питания. - 2009. - Т. 78. - N 6. - С. 37-41.
Сравнительная характеристика антиоксидантной активности водных и спиртовых извлечений чаги / М.А. Сысоева [и др.] // Химия растительного сырья. – 2009. – N 2. – С. 121–124.

UDC 637.5.033+664.8.022.3

USE OF ANTIOXIDANTS FROM CHAGA MUSHROOM (INONOTUS OBLIQUUS) IN MEAT PRODUCTS

Li N.G., Kalenik T.K., Ishchenko S.A., Mikheeva N.A., Motkina E.V., Davydenko A.V.

Far Eastern Federal University, School of Biomedicine
Vladivostok, Russia, 690950, st. Sukhanova, 8, e-mail: li.ng@dvfu.ru

Dry powder extract was obtained from aqueous and aqueous-alcoholic extracts of Chaga mushroom by freeze-drying. The expediency and efficiency of use the Chaga mushroom extract as an antioxidant additive.

Key words: lipid peroxidation; meat products, Inonotus obliguus; Chaga mushroom extract; antioxidants; radical scavenging activity.

In recent years, as antioxidant additives for food industry biotechnologists are considering various substances of plant origin that are biologically active compounds, as well as flavoring agents, which go well together with other components of food [1]. One of the most perspective sources of high antioxidant activity is Chaga mushroom [2].

As a result of investigation, it has been found, that dry powder extract in different concentrations from 0.06 mg/ml to 1 mg/ml has a high radical scavenging activity, reaching from 67 to 90% of scavenging of DPPH free radicals.

Dry powder extract was added in test samples minced beef in ratio of 0.01% on weight of minced meat, it was found that peroxide value was decreased by 11.4% and 21.05% for the second and the fifth day of the experiment, respectively, compared with a control sample.

The work was supported by grant The RSF (Agreement № 14-50-00034).

References:
1. Kalenik T.K., Vershinina A.G., Kushnerova N.F. To the question about using extracts of wild plants as antioxidants for extension of shelf life of fat and oil products [fat margarine base] // Voprosy pitaniya. - 2009. - T. 78 - N 6. - P. 37-41.
2. Comparative characteristics of antioxidant activity of aqueous and alcoholic extracts of Chaga mushroom / M.A. Sysoeva [et al.] // Khimija Rastitel'nogo Syr'ja. - 2009. – N 2. - P. 121-124.

УДК 664.661.3

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПШЕНИЧНОГО ХЛЕБА ИЗ ОБОЙНОЙ МУКИ

Шишканов А.А., Рысмухамбетова Г.Е., Урядова Г.Т., Садыгова М.К., Карпунина Л.В.

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова,
410012, г. Саратов, Театральная пл., 1.
e-mail: senior.shishkanoff2015@yandex.ru

Исследовали влияние полисахаридов различного происхождения на качество хлеба из обойной муки пшеницы 5 класса. Установлено, что добавление ксантана в количестве 0,5% и трагаканта - 0,6% от массы муки улучшает качество хлеба.

Ключевые слова: полисахариды; обойная мука; ксантан; трагакант.

Хлеб – основной продукт питания населения Российской Федерации, его ежедневное употребление определяет необходимость в высокой пищевой ценности этого изделия. В настоящее время среди производителей возрос интерес к хлебобулочным изделиям, приготовленных из муки низших сортов и грубой степени помола. Такой хлеб полезно употреблять людям, склонным к пищевой аллергии, ожирению, при сахарном диабете, сердечно-сосудистых заболеваниях, заболеваниях желудочно-кишечного тракта [4]. В последние годы наряду с другими улучшителями хлеба используются полисахариды (ПС), добавление которых в тесто улучшает его физические и структурно-механические характеристики [5].

Целью данной работы являлось исследование влияния полисахаридов различного происхождения (ксантан, трагакант, гуаровая камедь, гуммиарабик, каррагинан) на качество хлеба приготовленного из обойной муки пшеницы 5 класса. Подготовку образцов муки и хлеба; органолептические, физико-химические, структурно-механические свойства; определение микрофлоры в хлебобулочных образцах; статистическую обработку полученных данных проводили по общепринятым стандартным методикам [1-3, 6].

Было показано, что изделия, приготовленные из обойной муки пшеницы 5 класса опарным способом с добавлением ПС, обладали закалом, низкой пористостью и крупными трещинами на поверхности - дефектами недопустимыми при реализации. Поэтому в дальнейшей работе использовали образцы, приготовленные безопарным способом. Исследования проводили с различными концентрациями ПС (от 0,5 до 1%). В процессе органолептического анализа нами было отмечено, что хлеб с добавлением ксантана 0,5% и трагаканта 0,6% превосходит другие опытные образцы по исследованным показателям. Кроме того, ксантан 0,5% и трагакант 0,6% оказывали лучшее влияние на физико-химические и структурно-механические свойства хлеба (влажность, кислотность, пористость и т.д.), по сравнению с контрольным образцом и другими опытными изделиями. Микробиологическое исследование испытуемых образцов показало полное соответствие требованиям, предъявляемым к данному виду изделий согласно нормативным документам.

Таким образом, применение ксантана 0,5% и трагаканта 0,6% при производстве хлеба из обойной муки, выработанной из пшеницы 5 класса, способствует улучшению качества хлеба.

Литература.
ГОСТ 27842-88. Хлеб из пшеничной муки. Технические условия (с Изменениями N 1, 2).
ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».
Боресков, В.Г. Методические указания к работам, выполняемым по системе УИРС и НИРС. Статистические методы обработки экспериментальных результатов. – М.: МТИММП, 1979. – 26 с.
Петров, Н.Ю. Производство хлеба из различных сортов муки / Н.Ю. Петров, Е.И. Крючков, Е.А. Карпачева и др. // Пути улучшения повышения качества хранения и переработки сельскохозяйственной продукции и её экономическое значение в развитии сельского хозяйства: сборник научных статей. – Астрахань: АГТУ, 2015. – С. 30-36.
Рысмухамбетова Г.Е. Экзополисахариды ксантомонад и клебсиелл: физико-химические, биологические свойства и перспективы применения: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Саратов, 2009. – 22 с.
Скуратовская, О.Д. Контроль качества продукции физико-химическими методами.1.Хлебобулочные изделия. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 102 с.

UDC 664.661.3

USE OF POLYSACCHARIDES IN THE PRODUCTION OF BREAD FROM WHEAT WHOLE MEAL

A.A. Shishkanov, G.E. Rysmuhambetova, G.T. Uryadova, M.K. Sadygova, and L.V. Karpunina

Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov
1 Teatralnaya Sq., Saratov 410012, Russian Federation
e-mail: senior.shishkanoff2015@yandex.ru

The effect of polysaccharides of various origins on the quality of bread made from 5-grade wheat whole meal was studied. Addition of 0.5% xanthan and 0.6% tragacanth (by weight) was found to improve the bread.

Key words: polysaccharides; whole meal; xanthan; tragacanth.

Bread is the staple food of the Russian Federation population, its daily consumption determines the need for a

high nutritional value of this product. Currently, interest in the bakery products prepared from meal of lower grades and coarse grinding degree has increased among the manufacturers. Such bread is useful for people prone to food allergies, obesity, diabetes, cardiovascular diseases, and diseases of the gastrointestinal tract [4]. In recent years, polysaccharides (PS) have been used along with other bread improvers, whose addition to the dough improves its physical and structural-mechanical characteristics [5].

The aim of this study was to investigate the influence of polysaccharides of various origins (xanthan, tragacanth, guar gum, gum arabic, and carrageenan) on the quality of bread made from 5-grade wheat whole meal. Preparation of the samples of meal and bread; its organoleptic, physicochemical, structural-mechanical properties; analysis of the microflora in bakery samples; statistical analysis of data were carried out by conventional standard methods [1–3, 6].

It was shown that the products made from 5-grade wheat whole meal by a leaven method with addition of PS was high-baked, had low porosity and large cracks on the surface—unacceptable defects for the market. Therefore, only samples prepared by a leaven-free method were used in our further work. Studies were made with several PS concentrations (0.5 to 1%). As we noted during our sensory analysis, the bread with 0.5% xanthan and 0.6% tragacanth added excelled other samples in the properties studied. In addition, 0.5% xanthan and 0.6% tragacanth provided better effect on the physicochemical and structural-mechanical properties of bread (humidity, pH, porosity, etc.) when compared with the reference sample and other experimental products. Microbiological testing of our samples showed full compliance with the requirements for this type of products in accordance with regulations.

Thus, addition of 0.5% xanthan and 0.6% tragacanth in the production of bread from whole meal produced from 5-grade wheat improves the quality of the bread.

References:
GOST 27842-88. Bread from wheat meal. Specifications (with changes No 1, 2).
TR CU 021/2011 «On food safety».
V.G. Boreskov. Guidelines for works performed in the UIRS and NIRS system. Statistical methods for processing of experimental results. – Moscow, MTIMMP, 1979. - 26 p.
N.Yu. Petrov. Production of bread from flour of various grades / N.Yu. Petrov, E.I. Kryuchkov, E.A. Karpachova, et al. // Ways to improve the quality of storage and processing of agricultural products and its economic importance in the development of agriculture: a collection of papers. - Astrakhan: Astrakhan State Technical University, 2015. - P. 30–36.
G.E. Rysmuhambetova. Ksantomonad and Klebsiella exopolysaccharides: Their physicochemical and biological properties and application prospects: Resume of PhD thesis. - Saratov, 2009. - 22 p.
O.D. Skuratovskaya. Quality control by physicochemical methods. 1. Bakery products. – Moscow, DeLi print, 2002. - 102 p.

УДК 66.091.2

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА ЦИНКА С ФЕРМЕНТОЛИЗАТОМ ЯИЧНОГО БЕЛКА

Шахназарова Л.В.[1], Стефанова И.Л.[1], Мазо В.К.[1], Зорин С.Н.[2]

[1]«Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук (ВНИИПП), Московская область, Россия
141552, Московская область, Солнечногорский р-н, рп. Ржавки, строение 1
e-mail: info@vniipp.ru
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»
109240, г. Москва, Устьинский проезд, д.2/14

С помощью биотехнологического подхода получен и физико-химически охарактеризован новый пищевой источник органической формы цинка в виде комплекса с пептидными фракциями ферментолизата коагулированного яичного белка

Ключевые слова: яичный белок, коагуляция, протеаза, ферментолизат, органическая форма цинка

Вследствие одностадийной термической обработки путем коагуляции при Т 88ºС ингибиторная активность нативного яичного белка была снижена в 2 раза. Протеолиз коагулированного яичного белка проведен

в течение двух временных интервалов (2 и 5 часов) ферментными препаратами, протеазами бактериального происхождения (нейтральная Протеаза В 2256, щелочная протеаза С 1986 и щелочная протеаза Протозим В). Пятичасовой ферментолиз позволял перевести в водорастворимую фазу 52%, 69% и 85% общего азота относительно исходного коагулированного яичного белка при использовании соответственно Протеазы С, Протеазы В и Протозима В. Для получения комплекса с цинком был выбран полученный в результате 5 часового расщепления коагулированного яичного белка протозимом В ферментолизат, содержащий в своем составе 58% пептидных фракций в интервале молекулярных масс от 6,9 до 1,1кД и 21% фракций с молекулярной массой менее 1,1кД. Высокая степень расщепления пептидных связей в ферментолизате определила эффективность связывания цинка, содержание которого в комплексе составило 19 мг/г.

Исследование выполнено за счет гранта РНФ (проект № 16-16-04047).

UDC 66.091.2

DERIVATION OF ZINC CONTAINING COORDINATION COMPOUND WITH FERMENTED EGG ALBUMEN

[1]Shakhnazarova L.V., [1]Stefanova I.L., [1]Mazo V.K., [2]Zorin S.N.

[1]All-Russian Research Institute of Poultry Processing, affiliate of Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute" of Russian Academy of Sciences (ARSRIPPI), Moscow Province, Russia
141552 Moscow Province, Solnechnogorsk district, township Rzhavki, Building 1
e-mail: info@vniipp.ru
[2]Federal Scientific Center for Nutrition, Biotechnology and Food Security
109240 Moscow, Ustyinsky proezd, 2/14.

Biotechnological derivation and physicochemical characterization of coordination compound of zinc with peptide fractions of fermented coagulated egg albumen as a new source of organic zinc for human diets were studied.

Key words: egg albumen, coagulation, protease, fermentation, organic form of zinc.

Single-stage thermal coagulation treatment at 88ºC led to two-fold decrease in inhibitory activity of native egg albumen. The resulting coagulated egg albumen (CEA) product was further processed by fermentation during different exposure periods (2 vs. 5 hrs) using different bacterial enzymatic preparations of proteases (neutral Protease B 2256; alkaline protease C 1986, and alkaline protease Protozyme B). After 5 hrs of fermentation by these three preparations 52; 69; and 85% of total nitrogen of initial CEA was conversed into a water-soluble phase respectively. The product derived by 5-hr CEA fermentation by Protozyme B was chosen to obtain coordination compound with zinc; it contained 58% of peptide fractions with molecular weight range of 6.9-1.1 kD and 21% of fractions with molecular weight range <1.1 kD. High level of polypeptide degradation in this product led to high zinc-binding efficiency: Zn concentration in resulting coordination compound was 19 mg/g.

The study was financed by Russian Science Foundation, grant No 16-16-04047.

УДК 664.267:635.656

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОАМИЛОЗНОГО КРАХМАЛА СОРТА ГОРОХА АМИОР В КАЧЕСТВЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИНГРЕДИЕНТА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Шелепина Н.В.

Орловский государственный университет экономики и торговли, Орел, Россия
302028, Россия, г. Орел, ул. Октябрьская, 12
e-mail: shel-nv@yandex.ru

Высокоамилозный крахмал сорта гороха Амиор использован в качестве источника энзимрезистентного крахмала в составе теста для макаронных изделий функциональной направленности.

Ключевые слова: горох, семена, крахмал, амилоза, энзимрезистентный крахмал, функциональный ингредиент, пищевые волокна, макаронные изделия.

В результате реализации селекционной программы ФГБНУ ВНИИЗБК по созданию сорта гороха зернового направления использования с высоким содержанием амилозы в крахмале семян получен сорт Амиор (Авторское свидетельство №58068. Горох посевной Амиор). Нативный крахмал, выделенный из семян нового сорта отнесен к резистентным второго типа RS 2 с высоким содержанием амилозы, выполняющим функцию пищевых волокон, что позволяет использовать его в качестве функционального ингредиента в составе пищевых продуктов. Установлено, что в крахмале семян сорта Амиор содержание энзимрезистентного крахмала составило 16,8%, при 40,5% у коммерческого препарата резистентного крахмала компании National Starch. При внесении в состав теста для макаронных изделий 10,0% высокоамилозного крахмала содержание ферментоустойчивого крахмала в готовых изделиях составило 11,3%, что в 2,7 раза выше, чем в макаронных изделиях традиционной рецептуры. При употреблении 100 г продукта суточная потребность в пищевых волокнах удовлетворяется на 56,5%, в энзимрезистентном крахмале – на 135,0%. На разработанный состав теста для производства макаронных изделий получен патент РФ №2489901.

Результаты исследований получены в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации.

UDK 664.267:635.656

THE USE OF HIGH-AMYLOSE STARCH OF PEA VARIETY AMIOR AS A FUNCTIONAL INGREDIENT OF FOOD PRODUCTS

Shelepina N.V.

Orel State University of Economics and Trade, Orel, Russia
302028, Russia, Orel, Oktyabrskaya St., 12
e-mail: shel-nv@yandex.ru

High-amylose pea variety Amior is used as a source of enzyme-resistant starch as a source of dough for functional macaroni products.

Key words: pea, seeds, starch, amylose, enzyme-resistant starch, functional ingredient, dietary fibers, macaroni.

As a result of the selection program of FGBNU VNIIZBK (The All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops) on breeding of pea variety with high content of amylose in the seeds starch, variety Amior was received (Certificate of Authorship №58068. The peas sowing Amior). Native starch isolated from the seeds of new pea variety is referred to the resistant one of the second type RS 2 with high amylose content functioning as dietary fibers that makes it possible to use it as a functional ingredient in food products. It was ascertained that the content of enzyme-resistant starch in the seeds of Amior is 16,8%, while the commercial specimen of the resistant starch produced by National Starch is 40,5%. When 10,0% high-amylose starch was added to macaroni dough, the content of enzyme-resistant starch in finished product was 11,3%, that is 2,7 times higher than traditional macaroni products have. The use of 100 grams of the product satisfies the daily need in dietary fibers by 56,5% and in enzyme-resistant starch – by 135,0%. Patent of the Russian Federation №2489901 is received for the developed dough composition for macaroni products.

The research results were obtained within the framework of the state order of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

УДК 577.11, 577.15, 675.92.026.2, 67.017

ПРИМЕНЕНИЕ БИОМОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ВОЛОКНИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ

Захаров И.В., Михайлова О.С., Захарова Н.Л., Канарский А.В, Казаков Я.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»), Казань, Россия,

420015, Казань, ул. Л. Толстого, д.8
e-mail: zaharvv1991@mail.ru

Показана целесообразность ферментативной обработки крахмала картофельного и глютена пшеничного для повышения прочностных и деформационных свойств целлюлозно-волокнистых материалов.

Ключевые слова: крахмал, глютен, целлюлоза, ферментирование, физико-механические свойства волокнистых материалов

В настоящее время наблюдается применения биотехнологических методов для модификации природных полимеров, используемых в производстве волокнистых материалов, и в частности в производстве бумаги и картона. Данная тенденция обусловлена перспективой придания волокнистым материалом повышенных физико-механических свойств и биодеградируемости. Биотехнологические методы обработки природных полимеров позволяют использовать более дешевые источники сырьевых ресурсов в производстве бумаги и картона, а также способствуют многократному использованию бывших в употребление бумаги и картона (макулатуры).

Цель настоящей работы – определение влияния ферментативной обработки картофельного крахмала, глютена и целлюлозы, выделенной из рисовой шелухи, на деформационные и механические свойства бумаги и картона.

Установлено, что обработка картофельного крахмала амилолитическими ферментами и глютена пшеничного протеолитическими ферментами повышает деформационные и механические свойства бумаги и картона. Наиболее существенное повышение качества бумаги и картона в сухом и влажном состояниях наблюдается при обработке картофельного крахмала ферментами, гидролизующими 1,6 альфа-глюкозидные связи. Обработка глютена пшеничного рекомендуется ферментами восстанавливающих дисульфидные группы (-S-S-) до сульфидгидрильных SH-групп.

Рекомендуется обрабатывать поверхность бумаги и картона биомодифицированными полимерами, что исключает технологические потери.

Показана целесообразность обработки целлюлозы, выделенной из рисовой шелухи щелочным методом, целлюлолитическими ферментами. В результате такой обработки целлюлоза склонна к микрофибриллированию с наименьшими энергетическими затратами и позволяет получать бумагу и картон с более высокими показателями жесткости.

.....

UDK 577.11, 577.15, 675.92.026.2, 67.017

APPLICATION BIOMODIFICATION POLYSACCHARIDES AND VEGETABLE PROTEINS IN THE PRODUCTION OF FIBROUS MATERIALS

Zakharov I. V., Mikhailova O. S., Zakharova N. L., Kanarskiy A., Kazakov Y. V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kazan National Research Technological University» («KNRTU») Kazan, Russia,
420015, Kazan, L. Tolstoy st. 8
e-mail: zaharvv1991@mail.ru

The article demonstrates expediency of enzymatic treatment of potato starch and wheat gluten to improve the strength and deformation properties of pulp and fibrous materials.

Key words: starch, gluten, cellulose, fermentation, physical and mechanical properties of fibrous materials

Now there are biotechnological methods for modification of natural polymers used in the production of fibrous materials, and in particular in the production of paper and cardboard. This trend is due to the prospect of giving a fiber material of increased physical-mechanical properties and biodegradability. Biotechnological methods of natural polymers processing permit to use cheaper sources of raw materials in the manufacture of paper and cardboard, and to foster reuse of the former in the use of paper and cardboard (waste paper).

The aim of the research is to determine the influence of enzymatic treatment of potato starch, wheat gluten and cellulose, extracted from rice husk on deformation and mechanical properties of paper and paperboard.

It is established that processing of potato starch amylolytic enzymes and processing of wheat gluten proteolytic

enzymes increases the deformation and mechanical properties of paper and paperboard. The most significant increase in the quality of paper and paperboard in dry and wet conditions is observed in the processing of potato starch with enzymes which hydrolyze 1,6-alpha-glycoside connection. Processing of wheat gluten is recommended enzymes reducing disulfide groups (-S-S-) to thiol SH-groups.

It is recommended to treat the surface of paper and paperboard biomodification polymers, eliminating process losses.

The expediency of processing of cellulose isolated from rice husk by alkaline method, cellulolyticus enzymes is shown. As a result of this treatment, cellulose can prone to microfibrillation with minimal energy costs and allows to obtain paper and cardboard with high rigidity.

УДК 637. 14

ИННОВАЦИОННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПРОДУКТА

Друкер О.В., Крючкова В.В., Скрипин П.В., Белик С.Н.

ФГБОУ ВО «Донской государственный аграрный университет»
п. Персиановский, Ростовской области, Россия, olgadruker@ya.ru

Аннотация. Изучен состав и потребительские свойства плодов боярышника, амарантовой муки, масла виноградных косточек и сиропа лактулозы, их влияние на разные виды заквасок и на процесс ферментации кисломолочного продукта. Разработана промышленная ресурсосберегающая технология функционального кисломолочного продукта с фитокомпонентами и сиропом лактулозы, подтверждённая технической документацией СТО 9229-024-00493468-16, технологическими инструкциями и рецептурой.

Ключевые слова: функциональный кисломолочный продукт, боярышник, амарантовая мука, масло виноградных косточек, пребиотик, закваска, ресурсосберегающая технология.

Основной задачей функционального питания является восстановление и укрепление одной или нескольких функций организма человека. Эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что в России примерно у 40% женщин и 48% мужчин диагностируется повышение уровня артериального давления [1], около 90% населения страдает дисбактериозом различной степени выраженности [2], что говорит о высокой социальной значимости этих состояний и необходимости разработки функционального продукта (ФП), биологические эффекты которого будут направлены на восстановление нормальной микрофлоры кишечника, а также профилактику артериальной гипертензии.

Авторами разработана ресурсосберегающая технология ФП, выработанного путём сквашивания подготовленной молочно-растительной смеси закваской молочнокислых бактерий (Streptococcus thermophilus, Propioni-bacterium freudenreichi subsp. Shermanii, Lactococcus lactis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus helveticus) термостатным способом, обогащенного плодами боярышника, амарантовой мукой, маслом виноградных косточек и сиропом лактулозы. Изучены состав и потребительские свойства вносимых ингредиентов и их влияние на процессы ферментации и качество кисломолочного продукта. Установлены дозы фитокомпонентов, технологический этап внесения и оптимальный способ их предварительной подготовки. Технология прошла апробацию в промышленных условиях ЗАО «Брюховецкий молочно-консервный комбинат», на основании которой была разработана нормативная документация СТО 9229-024-00493468-16 «Функциональный кисломолочный продукт с фитокомпонентами и сиропом лактулозы» и технологическая инструкция к ней.

Проведена комплексная оценка качества и установлены высокие органолептические показатели и пищевая ценность ФП. Показатели химической и микробиологической безопасности соответствовали требованиям ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции». Продолжительность хранения ФП установлена 14 суток при температуре 4±2оС на всем пути товародвижения. Разработанный ФП является «живым продуктом», что подтверждается наличием молочнокислых бактерий в количестве 1*107КОЕ/г на конечный срок реализации.

Оценка потребительских свойств ФП, проводилась путем расчета комплексного показателя качества и показателя конкурентоспособности. Установлено, что наиболее конкурентоспособным по сравнению с традиционными кисломолочными продуктами является разработанный ФП, что было подтверждено расчетом интегрального показателя потребительских свойств с учетом опроса потребителей.

В заключение следует отметить, что разработанная ресурсосберегающая технология ФП, обогащен-

ного фитокомпонентами и сиропом лактулозы, может быть реализована на предприятиях молочной промышленности с целью профилактики дисбактериоза и коррекции гипертензии, что приведет к практической реализации государственной программы «Здоровое питание – здоровье нации».

Литература.
Глезер М. Г. Артериальная гипертония: особенности течения и лечения у женщин // Лечебное дело. – 2013. – №1 – С.33-40.
Дзахмишева З. А., Дзахмишева И. Ш. Функциональные пищевые продукты геродиетического назначения // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9-9. – С.2048-2051.

UDC 637. 14

INNOVATIVE TECHNOLOGY OF THE FUNCTIONAL PRODUCT

Druker O.V., Kryuchkova V.V., Skripin P.V., Belik S.N.

FSBEI HE « Don State Agrarian University»
Persianovskiy, Rostov region, Russia, olgadruker@ya.ru

Abstract. It was studied the composition and consumer features of hawthorn, amaranth flour, grapeseed oil and syrup of lactulose, its influence on different types of starter cultures and fermentation process of fermented milk product. It was developed the industrial resource-saving technology of functional fermented milk product with phytocomponents and syrup of lactulose, confirmed by the technical documentation SO 9229-024-00493468-16, technological instructions and recipes.

Key words: functional fermented milk product, hawthorn, amaranth flour, grapeseed oil, prebiotic, starter culture, resource-saving technology.

The main objective of functional nutrition is restoration and strengthening of one or more functions of the human body. Epidemiological researches indicate that in Russia in 40% of women and 48% of men have elevated levels of blood pressure [1], 90% of the population suffer from dysbacteriosis of different degrees of manifestation [2], that shows a high social significance of these conditions and the necessity to develop a functional product (FP) with biological effects aimed at restoring the normal intestinal microflora, and prevention of hypertension.

The authors have developed resource-saving technology of FP produced by fermentation of the prepared milk-vegetable mixture with the starter culture of Lactobacillales (Streptococcus thermophilus, Propionibacterium freudenreichi subsp. Shermanii, producer Lactococcus lactis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus helveticus) by thermostatic method enriched with hawthorn, amaranth flour, grapeseed oil and syrup of lactulose. It was studied the composition and consumer features of introduction of the ingredients and their effect on fermentation processes and quality of fermented milk product. It was installed the dose of phytocomponents, the technological stage of introduction and optimal method of their preparation. The technology has been tested in the industrial conditions of CJSC «Bryukhovetskiy dairy-canning plant» on the basis of which was developed regulatory documentation SO 9229-024-00493468-16 «Functional fermented milk product with phytocomponents and syrup of lactulose» and technological instruction.

It was conducted a comprehensive assessment of the quality and installed high organoleptic characteristics and nutritional value of FP. Indicators of chemical and microbiological safety meet the requirements of the TR CU 033/2013 «On safety of milk and dairy products». Duration of storage of FP installed as 14 days at a temperature of 4±2 °C all the way of product distribution. The developed FP is an «alive product» that is confirmed by the presence of Lactobacillales in the amount of 1*107KOE/g on a final implementation period.

Assessment of consumer features of FP was conducted by calculating the integrated indicator of quality and competitiveness. It is established that the most competitive in comparison with traditional fermented milk products is developed FP that was confirmed by the calculating of the integral indicator of consumer features in view to the customer survey.

In conclusion, it should be noted that the developed resource-saving technology of FP, enriched with phytocomponents and syrup of lactulose, can be implemented at the plants of the dairy industry with the aim of prevention of dysbacteriosis and correction of hypertension that will lead to the practical realization of the state programme «Healthy nutrition – health of the nation».

References:

Glezer M. G. Arterial hypertension: features of clinical course and treatment in women // Lechebnoe delo. – 2013. – №1 – P.33-40.
Dzahmisheva Z. A., Dzahmisheva I. Sh. Functional nutritional foods of gerodietetic purpose // Fundamentalnye issledovaniya. – 2014. – № 9-9. – P.2048-2051.

УДК 637.146.3

РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Беспоместных К.В.

Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт, Кемерово, Россия
650056, Сибирский Федеральный округ, Кемеровская область, г. Кемерово, пос. Новостройка, ул. Центральная, 9а
e-mail: biot@ksai.ru

Экспериментально подтверждена более высокая специфичность и чувствительность ПЦР-тест-системы для идентификации молочнокислых бактерий, входящих в состав бактериальных заквасок. Исследования были проведены на широком спектре кисломолочных продуктов.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, праймеры, бактерии рода Lactobacillus, кисломолочная продукция.

Актуальной проблемой для поиска новых штаммов молочнокислых бактерий является изучение видового состава микрофлоры кисломолочных продуктов, выделение из них культур бактерий и исследование их свойств. Биохимические и морфологические свойства микроорганизмов являются в настоящее время основным и единственным критерием межродовой и видовой идентификации. Однако при идентификации с использованием стандартных микробиологических тестов могут возникнуть трудности, связанные с общностью физиолого-биохимических свойств микроорганизмов [1]. Альтернативой классической биохимической идентификации могут служить современные генетические методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [2, 3].

Целью данной работы являлась разработка ПЦР-тест-системы для индикации и идентификации молочнокислых бактерий.

В работе использованы сухие культуры штаммов молочнокислых бактерий, зарегистрированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИгенетика. Объектами исследования являлись бактерии рода Lactobacillus.

Амплификацию проводили на приборе типа «Терцик-МС2» (Москва) с применением термостабильной Taq-полимеразы («СибЭнзим», Новосибирск) согласно рекомендациям фирмы-производителя полимеразы. Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: 95 °С, 200 секунд – 1 цикл; 62 °С, 50 секунд и 95 °С, 20 секунд – 25 циклов; 72 °С, 120 секунд – 1 цикл. Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Документирование результатов осуществляли на видеосистеме «Vitran».

Разработанная ПЦР-тест-система была подтверждена экспериментально на бактериальных закваскаx (БЗ) и бактериальных концентратах (БК) (рис. 1, 2).

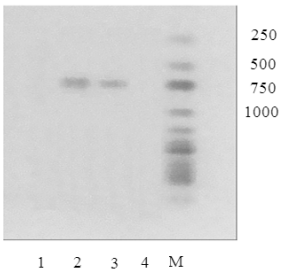


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента ДНК гена 16S рРНК бактерий рода Lactobacillus с использованием пары родоспецифичных праймеров 16S for и 16S rev: 1 – Бифидумбактерин (штамм Bifidumbacterin bifidum); 2 – БЗ ацидофильная палочка невязкая (L. acidophilus); 3 – БЗ болгарская палочка вязкая (L. bulgaricus); 4 – Streptococcus thermophilus 17T; M – ДНК маркер

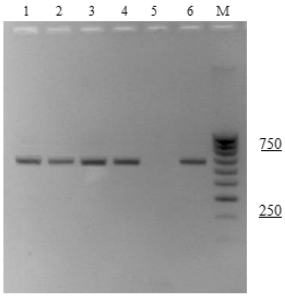


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента ДНК генома представителей рода Lactobacillus, содержащихся в различных субстратах: 1 – БК для йогурта КТСБ; 2 – БЗ для йогурта БЗ-СТБп; 3 – БЗ болгарская палочка невязкая; 4 – БЗ болгарская палочка вязкая; 5 – Отрицательный контроль H2O; 6 – Положительный контроль (ДНК L. delbrueckii subsp. bulgaricus Л 20/2); М – маркер размерности ДНК (п.н.)

На рис. 1 представлена электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента ДНК гена 16S рРНК различных бактериальных заквасок с использованием синтезированных праймеров. Из рисунка 1видно, что фрагменты ДНК искомого размера (737 п.н. и 612 п.н.) наблюдаются лишь в тех дорожках агарозного геля, куда нанесены пробы ДНК лактобактерий видов L. acidophilus и L. bulgaricus. В дорожках геля, соответствующих пробам ДНК бактерий родов Bifidobacterium и Streptococcus не наблюдается положительных или неспецифических сигналов. Теоретически обоснованная специфичность пар видоспецифичных праймеров была подтверждена экспериментально на различных субстратах (рис. 2).

Таким образом, разработанная ПЦР-тест-система индикации молочнокислых бактерий и комплексная схема их видовой идентификации может использоваться для молекулярно-генетической характеристики изолируемых штаммов бактерий и представляет практический интерес для использования в системе контроля качества бактериальных заквасок.

Литература.
Ботина С.Г. Видовая идентификация и паспортизация молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования // Молочная промышленность. – 2008. – № 3. – С. 52-54.
Ботина С.Г. Идентификация промышленных штаммов молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического анализа // Генетика. – 2006. – Том 42, № 12. – С. 1621-1635.
Torriani S. Use of PCR-Based methods for rapid differentiation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and L. delbrueckii subsp. lactis // Appl. Environ. Microbiol. 1999. – Vol. 65. № 10. P. 4351-4356.

UDC 637.146.3

THE DEVELOPMENT OF PCR TEST-SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA

Bespomestnykh K. V.

Kemerovo state agricultural Institute, Kemerovo, Russia
650056, Siberian Federal district, Kemerovo oblast, Kemerovo, POS building, Tsentralnaya str., 9a
e-mail: biot@ksai.ru

Experimentally confirmed the higher specificity and sensitivity of PCR test-system for identification of lactic acid bacteria included in the bacterial starter cultures. Studies have been conducted on a wide range of dairy products.

Key words: polymerase chain reaction, primers, bacteria of the genus Lactobacillus, milk products.

The actual problem for the search of new strains of lactic acid bacteria is the study of the species composition of the microflora of fermented milk products, selection of cultures of bacteria and study of their properties. Biochemical and morphological properties of microorganisms are currently the main and only criterion of intergeneric and species identification. However, identification using standard microbiological tests may be difficulties associated with common physiological and biochemical properties of microorganisms [1]. An alternative to the classical biochemical identification can serve as modern genetic methods based on the polymerase chain reaction (PCR) [2, 3].

The aim of this work was to develop a PCR test-systems for indication and identification of lactic acid bacteria.

Used dry culture strains of lactic acid bacteria, was in the all-Russian collection of industrial microorganisms (PMBC) FSUE Gosniigenetika. The objects of the study were bacteria of the genus Lactobacillus.

Amplification was carried out on the device type «Terzic-MS2» (Moscow) with the use of the thermostable Taq-polymerase («Sibenzim», Novosibirsk) according to the recommendations of the manufacturer polymerase. The temperature-time profile of PCR was: 95° C., 200 sec – 1 cycle; 62° C, 50 seconds and 95° C, 20 seconds – 25 cycles; 72° C, 120 seconds, 1 cycle. Analysis of PCR products was performed using electrophoresis in 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. Documentation of the results was carried out on the video «Vitran».

The developed PCR test system was confirmed experimentally on bacterial starter cultures (BZ) and concentrates (BC) (Fig. 1, 2).

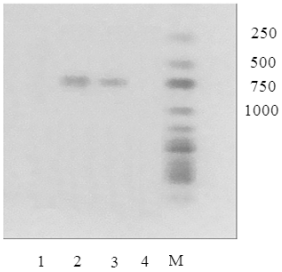


Fig. 1. The electrophoretogram of the amplification products of a DNA fragment of the 16S rRNA gene of bacteria of the genus Lactobacillus using modespecific pair of primers for 16S and 16S rev: 1 – Bifidumbacterin (Bifidumbacterin bifidum strain); 2 – BZ inviscid Lactobacillus acidophilus (L. acidophilus); 3 – BZ viscous bulgaricus (L. bulgaricus); 4 – Streptococcus thermophilus 17T; M – DNA marker

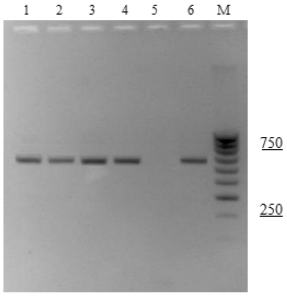


Fig. 2. The electrophoretogram of the amplification products of a DNA fragment of the genome of the genus Lactobacillus, contained in different substrates: 1 – BK yogurt CTSB; 2 – BZ for BZ yogurt-STBP; 3 – BR bulgaricus inviscid; 4 – BR bulgaricus viscous; 5 – Negative control, H2O; 6 – Positive control (DNA of L. delbrueckii subsp. bulgaricus L 20/2); M – dimension marker DNA (BP)

In Fig. 1 shows the electrophoretogram of the amplification products of a DNA fragment of the 16S rRNA gene of different bacterial starter cultures using the synthesized primers. The figure 1 shows that the DNA fragments of the desired size (737 BP and 612 BP) were observed only in the lanes of agarose gel, coated with the DNA samples of Lactobacillus species L. acidophilus and L. bulgaricus. In the gel lanes corresponding to DNA samples of bacteria genera Bifidobacterium and Streptococcus not there is a positive or nonspecific signals. Theoretically substantiated the specificity of pairs of species-specific primers was confirmed experimentally on different substrata (Fig. 2).

Thus, the developed PCR-display system of lactic acid bacteria and a complex scheme of species identification can be used for molecular-genetic characteristics of isolated strains of bacteria and is of practical interest for use in the system of quality control of bacterial cultures.

References:
1. Botín S. G. Species identification and certification of lactic acid bacteria by methods of molecular-genetic typing // Dairy industry. – 2008. – No. 3. – P. 52-54.
2. Botin S. G. Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular-genetic analysis // Genetics. – 2006. – Vol. 42, No. 12. – Pp. 1621-1635.
3. Torriani S. Use of PCR-Based methods for rapid differentiation of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and L. delbrueckii subsp. lactis // Appl. Environ. Microbiol. 1999. – Vol. 65. No. 10. P. 4351-4356.

УДК 664

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СОСТАВА МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Ивкова И.А., Скрябина О.В., Пиляева А.С., Рябкова Д.А.

ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», Омск, Россия
644008, Омская область, г. Омск, ул. Институтская площадь, 1
e-mail: tovar_ivm_omgau@mail.ru

Статья посвящена практике создания рациональных рецептур многокомпонентных молокосодержащих продуктов, в частности, сухого сметанного продукта сублимационной сушки. Показано, что эффективность композиционного моделирования может быть успешно достигнута при использовании теории линейного программирования и решения поставленных задач с применением современных компьютерных информационных технологий.

Ключевые слова: многокомпонентные молочные продукты, композиционное моделирование, линейные балансовые уравнения, рациональные рецептуры, закон сохранения массы вещества.

Одной из важных задач при создании многокомпонентных продуктов является обеспечение предпочтительного набора и соотношения компонентов, которое возможно обеспечить с помощью информации, характеризующей состав, а также определенный «эталон» и обеспечивающих желаемую пищевую ценность композиции [1].

Поставленная задача решалась путем поставленного изменения количества ингредиентов, входящих в состав продукта.

Предлагаемый матричный метод решения рецептуры многокомпонентных молочных продуктов отличается простотой и информативностью при своей реализации. Название метода объясняется формированием информационной базы в виде строк и столбцов заданной размерности [2].

Разработанная методология и спроектированная рецептура молокосодержащего (в нашем случае сметанного) продукта дает возможность целенаправленного и оперативного моделирования многокомпонентных продуктов с требуемым составом и оптимальной себестоимостью [3].

Литература.
1. Лисин, П. А. Компьютерное моделирование поликомпонентных молочных продуктов / П. А. Лисин // Пищевая пром-сть. – 2006. – № 11. – С. 60-61.
2. Лисин, П. А. Компьютерные технологии в рецептурных расчетах молочных продуктов : учеб. пособие / П. А. Лисин. – М. : ДеЛи принт, 2007. – 114 с.
3. Ивкова И.А., Гаврилова Н.Б. Технология сухих молочных и молокосодержащих консервов с улучшенными показателями качества: монография.- Омск, 2014.- С. 97-103.

.....

UDC 664

MATHEMATICAL MODELLING OF THE MULTICOMPONENT DAIRY PRODUCTS

Ivkova IA, Scriabin OV Pilyaeva AS, Ryabkov DA

FGBOU IN «Omsk State Agrarian University named after PA Stolypin «, Omsk, Russia
644008, Omsk region, Omsk, ul. Institutskaya area, 1
e-mail: tovar_ivm_omgau@mail.ru

The article is devoted to the practice of creating a rational multicomponent formulations for milk products, in particular, dry sour cream product of freeze-drying. It is shown that the efficiency of composite simulation can be successfully achieved by using linear programming theory and solving the problems with the use of modern computer information technology.

Key words: multicomponent dairy products, composite modeling, linear balance equations, rational formulation of the law of conservation of mass substances.

One of the important tasks in the creation of multi-component products is to provide a set of preferred and

ratios of the components, which may provide a means of information characterizing the composition, as well as a certain «standard» and provide the desired composition of the nutritional value of [1].

The problem is solved by changing the amount of the supplied ingredients included in the product.

The proposed algorithm for multi-component formulations of dairy products is simple and informative with their implementation. The name refers to the method of forming the knowledge base in the form of rows and columns of a given dimension [2].

The developed methodology and formula milk-designed (in our case with sour cream) product enables a focused and operational modeling of multi-component products with the desired composition and optimal cost [3].

References:
1. Lisin, PA Computer simulation of multicomponent dairy / PA Lisin // Food prom-st. - 2006. - № 11. - S. 60-61.
2. Lisin, PA Computer Technology in prescription calculations dairy products: Proc. Benefit / PA Lisin. - Moscow: DeLi print, 2007. - 114 p.
3. Ivkova IA, Gavrilov NB The technology of dry milk and milk-containing canned goods with improved quality indicators: Monograph Omsk, 2014.- pp 97-103.

УДК 663:1:543

КИСЛОМОЛОЧНЫЙ НАПИТОК ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ СИНБИОТИКОВ.

Утебаева А.А., Мубаракшина Г.Ш., Милюхина А.К., Бурмасова М.А., Сысоева М.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский Национальный Исследовательский Технологический Университет» (ФГБОУ ВО КНИТУ), Российская Федерация
420015, Казань, ул.К.Маркса, 68
e-mail: aidanka_90.kz@mail.ru

Для создания напитка функционального назначения в качестве пробиотиков были использованы ацидофильные и бифидобактерии, а пребиотика – меланины чаги. Показано, что внесение меланинов чаги способствует стимуляции роста микроорганизмов.

Ключевые слова: ацидофильные бактерии; бифидобактерии; меланины чаги; пробиотики, пребиотики

В настоящее время исследователи всё чаще используют пробиотики и пребиотики при создании функциональных кисломолочных продуктов. Кисломолочные продукты рекомендованы людям с лактазной недостаточностью и другими заболеваниями. Кроме того, используемые пробиотики способны расщеплять молекулы белка на более короткие пептиды и аминокислоты, которые значительно менее аллергенны и легко усваиваются организмом человека.

Ацидофильные бактерии характеризуются высокой антагонистической активностью в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, что объясняется их способностью продуцировать неспецифические антимикробные метаболиты (молочную кислоту, пероксид водорода, лизоцим) и специфические факторы антагонизма – бактериоцины. Различные штаммы ацидофильной палочки синтезируют разные бактериоцины: ацидофилин, лактоцидин, лактоцины B, F, ацидоцины B, J1229, CH5 [1]. Молочные продукты на основе ацидофильных бактерий способствуют уменьшению содержания холестерина в крови, снижают мутагенность, канцерогенность и риск запоров, диареи, а также непереносимость лактозы [2]. Доказана их эффективность против дрожжевых инфекций, желудочно-кишечных расстройств, а также нормализации работы иммунной системы [3].

Для повышения функциональных свойств продукта, в качестве симбионта, могут быть использованы бифидобактерии, которые активно синтезируют целый ряд витаминов [4]. Получаемый в результате их жизнедеятельности витамин К участвует в процессах свертывания крови. Они также обеспечивают всасывание витаминов группы В, таким образом повышают устойчивость нервной системы к воздействию негативных факторов, например, при стрессах и постоянном нервном напряжении. Ферментируя «сахара», бифидобактерии создают в кишечнике кислую среду, которая облегчает всасывание в кровь кальция, железа, а также витамина Д [4]. Кроме того, эти микроорганизмы являются активными продуцентами некоторых незаменимых аминокислот [5].

Доказана возможность и целесообразность совместного культивирования бифидобактерий и ацидо-

фильной палочки. Считается, что ацидофильная палочка создает благоприятные условия для размножения клеток бифидобактерий, снижая окислительно-восстановительный потенциал молока до значения, необходимого для развития бифидобактерий. При совместном культивировании бифидобактерий и ацидофильных палочек, с соблюдением определенных условий, можно получить в продукте достаточно высокую концентрацию жизнеспособных клеток обоих групп микроорганизмов [6].

Кроме поли- и олигосахаридов известен широкий спектр веществ, обеспечивающих активацию пробиотиков. Большую роль в этих процессах играют антиоксиданты. Известно, что меланины чаги обладают высокой антиоксидантной активностью от 20 до 40 кКл/ (100 г меланина), в зависимости от сырья, а так же низкой токсичностью ЛД50, около 6500 мг/кг [7].

Целью исследования является получение кисломолочного напитка на основе ацидофильных и бифидобактерий с меланинами чаги.

Активацию пробиотиков проводили с помощью внесения пребиотика в различных концентрациях (10-10-10-5 г/мл). Активация осуществлялась как совместно двух культур микроорганизмов, так и по отдельности. Сквашивание проводилось при оптимальной температуре. В готовых образцах определяли титруемую кислотность и микробиологические показатели.

Показано, что внесение меланинов чаги способствует стимуляции роста микроорганизмов.

Литература.
Красникова Л.В., Сибирцев В.С., Скобелева И.И. Биотехнология функционального кисломолочного продукта с разным соотношением пробиотических культур // Известия СПбГТИ (ТУ). 2016. №35. С. 60-63.
Korhonen H. and Pihlanto A. Milk-derived bioactive peptides: Formation and prospects for health promotion. In: Handbook of Functional Dairy Products. Functional Foods and Nutraceuticals. 2004. Series 6. P. 109–124.
Johnson M. C., Ray S. and Bhowmik T. Selection of Lactobacillus acidophilus strains for use in acidophilus products // Antonie Van Leeuwenhoek. 1987. Vol 53. P. 215–231.
Храмцов А.Г., Евдокимов И.А., Рябцева С.А., Половянова А.В., Мажуга Д.В. Бифидофлора в продуктах питания // Вестник СевКавГТУ, серия «Продовольствие». 2003. № 1. С. 1 – 9.
Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том I. Микрофлора человека и животных и её функции. М.: Грантъ, 1998. 288 с.
Функциональные продукты питания. Учебное пособие. М.: А-Приор, 2008. 240 с.
Сысоева М.А. Высокодисперсные коллоидные системы и меланины чаги: монография / Казань: Изд-во КНИТУ, 2013. 228 с.

УДК 663: 1: 543

SOUR-MILK DRINK FOR FUNCTIONAL PURPOSE BASED ON SYNBIOTICS.

A.A. Utebayeva, G.Sh. Mubarakshina, A.K. Milyuhina, M.A. Burmasova, M.A. Sysoyeva

Kazan National Research Technological University
68, Karl Marx St., Kazan, 420015, Russia
e-mail: aidanka_90.kz@mail.ru

To create a functional drink Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium in the quality of probiotics and melanin of chaga as prebiotic have been used. It was shown that the additive of melanin of chaga helps to stimulate the growth of microorganisms.

Key words: Lactobacillus acidophilus; Bifidobacterium; chaga melanin; probiotics, prebiotics

Currently, researchers increasingly are using probiotics and prebiotics to create functional curdled dairy products. Fermented milk products are recommended for people with lactase deficiency and other diseases. In addition, probiotics can split protein molecules into shorter peptides and amino acids, which are much less allergenic and easily digested by the human body.

Lactobacillus acidophilus exhibit high antagonistic activity against opportunistic pathogenic and pathogenic microorganisms, on account of theirs ability to produce the nonspecific antimicrobial metabolites (lactic acid, hydrogen peroxide, lysozyme) and the specific antagonism factors, bacteriocins. Different strains of L. acidophilus can synthesize several of bacteriocins: acidophilus, lactocidin, lactocin B, F, B aldazine, J1229, CH5 [1]. The dairy products produced with L. acidophilus can help to reduce the concentration of the cholesterol in blood, reduce the mutagenicity, carcinogenicity and the risk of the development of the constipation, diarrhea, and lactose intolerance [2]. Also their effectiveness against yeast infections and gastrointestinal disorder was proven. As well, capability of using them for immune boosting was confirmed [3].

Therefore, to improve the functional properties of the product in the quality of symbiotic, Bifidobacterium, that actively synthesize several vitamins can be used [4]. For example, they could produce vitamin K which is involved in blood clotting. They also provide the absorption of vitamins of B group. Thus, Bifidobacterium could increase the stability of the nervous system to the effects of negative factors such as stress and constant nervous tension. Trough «sugar» fermenting, Bifidobacterium create the acidic conditions in the intestinal tract. That enhances the absorption into blood of calcium, iron, and vitamin D [4]. In addition, these microorganisms are regarded as active producers of some essential amino acids [5].

The possibility and expediency of Bifidobacterium and Lactobacillus acidophilus co-cultivation are proved. It is believed that L. acidophilus creates favorable conditions for reproduction of the Bifidobacterium at the expense of reducing of the redox-potential of milk to the necessary values. Co-cultivation of Bifidobacterium and L. acidophilus, under certain conditions, could lead to high enough concentration of viable cells in the product of both groups of microorganisms [6].

Except poly - and oligosaccharides, a wide range of substances, providing the activation of probiotics is marked. Antioxidants are feature prominently in this process. It is known that melanin of chaga possess high antioxidant activity (20-40 kcal/ (100 g melanin)), and low toxicity LD50 (about 6,500 mg/kg) [7].

The aim of the study is to obtain fermented milk drink by using L. acidophilus, Bifidobacterium with chaga melanin.

The probiotics activation was carried out by the introduction of prebiotic in various concentrations (10-10-10-5 g/ml). Activation was conducted cooperatively to the two cultures of microorganisms, or separately. The fermentation was realized at the optimal temperature. The ultimate products were analyzed by titratable acidity and microbiological parameters.

It is shown that the introduction of chaga melanin helps to stimulate the growth of microorganisms.

References:
Krasnikova L.V., Sibirtsev V.S., Skobeleva I.I. Biotechnology functional fermented milk product with different ratioes of probiotic cultures // Bulletin of St PbSIT (TU). 2016. №35. P. 60-63.
Korhonen H. and Pihlanto A. Milk-derived bioactive peptides: Formation and prospects for health promotion. In: Handbook of Functional Dairy Products. Functional Foods and Nutraceuticals. 2004. Series 6. P. 109–124.
Johnson M. C., Ray S. and Bhowmik T. Selection of Lactobacillus acidophilus strains for use in acidophilus products // Antonie Van Leeuwenhoek. 1987. Vol 53. P. 215–231.
Khramtsov A.G., Evdokimov I.A., Ryabtseva S.A., Polovyanova A.V., Mazhuga D.V. Bifidoflora in foodstuffs // NCSTU Bulliten. Series «Food». 2003. № 1. P. 1 - 9.
Shenderov B.A. Medical microbial ecology and functional nutrition. Vol. I. The microflora of humans and animals, and its functions]. Moscow, Grant Publ. 1998, 288 p.
Functional food products. Tutorial. Moscow, A-Prior Publ. 2008. 240 p.
Sysoyeva M.A. Highly dispersed colloidal systems and melanin shelf fungus: monograph / Kazan: KNRTU Publ., 2013, 228 p.

.....

УДК 613.25:575.113+57.088

ФОРМИРОВАНИЕ ПАНЕЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГМ КАРТОФЕЛЯ В ОБРАЗЦАХ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ, КОРМОВ И СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА

Французов П.А., Голомидова А.К., Садыкова Э.О., Тышко Н.В., Шестакова С.И.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия 109240, Москва, Устьинский проезд, дом 2/14
e-mail: tnv@ion.ru

Предложен оптимальный набор генетических маркеров, детекция которых в рамках скрининговых ПЦР исследований позволит обеспечить необходимый уровень контроля за генно-инженерно-модифицированным (ГМ) картофелем в образцах пищевой продукции, кормов и семенного материала.

Ключевые слова: ГМ картофель; полимеразная цепная реакция; детекция ГМО; генетические маркеры.

На основании анализа баз данных ISAAA, CERA, GMO-compass, OECD, Biosafety Scanner и др., было показано, что в настоящее время в мире зарегистрировано 40 линий ГМ картофеля, причем его культиви-

рование разрешено только в США (33 линии), Канаде (22 линии) и Европейском Союзе (3 линии). Для производства пищевой продукции в США разрешены 37 линий, в Канаде – 24, в Мексике – 13, в Новой Зеландии – 10, в Южной Корее – 8, в Японии – 8, в Европейском Союзе – 3. Для производства кормов в США разрешены – 37 линий, в Канаде – 22, в Европейском Союзе –3, в Южной Корее – 1.

Основной целью модификации генома картофеля является придание им устойчивости к насекомым-вредителям и болезням, вызывающим значительные потери на этапе выращивания, а также изменение химического состава клубней и повышение потребительских свойств. Более 30 из существующих ГМ линий картофеля содержат ген Cry3A, определяющий устойчивость к колорадскому жуку и другим жесткокрылым насекомым-вредителям, 10 ГМ линий – ген pPhl, обуславливающий снижение содержания в клубнях редуцирующих сахаров, 6 линий – гены pvy-cp, детерминирующие резистентность к Y-вирусу картофеля.

Следует отметить, что целый ряд линий ГМ картофеля, существующих в настоящее время, был получен с помощью трансформации одним и тем же вектором, несущим один целевой ген, следовательно, определение такого количества трансформационных событий с помощью событие-специфичных тест-систем нецелесообразно. Наиболее эффективной стратегией скрининговых исследований картофеля представляется выбор комбинации событие-специфичных и элемент-специфичных тест-систем, позволяющей детектировать максимально возможное количество линий ГМ картофеля в рамках одного анализа.

Среди генетических элементов, входящих в состав трансформирующих векторов для картофеля, наиболее часто встречаются: целевые гены Cry3A и pvy-cp, маркерный ген nptII, промоторы p35S, pNOS, FMV и pSSuAra, терминаторы tNOS и tE9, антисмысловые последовательности генов Ppo5, asn1, gbss.

Генетические элементы Ppo5, asn1, gbss, а также их нативные промоторы нецелесообразно использовать в качестве маркеров для детекции, так как они являются природными последовательностями картофеля и будут определяться в любых образцах, содержащих картофель. Гены белков оболочки вирусов картофеля также могут с большой вероятностью находиться в немодифицированных сортах, если в растении персистирует соответствующий вирус, поэтому их использование для детекции ГМ линий картофеля также нецелесообразно.

В качестве эффективной стратегии контроля за ГМ картофелем была выбрана комбинация событие-специфичных и элемент-специфичных тест-систем, позволяющей детектировать максимально возможное количество линий ГМ картофеля в рамках одного анализа. Элемент-специфичные тест-системы будут направлены на определение целевых генов Cry3A и pvy-cp, маркерного гена nptII, промоторов p35S, pNOS, FMV и pSSuAra, терминаторов tNOS и tE9. Событие- специфичные тест-системы будут использованы для выявления и идентификации тех линий ГМ картофеля, которые не содержат вышеперечисленные генетические элементы и не могут быть выявлены в рамках скринига. В настоящее время к таким линиям относятся W8, X17, Y9, производства J.R. Simplot Co.

Таким образом, на основании проведенного анализа был предложен оптимальный набор генетических маркеров, детекция которых в рамках скрининговых ПЦР исследований позволит обеспечить необходимый уровень контроля за ГМ картофелем в образцах пищевой продукции, кормов и семенного материала.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №16-16-04123.

FORMATION OF GENETIC MARKERS PANEL FOR GM POTATO DETECTION IN THE SAMPLES OF FOOD, FEED AND SEED

Frantcuzov P. A., Golomidova A. K., Sadykova E. O., Tyshko N. V., Shestakova S. I

Federal State Institution of Science «Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety» Moscow, Russia 109240 Moscow, Ustinsky Proezd, 2/14

The optimal set of genetic markers, the detection of which in the scope of a screening PCR studies would provide the necessary level of control over genetically modified (GM) potato in the samples of food, feed and seed, has been recommended

Key words: GM potato; polymerase chain reaction; GMO detection; genetic markers.

Based on the analysis of databases, including ISAAA, CERA, GMO-compass, OECD, Biosafety Scanner, etc, it was shown that at the present time there were registered 40 lines of GM potato in the world. The cultivation is allowed only in the United States (33 lines), Canada (22 lines), and the European Union (3 lines). For the production of food there were allowed 37 lines of GMO potato in the U.S., 24 in Canada, 13 in Mexico, 10 in New Zealand, 8 in

South Korea, 8 in Japan, 3 in the European Union. For feed production there were allowed 37 lines in the U.S.A., 22 in Canada, 3 in the European Union, 1 in South Korea.

The main goal of the potato genome modification is to give them resistance to insect pests and diseases, which are of causing significant losses at the stage of cultivation.The second goal is to change a chemical composition of tubers and increase the consumer properties of potato. More than 30 of the existing GM potato lines contain Cry3A gene that determines resistance to Colorado beetle and other Coleoptera insect pests, 10 GM lines contain gene pPhl, that provides to decrease the content of reducing sugars in tuber, 6 lines contain pvy-cp genes of, which determin the resistance to Y- virus in potato.

It is important to notice that at present time a number of lines of GM potatoes were obtained via transformation with the same vector, therefore, the definition of such a number of transformational events by using of event-specific test systems is inappropriate. The most effective strategy for screening research seems to be a combination of event-specific and element-specific test systems, which allow to detect the maximum possible number of lines of GM potato within one analysis.

Among the genetic elements which are included in the potato transformation vectors, the most common are target genes Cry3A and pvy-cp, nptII marker gene, promoters p35S, pNOS, pSSuAra and FMV, terminators tNOS and tE9, gene antisense sequence Ppo5, asn1, gbss.

The genetic elements such as Ppo5, asn1, gbss and their native promoters is unreasonable to use as markers for detection, because they are natural sequences of potato and they will be determined in all potato - containing. Genes of potato shell viruses are likely to be in unmodified potato lines, if the corresponding virus persists in the plant, therefore their use for detection of GM potato lines is inappropriate either.

As an effective control strategy for the GM potato detection a combination of event-specific and element-specific test systems, which allowing to detect the maximum possible number of lines of GM potato in the same analysis has been chosen. Element-specific test systems will be aimed at identifying of target genes Cry3A and pvy-cp, nptII marker gene, promoters p35S, pNOS, pSSuAra and FMV, tNOS terminator, and tE9. Event-specific test system will be used to locate and identify lines of GM potatoes that do not contain the above-mentioned genetic elements and cannot be identified through screening research. At the present time, such lines are W8, X17, Y9 (J. R. Simplot Co.)

Thus, on the basis of the analysis, the optimal set of genetic markers, the detection of which in the scope of a screening PCR studies would provide the necessary level of control over GM potato in the samples of food, feed and seed, has been recommended.

The project was funded by the Russian Science Foundation grant № 16-16-04123.

УДК 612.398.1:57.042+612.064:612.084

МОДИФИКАЦИЯ ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА РАЦИОНОВ КАК МОДЕЛЬ СНИЖЕНИЯ АДАПТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА КРЫС

Никитин Н.С., Требух М.Д., Тышко Н.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт питания», Москва, Россия 109240, Москва, Устьинский проезд, дом 2/14
e-mail: tnv@ion.ru

Сформирована графическая оценочная шкала «доза-риск», которая позволяет определить пороговые значения содержания в эссенциальных веществ в рационе, предназначенная для направленного повышения их чувствительности к воздействию токсических факторов

Ключевые слова: токсикологические исследования, модель эксперимента, дефицит эссенциальных веществ

Разработана модель снижения адаптационного потенциала лабораторных животных, предназначенная для направленного повышения их чувствительности к воздействию токсических факторов. Действие данной модели обусловлено модификацией пищевого статуса за счет последовательного снижения обеспеченности эссенциальными веществами, входящими в состав витаминно-минерального комплекса рациона крыс. Для целей данного исследования был использован дефицит минеральных веществ – железа и магния, и витаминов группы В – тиамина (В1), рибофлавина (В2), ниацина (В3), пиридоксина (В6), как прямо, так и опосредованно влияющих на состояние адаптационного потенциала.

На основании результатов 1-й серии исследований, в которых были изучены показатели, характеризующие физиолого-биохимический статус животных, получавших рационы с 100, 75, 50, 25 и 0%-м содер-

жанием вышеперечисленных эссенциальных веществ, был сформирован дизайн эксперимента 2-й серии, предназначенного для выявления диапазона минимально возможного (от 0% до 25%) содержания в рационе витаминов и минеральных веществ, не приводящего к развитию патологии и обеспечивающего наименьший уровень адаптационного потенциала. Проведенные расчеты, основанные на принципе степенной зависимости, позволили определить соответствующие значения обеспеченности как 21,37%, 9,94%, 4,62% и 2,15%.

В каждом эксперименте были изучены зоометрические, гематологические, биохимические, морфологические показатели, а также показатели антиаксидантного и иммунного статуса, показатели активности апоптоза.

На основании полученных результатов была сформирована графическая оценочная шкала «доза-риск», которая позволила определить пороговые значения содержания в эссенциальных веществ в рационе: их содержание в количестве менее 9% соответствовало уровню риска развития патологии выше 50%, в количестве 9-12% – уровню риска от 50% до 25%, в количестве 13-24% – уровню риска выше 5%, в количестве выше 25% – уровню риска менее 5%. Были установлены три дозировки эссенциальных веществ, обеспечивающие последовательное снижение адаптационного потенциала у лабораторных животных. Эти дозировки, с определенной степенью условности обозначенные как «оптимальная», «маргинальная» и «субмаргинальная», составляли 75, 30 и 19% для самцов, и 75, 28 и 18% для самок, соответственно.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №16-16-00124.

MODIFICATION OF VITAMIN AND MINERAL DIET COMPOSITION AS A MODEL OF ADAPTIVE POTENTIAL REDUCING IN RATS

Nikitin N. S., Trebukh M.D, Tyshko N. V.

Federal State Institution of Science «Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety» Moscow, Russia 109240 Moscow, Ustinsky Proezd, 2/14

Graphic rating scale «dose-risk» was generated, it allows you to define threshold values of the content of essential substances in the diet that is designed for the directional enhancement of their sensitivity to exposure to toxic factors.

Key words: toxicological studies, model of experiment, essential substances

The model of adaptive potential reducing, which is directed to increase the laboratory animal sensitivity to the toxic factors, has been developed. The action of the model is due to nutritional status modification by consistent reduction of essential substances content in the vitamin-mineral mix of rodent diet. For the purpose of this study the deficiency of mineral substances – iron and magnesium, and B group vitamins – thiamine (B1), Riboflavin (B2), Niacin (B3), pyridoxine (B6), both directly and indirectly affecting adaptive potential, was used.

Based on the the first series of experiments results analysis, where the indicators of physiological biochemical status of laboratory animals had investigated (animals had fed diets with 100, 75, 50, 25 and 0% content of the above mentioned essential substances), the design of preparatory experiment was formed. The second series of experiments was aimed for detection of vitamins and minerals smallest possible range (from 0% to 25%), that provides the lowest level of adaptive potential and not causing the pathology development. The calculations are based on the principle of decoupling it possible to determine the relevant importance of ensuring a 21.37%, 9.94%, 4.62% and 2.15%.

The rating scale graph «dose-risk» was generated on the basis of the results. The scale was used to determine threshold values of essential substances: the content in an amount of less than 9% corresponded with the risk level above 50%, in the amount of 9-12% corresponded with the risk level from 50% to 25%, in the amount of 13-24% corresponded with risk level above 5%, in an amount above 25% corresponded with the risk level less than 5%. Taking into account the risk of pathology development, three dosages of essential substances have been established – «optimal», «marginal» and «submarginal», which provide consistent decline of adaptive potential and increase of the sensitivity to the toxic factors: 75, 30 and 19% for males and 75, 28 and 18% for females, respectively.

The project was funded by the Russian Science Foundation grant №16-16-00124.

УДК 582.287.237

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА INONOTUS OBLIQUUS НА ТВЕРДЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Уразлина Л.Н., Ахмеджанов И.Д., Хабибрахманова В.Р., Сысоева М.А.

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия
420015, Казань, ул. Карла Маркса, 68
e-mail: industrious.64@mail.ru

Проведено исследование влияния различных сред на скорость роста штамма гриба Inonotus obliquus. Показано, что при добавлении в среду березовых опилок происходит увеличение скорости роста культуры в 2 раза. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования березовых опилок в качестве стимулирующего фактора.

Ключевые слова: чага, твердофазное культивирование, ростовой коэффициент.

Базидиальный гриб Inonotus obliquus (Pers.:Fr.) Pilat чага – это продукт бесплодной стадии жизнедеятельности дереворазрушающего гриба, паразитирующего на стволах деревьев, главным образом на берёзе. Из него могут быть получены меланин, фракции полисахаридов, липофильных и фенольных веществ, которые широко известны как онкопротекторы, антиоксиданты, адоптагены и иммуномодуляторы [1].

Одним из направлений в получении биологически активных веществ чаги является использование штаммов этого гриба и подбор условий их культивирования. Известны работы, в которых, где основным источником углерода среды при культивировании чаги является глюкоза. Широко используют растительные отвары, такие как картофельный и овсяный. Культивирование гриба на перечисленных средах не позволяет получить высокий выход биомассы и биологически активных веществ. Это может быть связано с тем, что в этих средах не хватает определенных стимулирующих ростовых веществ. В процессе своей жизнедеятельности чага активно потребляет различные компоненты древесины. В частности, на основе лигнина чага синтезирует меланин, который является основным её действующим компонентом. В работе [2] предложено внесение березовых опилок в среду для культивирования чаги. Показано, что происходит накопление в биомассе гриба меланина, идентичного природному, однако процесс выращивания длителен (от 6-14 мес.).

Цель работы – подбор оптимальной питательной среды для твердофазного культивирования штамма Inonotus obliquus «SUB2092728» с высокой скоростью роста и сокращением времени выращивания.

В работе использован штамм, выделенный из чаги, собранной в лиственничных лесах республики Марий Эл, Звениговского района [3]. При получении чистой культуры гриба была применена глюкозо-картофельная среда, которая также использовалась и для исследования его скорости роста. Для увеличения эффективности культивирования гриба в качестве активатора роста и дополнительного источника питательных и биологически активных веществ, в нее вносили 1% березовых опилок от общего объема среды. Культивирование осуществляли в течение 20 сут. при температуре 26 °С. Через каждые 6 дней оценивали морфологические признаки колоний и ростовые показатели.

Показано, что на использованных средах наблюдается рост культуры гриба, но с различной скоростью. На протяжении всего срока культивирования ростовой коэффициент культуры, выращенной на среде с опилками (61,43±1,23), больше в 2 раза по сравнению с использованием среды без них (39,90±0,98). По-видимому, это объясняется тем, что опилки содержат компоненты, в частности фенольные соединения, которые гриб в процессе своего метаболизма использует для своего развития. Об этом свидетельствует и то, что при выращивании культуры на среде с опилками наблюдается образование плодового тела.

Таким образом, показано стимулирующее действие добавления в питательную среду березовых опилок на рост и развитие гриба Inonotus obliquus при твердофазном культивировании.

Литература.
1. Weifa Z., Kangjie M. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of Inonotus obliquus and submerged culture strategies for up-regulating their production//Appl Microbiol Biotechnol. 2010. №87. P 1237-1254.
2. Низовская О.П. и др. Условия образования пигментного комплекса чаги в искусственной культуре // Микробиология. – 1960. – Вып. 3. Т XXIX – С. 441-445.
3. Уразлина Л.Н. и др. Получение штамма базидиального гриба inonotus obliquus // Пищевые технологии и биотехнологии: тезисы докл. XV Междунар. конф. (Казань, 13-14 апр. 2016 г.). – Казань, 2016. – С. 245-247.

УДК 582.287.237

EFFICIENT OF CULTIVATION OF THE STAIN INONOTUS OBLIQUUS ON THE SOLID MEDIUM.

Urazlina L.N., Akhmedzhanov I.D., KHabibrakhmanova V.R., Sysoeva M.A.

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia
420015, Kazan, 68 Karl Marx St.
e-mail: industrious.64@mail.ru

One of the direction of biological active components obtaininig from chaga is the selection and cultivation of chaga strains in various conditions. The influence of different culture media on the growth rate of fungus Inonotus obliquus was inverstigated. It was shown, that addition of the brich sawdust to the medium double growth rate of the cultured strain. The obtained efficiency of using brich sawdust as growth factor.

Key words: Chaga, solid-substrate, cultivation, growth factor.

Basidiomycete Inonotus obliquus (Pers.:Fr.) Pilat Chaga – is a sterile form of timber fungus, parasitic upon tree trunks, primary upon brich. It could be the one of the sources of the melanin and different biologically active fractions of polysaccharides, lipophilic and phenolic compounds that widely used as cancer protectors, antioxidants, immunomodulators and adoptagens [1].

There are known studies, in wich glucose as basic carbon source for chaga cultivating was used. Also vegetable broths (potato, oatmeal) as medium elements was practiced on a wide scale. Chaga cultivation on these mediums and does not provide high yield of biomass and nature-identical melanin biological active substans. It could be associated with the deficiency of certain growth stimulating substances in these culture medium. Parasitizing on brich, chaga metabolize different wood substances. Particularly, lignin is one of the primary components from wich chaga synthesizes it is main active constituent – melanin. In the article [2] was suggested wood shredding addition to the medium for chaga cultivation. Accumulation in biomass of nature-identical melanin was show. But the process of the cultivation was overlong (6-14 mouths).

The purpose of this work is the selection of the optimized culture medium for increasing the growth rate and reducing the growth time solid-substrate fermentation of Inonotus obliquus strain «SUB2092728».

The strain isolated from chaga mushrooms in deciduous forests in Zvenigovsky area (Mari El, Russia) [3]. Pure culture preparation was obtained on glucose-potato media. It was also used for the growth rate investigation. For the efficiency increasing of the chaga cultivation as a growth activator and additional source of nutrient biologically active components the birch sawdust were used (1% of the total volume of medium). The cultivation was carried out for 20 days at 26 ºC. The morphological characteristics of the colonies and growth indicators were evaluated every 6 days.

It was shown, that used medium provide culture growth, but at different velocity.

Throughout the entire period of cultivation a growth factor of the culture witch was growing on the media with sawdust (61,43±1,23) was twofold more than same without sawdust (39,90±0,98).

This can be explained by the presence of various ingredients in sawdust, particularly phenolic compounds, that chaga metabolizes for the growth and development. This is evidenced by the the formation of fruit bodies during cultivation on medium with sawdust.

Thereby, the stimulating effect of birch sawdust as additive to the nutrient medium on the growth and development of the Inonotus obliquus in solid substrate was shown.

References:
1. Weifa Z., Kangjie M. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of Inonotus obliquus and submerged culture strategies for up-regulating their production // Appl Microbiol Biotechnol. 2010. №87. P 1237-1254.
2. Низовская О.П. и др. Условия образования пигментного комплекса чаги в искусственной культуре // Микробиология. – 1960. – Вып. 3. Т XXIX – С. 441-445.
2. Urazlina L.N. and etc. Getting the strain basidiomycete inonotus obliquus // Food Technology and Biotechnology: Abstracts. XV Intern. Conf. (Kazan, April 13-14. 2016). - Kazan, 2016. - P. 245-247.

УДК 663.11: 664.22: 66.081.6

КАРТОФЕЛЬНЫЙ СОК – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СУБСТРАТ И ПРОДУКТЫ МИКРОБИОСИНТЕЗА НА ЕГО ОСНОВЕ

Кудряшов В.Л.[1], Погоржельская Н.С.[1], Лукин Н.Д.[2], Лукин Д.Н.[2]

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, Москва, ул. Самокатная, 4б. e-mail: vera_vikir@mail.ru
[2] Всероссийский НИИ крахмалопродуктов, Московская обл., Россия
140051, Московская обл., Красково- 1, Некрасова, 11. e-mail: vniik@arrisp.ru

Показана целесообразность и направления использования картофельного сока в составе субстратов для микробиосинтеза. Приведена технологическая схема переработки картофельного сока в кормовые добавки за счет оптимального сочетания мембранных и биотехнологических процессов.

Ключевые слова: мембранные процессы; ультрафильтрация; обратный осмос; картофельный сок; кормовые дрожжи; субстрат; микробиосинтез

Основную часть в себестоимости продуктов микробиосинтеза часто составляют затраты на субстраты. Наши эксперименты и анализ показали, что как основной их компонент целесообразно использовать картофельный сок (КС), являющийся вторичным сырьем картофелекрахмальных заводов. В нем содержатся (в%-ах на а.с.в.): крахмал – 10 ; растворимые углеводы - 24; минеральные в-ва и микроэлементы – 14; азотистые вещества - 35 (содержат до 22 аминокислот, включая все незаменимые), а также витамины С, Е, РР, группы В, инозит, биотин, фолиевая и пантотеновая кислоты. Видно, что КС содержит практически все биологически активные вещества (БАВ) необходимые микроорганизмам [1].

Во ВНИИК совместно с ВНИИПБТ создана основанная на мембранных процессах (МП) технология [2] очистки, стерилизации и концентрирования КС с производством из него сиропообразного ультраконцентрата (УК КС) [2].

Состав БАВ входящих в УК КС близок к составу широко используемого в субстратах упаренному кукурузному экстракту, поэтому он также может использоваться в биологических производствах. Кроме того, УК КЭ рекомендуется для обогащения белком продуктов питания так как состав его белка и усвояемость превосходят все растительные и животные белки, уступая только яичному [1;2]. Ниже на примере производства кормовых дрожжей приведена блок-схема гибридной линии производства кормовых дрожжей на основе совмещения микробиосинтеза и двух МП: ультрафильтрации (УФ) и обратного осмоса (ОО).

1 и **3** – мембранные УФ - и ОО установки; **2**- биореактор; **4** – сушилка

В линии из нативного КС с помощью УФ вначале выделяются и концентрируются обычно не усваиваемые микроорганизмами высокомолекулярные БАВ. Часть пермеата (содержащего низкомолекулярные БАВ и стерилизованного с помощью УФ) используется в качестве субстрата для биосинтеза, например – дрожжей. Последние и остальная часть УФ пермеата глубоко концентрируются в ОО установке и затем высушиваются совместно с УФ концентратом и мезгой. Для небольших производств используются биореакторы с самовсасыванием воздуха.

В качестве продуцента целесообразно использовать быстро растущий неприхотливый штамм Candida tropicalis СК-4. Для нужд пищевой промышленности и кормопроизводства целесообразно также выращивать: коринеформные бактерии Cellulomonas (утилизирующие целлюлозу); синтезирующие β-каратин

дрожжи (Rhadotorula, Sporobolomyces, Rhodosporidium, Sporidiololus); микроорганизмы, синтезирующие незаменимые аминокислоты - L-лизин, L-треонин, L-триптофан и L-глутаминовую кислоту (шт. Coryn. glutamicum, Brev. flavum, C.utilis и др.).

Линия позволяет производить и синбиотики: «пробиотик + пребиотик + кормовой белок из КС» с бактериями L. Acidophilus и B. Subtilis.

Литература.
1.Стахеев И.В., Коломиец Э.И., Здор Н.А. Биотехнология малотоннажного производства микробного протеина. - Мн.: Навука і тэхніка. 1991. 264 с.
2. Лукин Н.Д., Кудряшов В.Л. Совместимые технологии производства кормовых и пищевых добавок из побочных продуктов картофелекрахмальных заводов и биомассы трав // Достижения науки и техники АПК.- 2015. - № 11. - С. 112 – 114

.....

UDC 663.11: 664.22: 66.081.6

POTATO JUICE – THE PERSPECTIVE SUBSTRATUM AND THE MICROBIOSYNTHESIS PRODUCTS ON ITS BASIS

Kudryashov V.L. [1], Pogorzhelskaya N.S. [1], Lukin N.D. [2], Lukin D.N. [2]

[1] Russian research Institute of food biotechnology is a branch of Federal state budget institution of science Federal research center of food, biotechnology and food safety, Moscow, Russia
111033, Moscow, Samokatnaya St., 4b. e-mail: vera_vikir@mail.ru
[2] All-Russian Research Institute of Starch Products, Moscow Region, Russia
140051, Moscow Region, Kraskovo-1, Nekrasova, 11. e-mail: vniik@arrisp.ru

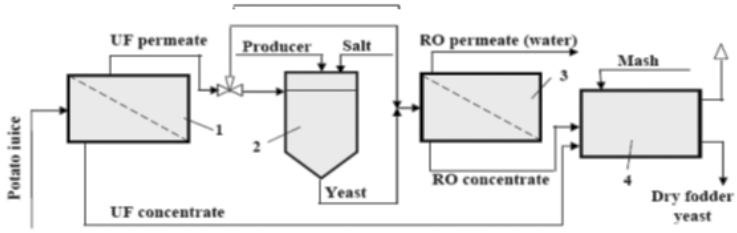
Expediency and the using trends for potato juice as the part of substrata for microbiosynthesis are shown. The flow diagram of processing potato juice for feed additives by optimum combination of membranous and biotechnological processes is given.

Key words: membranous processes; ultrafiltration; inverse osmosis; potato juice; fodder yeast; substratum; microbiosynthesis.

The main part in cost price a microbiosynthesis products is often made by costs of substrata. Our experiments and the analysis showed that it was expedient to use potato juice (PJ) as their main component, which is the secondary raw material at potato starch plants. The PJ contains (as% DS): Amylum – 10; soluble carbohydrates – 24; mineral matters and microelements – 14; nitrogenous substances – 35 (containing up to 22 amino acids, including all irreplaceable), and also C, E, PP vitamins, B groups, inosite, biotin, folic and pantothenic acids. It is obvious that PJ contains practically all the biologically active materials (BAM) necessary for microorganisms [1].

In VNIIK together with VNIIPBT it is created the technology of cleaning, sterilization and concentrating of PJ based on membranous processes (MT) for the production of ultraconcentrate (UC PJ) from it in syrup form [2].

The structure of BAM entering UC PJ is close to the structure of a cooked corn extract widely used in substrata. Therefore, it can be also used in biological productions. Besides, UC CE is recommended for enrichment of food by protein as its protein composition and digestibility exceed all vegetable and animal proteins, conceding only the protein egg [1; 2]. As the example for the production of fodder yeast there is a flowchart of a hybrid production line of fodder yeast on the basis of a combination of micro biosynthesis and two MP given below: ultrafiltration (UF) and reverse osmosis (RO).



1, 3 – membrane UF and RO installation; **2** - bioreactor; **4** – druer

In the line from native PJ by means of UF the high molecular BAM, which are usually not digested by microorganisms are separated and concentrated at the beginning. A part of the permeat (containing low-molecular BAM and sterilized with UF) is used as a substratum for a biosynthesis, for example of yeast. The last and other part of a UF permeat are deeply concentrated in the OO unit and then are dried together with the UF concentrate and pulp. Bioreactors with an air self-absorption are used for low productions.

As a producer it is expedient to use quickly growing simple strain of Candida tropicalis SK-4. For needs of the food industry and a forage production it is also usable to grow up: the root-shaped bacteria Cellulomonas (utilizing cellulose) the synthesizing β-Carotinum yeast (Rhadotorula, Sporobolomyces, Rhodosporidium, Sporidiololus); the microorganisms synthesizing irreplaceable amino acids L-lysine, L-threonine, an L-tryptophan and L-glutamic acid (Coryn piece. glutamicum, Brev. flavum, Cutilis, etc.).

The line ensures to make sinbiotiks: «a probiotic + prebiotic + fodder protein from PJ» with bacteria L. Acidophilus and B. Subtilis.

References:
1. Stakheev I. V., Kolomiyets E. I., Zdor N. A. Biotechnology of low-tonnage production of a microbial protein./Mn.: Science and Technology// 1991. 264 pages.
2. Lukin N. D., Kudryashov V. L. Compatible productions technology of fodder and nutritional supplements from by-products of potato starch plants and herb biomass//Achievements of science and technology of Agrarian and Industrial Complex. 2015. No. 11. Page 112-114.

УДК 663.12:579.67

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ВОДЫ НА МИКРОБНУЮ КОНВЕРСИЮ КОНЦЕНТРИРОВАННОГО ЗЕРНОВОГО СУСЛА В ЭТАНОЛ

Оверченко М.Б., Серба Е.М., Римарева Л.В., Белокопытова Е.Н., Антонова А.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д.4-Б,
E-mail: serbae@mail.ru

Исследовано влияние воды и зерновых сред с различным ионным составом на процесс спиртового брожения и образование побочных метаболитов, сопутствующих синтезу этанола.

Ключевые слова: спиртовое брожение, вода, побочные метаболиты, зерновые среды

При производстве спирта для приготовления зернового сусла на предприятиях отрасли используется в значительных объемах природная вода, в которой содержание солей может различаться в тысячи раз в зависимости от природных и климатических условий. Поэтому составу воды следует уделять определенное внимание. Образцы пшеничного сусла, приготовленные на воде различной жесткости, исследовали на наличие в них ионов металлов, анионов неорганических и органических кислот [1]. Ионный состав воды, используемой для приготовления сусла, несущественно влиял на концентрации анионов неорганических и органических кислот и катионов в пшеничном сусле, которые незначительно отличались друг от друга, поскольку они поступали в среду, основном, из зернового сырья. При использовании минеральной воды для приготовления зернового сусла наблюдалось повышение концентрации ионов хлора (в 2,7-3,0 раза), натрия (в 19-24 раза) и снижение ионов магния в сусле (в 1,4-1,8 раза), т.к. эти ионы в значительном количестве присутствуют в исходном образце воды.

Изучено влияние воды с различным минеральным составом и жесткостью на процессы биокаталитической деструкции полимеров концентрированного пшеничного сусла различными ферментативными комплексами: деионизованной воды (0,0 Ж°), природной воды (1,7 Ж°), водопроводной воды (3,1 Ж°), смесь водопроводной воды и высокоминерализированной – 4:1 (6,9 Ж°). Снижение жесткости и степени минерализации воды, используемой для замеса зернового сырья, позитивно сказывалось на результатах биокаталитического гидролиза углеводных и белковых полимеров зернового сырья и, соответственно, процесса сбраживания сусла. При этом использование деионизованной воды с нулевой жесткостью снижало эффективность действия ферментативных систем на процесс гидролиза полимеров зернового сусла. Таким образом, наилучшие показатели качества зернового сусла получены при использовании

воды с величиной жесткости 1,7-3,1 Ж°.

Состав подготовленного пшеничного сусла с использованием различных образцов воды оказывало влияние на культуральные свойства дрожжей Saccharomyces cerevisiae: наблюдалось замедление процесса дрожжегенерации на сусле, приготовленном на воде с повышенным соляно-щелочным балансом. При этом отмечено также замедление процесса сбраживания сусла, которое происходило недостаточно полно, и к концу брожения концентрация остаточных углеводов составила 2,35 г/100см3, спирта – 12,8%об. против вариантов, где для приготовления сусла использовали образцы воды меньшей жесткостью: концентрация остаточных углеводов к концу брожения составила 0,52-0,62 г/100см3, спирта 14,8-14,9%об. Исследовали влияние воды различной жесткости, используемой при приготовлении концентрированного пшеничного сусла, на образование побочных метаболитов, сопутствующих синтезу этанола, в процессе его сбраживания осмофильными дрожжами S. cerevisiae 1039 [2,3]. Наибольшее количество метаболитов к концу брожения синтезировалось при использовании воды с высоким соляно-щелочным балансом – 7274 мг/дм3 против 4807-5240 мг/дм3 за счет увеличения синтеза высших и ароматических спиртов.

Таким образом, при приготовлении концентрированного пшеничного сусла следует использовать воду с пониженным соляно-щелочным балансом со степенью минерализации не более 3,5 мг/ дм3, что способствует эффективному действию ферментативных систем при биокатализе растительных полимеров, нормальному развитию и метаболизму осмофильных дрожжей S. cerevisiae, обеспечивает повышение выхода спирта и снижение образования побочных метаболитов.

Литература.

1. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Шелехова Н.В., Серба Е.М., Мартыненко Н.Н. Исследование ионного состава питательной среды в процессе генерации спиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae с осмофильными свойствами // Хранение и переработка с/х сырья. - 2016. - № 3. - С. 41-44.

2. A. Avilova, S. G. Vasil'ev, L. V. Rimareva, E. M. Serba, L. D. Volkova, and V. I. Volkov. Water Metabolism in Cells of Saccharomyces Cerevisiae of Races Y-3137 and Y-3327, According to Pulsed-Field Gradient NMR Data // ISSN 0036-0244, Russian Journal of Physical Chemistry A, 2015. - Vol. 89, No. 4. - P. 710–714.

3. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Шелехова Н.В., Серба Е.М., Мартыненко Н.Н., Кривова А.Ю. Накопление метаболитов дрожжами Saccharomyces cerevisiae 1039 при культивировании на зерновом сусле // Хранение и переработка с/х сырья. - 2016. - № 5. - С. 23-27.

UDC 663.12:579.6

THE INFLUENCE OF WATER COMPOSITION ON THE MICROBIAL CONVERSION OF CONCENTRATED MASH OF GRAIN INTO ETHANOL

Overchenko M. B., Serba E. M.,Rimareva L. V., Belokopytova E. N., Antonova A. A.

Russian research Institute of food biotechnology is a branch of Federal state budget institution of science Federal research center of food, biotechnology and food safety, Moscow, Russia
111033, Moscow, str. Samokatnaya, 4-B,
E-mail: serbae@mail.ru

It was investigated the influence of water and grain media with different ionic composition on the process of alcoholic fermentation and the formation of side metabolites related to the synthesis of ethanol.

Key words: alcoholic fermentation, the water, the side metabolites, grains environment

In the production of alcohol for cooking mash of grain at the enterprises of the industry used significant amounts of natural water in which the salt content can vary thousands of times, depending on natural and climatic conditions. Therefore, the composition of water should be given some attention. Samples of wheat wort, cooked in water with various hardness, were examined for the presence of metal ions, inorganic anions and organic acids. The ionic composition of the water used to prepare the wort, did not significantly affect concentrations of inorganic anions and organic acids and cations in wheat mash, which was not significantly different from each other, as they did Wednesday, mostly from grain raw materials. However, it should be noted that when used for cooking mash of grain of mineral water was an increase in the concentration of chloride ions (2.7-3.0 times), sodium (19-24%) and the decrease of magnesium ions in the wort (1.4-1.8 times), because these ions are in significant amounts present in the original water sample.

The influence of water with different mineral composition and stiffness on the processes biocatalytic degradation of polymers concentrated wheat mash of different enzymatic complexes: deionized water (W 0,0°), natural water (W 1,7°), tap water (W 3,1°), a mixture of tap water and highly mineralized – 4:1 (W 6,9°). Reduction of stiffness and degree of mineralization of water used for mixing the raw grain, had a positive effect on the results

of the biocatalytic hydrolysis of carbohydrate and protein polymers of grain raw materials and, accordingly, the process of fermentation. The use of deionized water with zero hardness reduces the effectiveness of the enzyme systems for the hydrolysis process polymers of the grain wort. Thus, the best indicators of quality of grain the wort obtained when using water with a hardness value of 1.7 and 3.1 W°.

The composition of wheat mash prepared using different water samples influenced the cultural character of the yeast Saccharomyces cerevisiae: has slowed the process of jorgegarcia on the wort, cooked in water with a high salt-alkaline balance. This marked a slowing of the process of fermentation, which was insufficiently, and by the end of the fermentation, the residual concentration of carbohydrates was 2.35 g/100cm3, alcohol is 12.8%. against the options, where for the preparation of wort using samples of water of less hardness: the concentration of residual carbohydrates by the end of the fermentation was 0.52-0.62 g/100cm3, alcohol 14,8-14,9 vol.%. Investigated the effect of water of different hardness used in the preparation of concentrated wheat wort, the formation of side metabolites related to the synthesis of ethanol, in the process of digestion osmiofilii yeast S. cerevisiae 1039. The greatest number of metabolites by the end of the fermentation were synthesized by using water with a high salt-alkaline balance – 7274 mg/dm3 against 4807-5240 mg/dm3 due to the increase of the synthesis of higher and aromatic alcohols.

Thus, in the preparation of concentrated wheat wort should use water with low salt-alkaline balance with a mineralization degree 3.5 mg/ dm3, which contributes to the effective operation of enzyme systems for biocatalysis of plant polymers, the normal development and metabolism osmophilic of S. cerevisiae ensures the increase of alcohol yield and reduced formation of side metabolites.

References:
1. Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Shelekhova N.V., Serba E.M., Martynenko N.N. The study of ion composition of the nutrient medium in the generation process of alcohol yeast Saccharomyces cerevisiae with osmofilic properties // Storage and processing of agricultural raw materials. - 2016. - No. 3. - P. 41-44.
2. Avilova A., Vasilyev S.G., Rimareva L.V., Serba E.M., Volkova L.D. and Volkov V.I. Water Metabolism in Cells of Saccharomyces Cerevisiae Races of Y-3137 and Y-3327, According to Pulsed-Field Gradient NMR Data // ISSN 0036-0244, Russian Journal of Physical Chemistry A, 2015. - Vol. 89, No. 4. - P. 710-714.
3. Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Shelekhova N.V., Serba E. M., Martynenko N.N., Krivova, A.Yu. Accumulation of metabolites by Saccharomyces cerevisiae 1039 when cultured in grain mash // Storage and processing of agricultural raw materials. - 2016. - No. 5. - P. 23-27.

УДК 577.15:636.087

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОБНЫХ ЭНДОПРОТЕАЗ ПРИ ГИДРОЛИЗЕ АНТИПИТАТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЭКСТРУДИРОВАННОГО СОЕВОГО ШРОТА

Середа А.С., Шариков А.Ю., Великорецкая И.А., Костылева Е.В., Нефедова Л.И., Веселкина Т.Н., Цурикова Н.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия, 111033, ул. Самокатная, 4б
e-mail: as.sereda@gmail.com

Исследована эффективность гидролиза экструдата соевого шрота коммерческими препаратами микробных эндопротеаз. Установлено, что сериновая эндопротеаза в сочетании с экструзионной предобработкой субстрата полностью устраняет антипитательные белки соевого шрота.

Ключевые слова: эндопротеазы, соевый шрот, экструзия

Соевый шрот (СШ), является перспективным источником белка для кормовых и пищевых целей. Однако, около 70% соевого белка представлено глицинином и β-конглицинином – термоустойчивыми, трудногидролизуемыми белками, оказывающими неблагоприятное воздействие на организм человека и животных [1]. Для их эффективного устранения требуется использование ферментных препаратов (ФП) протеаз эндо-действия с широкой субстратной специфичностью в сочетании с экструзионной предобработкой субстрата [1, 2].

Известно, что протеазы с разной субстратной специфичностью отличаются по способности к расщеплению трудногидролизуемых белковых молекул [3]. С целью выбора эндопротеазы, обеспечивающей наиболее полное устранение антипитательных соевых белков, исследовали эффективность гидролиза экструдата СШ различными препаратами микробных эндопротеаз. В работе использовали следующие ФП: Alcalase 2.4 L FG сериновая эндопротеаза Bacillus licheniformis (Novozymes A/S, Дания), Neutrase 0.8 L металлоэндопротеаза Bacillus amyloliquefaciens (Novozymes A/S, Дания), Acid protease аспартатная эндо-

протеаза Aspergillus niger (Beijing Challenge Biotechnology Limited company, Китай).

Экструзию СШ осуществляли с использованием двухшнекового экструдера Werner&Pfleiderer Continua 37 (Германия) при температуре 120ºС. Гидролиз экструдата проводили в течение 3 ч при температуре 50ºС, дозировке ФП 4 ед./г субстрата при pH 6,0 – 6,2 и гидромодуле 1:2. Эффективность гидролиза оценивали методом электрофореза высушенных гидролизатов в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ С ДДС-NA) в камере Protean II xi Cell 20 фирмы «BioRad» (США).

Полученные результаты показали, что при использовании ФП сериновой протеазы Alcalase 2.4 L FG был достигнут полный гидролиз белков СШ до пептидов с молекулярной массой ниже 15 кДа (рис. 1 вариант 2). Гидролизат, полученный после обработки ФП Neutrase 0.8 L, показал неполную конверсию белковых АПФ под действием металлоэндопротеазы, что подтверждается наличием на электрофореграмме полосы наиболее устойчивой к гидролизу субъединицы глицинина – основного полипептида В массой 20 кДа (рис. 1 вариант 3). ФП Acid protease, содержащий аспартатную эндопротеазу, не обладал способностью к гидролизу антипитательных соевых белков в условиях опыта (рис.1 вариант 4).

Таким образом, установлено, что наиболее эффективный гидролиз антипитательных белков экструдированного СШ обеспечивает сериновая эндопротеаза.

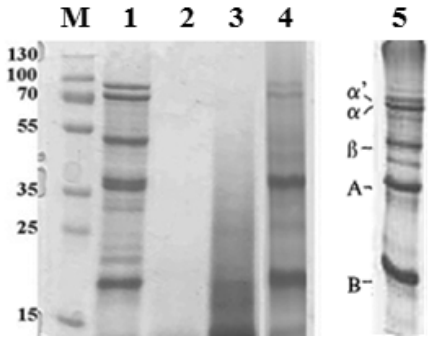


Рисунок 1. Электрофореграмма экструдата соевого шрота (1) и его гидролизатов, полученных при действии ФП: 2 – Alcalase 2.4 L FG; 3 – Neutrase 0.8 L; 4 – Acid protease; 5 - термостабильные антипитательные белки сои: α,, α и β – субъединицы β-конглицинина; (А) кислый и (В) основной полипептиды глицина

Литература.
1. Barać Miroljub B., Stanojević Slađana P., Jovanović Snežana T., Pešić Mirjana B. Soy protein modification: A review // Acta periodica technologica. 2004. V. 35. P. 3-16.
2. Marsman G.J.P., Gruppen H., Mul A.J. and Voragen A.G.J. In Vitro accessibility of untreated, toasted, and extruded soybean meals for proteases and carbohydrases // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. P. 4088-4095.
3. Handbook of Proteolytic Enzymes / Alan J. Barrett, Neil D. Rawlings, J. Fred Woessner (Eds). – 3rd Edition. Academic Press. 2012. 4094 p.

UDC 577.15:636.087

EFFICIENCY OF DIFFERENT MICROBIAL ENDOPROTEASES IN THE HYDROLYSIS OF ANTI-NUTRITIONAL PROTEINS OF EXTRUDED SOYBEAN MEAL

Sereda A.S., Sharikov A.Yu., Velikoretskaya I.A., Kostyleva E.V., Nefedova L.I., Veselkina T.N., Tsurikova N.V.

All-Russian Research Institute of Food Biotechnology – a branch of the Federal State Budget Institution of Science, Federal Research Centre of food, biotechnology, and food safety, Moscow, Russia, 111033, st. Samokatnaya, 4b
e-mail: as.sereda@gmail.com

The efficiency of extruded soybean meal hydrolysis by commercially available microbial endoproteases was studied. It was found that the serine endoprotease in combination with the extrusion pretreatment completely eliminates soybean meal anti-nutritional proteins.

Key words: endoproteases, soybean meal, extrusion

Soybean meal (SBM) is a promising source of protein for feed and food purposes. However, about 70% of the soy protein is represented by glycinin and β-conglycinin – heat-resistant, hardly hydrolysable proteins having

an adverse effect on human and animals [1]. For their effective elimination, the use of endo-proteases enzyme preparations (EP) with broad substrate specificity in combination with the extrusion pretreatment of the substrate is required [1, 2].

It is known that the ability to cleave hardly hydrolysable protein molecules depends on the protease substrate specificity [3]. In order to select the endoprotease providing complete elimination of anti-nutritional soy protein, the effectiveness of various microbial endoproteases preparations was examined in hydrolysis of the extruded SBM. We used the following EPs: Alcalase 2.4 L FG – Bacillus licheniformis serine endoprotease (Novozymes A / S, Denmark), Neutrase 0.8 L – Bacillus amyloliquefaciens metalloendoprotease (Novozymes A / S, Denmark), Acid protease – Aspergillus niger aspartic endoprotease (Beijing Challenge Biotechnology Limited company, China).

SBM was extruded at 120ºC using co-rotating twin-screw extruder Werner & Pfleiderer Continua 37 (Stuttgart, Germany). Hydrolysis of SBM extrudate was carried out for 3 hours at 50°C, pH 6.0 – 6.2, EP dosage – 4 units / g of substrate, substrate to water ratio of 1:2. Hydrolysis efficiency was evaluated by electrophoresis of the dried hydrolysates on a polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate (SDS PAGE C-NA) in the chamber Protean II xi Cell 20 («BioRad», USA).

The results showed that when using the serine protease EP – Alcalase 2.4 L FG, complete hydrolysis of SBM proteins into peptides with molecular weights lower than 15 kD was achieved (Fig. 1 option 2). The hydrolysate obtained using Neutrase 0.8 L showed incomplete conversion of anti-nutritional proteins under the action of metalloendoprotease, which is confirmed by the band of the most stable to hydrolysis glycinin subunit – the basic polypeptide of 20 kDa (Fig. 1 option 3). Acid protease EP containing aspartic endoprotease did not possess the ability to hydrolyze anti-nutritional soy proteins in experimental conditions (Fig. 1 option 4).

Thus, a serine endoprotease provides an effective hydrolysis of anti-nutritional proteins in extruded SBM.

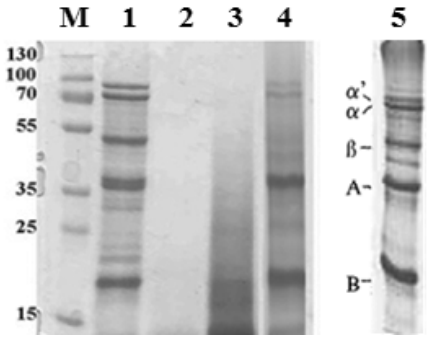


Figure 1. Electrophoregram of extruded soybean meal (1) and its hydrolysates obtained using: 2 – Alcalase 2.4 L FG; 3 – Neutrase 0.8 L; 4 – Acid protease; 5 – thermostable soybean anti-nutritional proteins: α,, α, and β – subunits of β-conglycinin; (A) acid and (B) basic polypeptides of glycinin

References:
1. Barać Miroljub B., Stanojević Slađana P., Jovanović Snežana T., Pešić Mirjana B. Soy protein modification: A review // Acta periodica technologica. 2004. V. 35. P. 3-16.
2. Marsman G.J.P., Gruppen H., Mul A.J. and Voragen A.G.J. In Vitro accessibility of untreated, toasted, and extruded soybean meals for proteases and carbohydrases // J. Agric. Food Chem. 1997. V. 45. P. 4088-4095.
3. Handbook of Proteolytic Enzymes / Alan J. Barrett, Neil D. Rawlings, J. Fred Woessner (Eds). – 3rd Edition. Academic Press. 2012. 4094 p.

УДК 663.5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАНОЛА В СПИРТНЫХ НАПИТКАХ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Шелехова Н.В., Римарева Л.В., Шелехова Т.М., Веселовская О.В., Скворцова Л.И, Полтавская Н.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
11033, г. Москва, Россия, ул. Самокатная, 4Б
e-mail: satella@mail.ru

С целью обеспечения оперативного контроля качества и безопасности алкогольной продукции разработана методика определения объемной доли метилового спирта в спиртных напитках методом газовой хроматографии. Методика может быть использована на предприятиях отрасли, а так же в арбитражных лабораториях для выявления фальсифицированных спиртных напитков. Применение разработанной методики позволит повысить качество и безопасность алкогольной продукции.

Ключевые слова: газохроматографический метод анализа, контроль, качество, безопасность, алкогольная продукция, спиртные напитки, объемная доля метилового спирта, метанол

В настоящее время выпускается более 500 наименований спиртных напитков, поэтому контроль их качества и безопасности требует разработки современных аналитических методик[1-3]. Метиловый спирт обладает высокой токсичностью, и по запаху и вкусу он не отличим от этилового спирта[4].

Целью проведенного исследования являлась разработка методики определения объемной доли метилового спирта в спиртных напитках. Исследования выполняли на газовых хроматографах отечественного и зарубежного производства, оснащенных пламенно-ионизационным детектором.

Для проведения исследований по подбору режимных параметров газового хроматографа и разработки методики приготовления градуировочных растворов приготовлены модельные растворы объемной долей метилового спирта в пересчете на безводный спирт в диапазоне измерений от 0,003% до 0,120% об.

Подобраны условия хроматографирования, обеспечивающие количественное и качественное определение метанола: температура детектора, температура испарителя, коэффициент деления потока, температура термостата колонок, скорость потока газа носителя, скорость потока водорода, скорость потока воздуха, объем пробы.

В результате проведенных исследований разработана методика, позволяющая определять содержание метилового спирта в спиртных напитках. Показатель точности методики составляет 22-28%. Разработанная методика легла в основу межгосударственного стандарта ГОСТ 33833-2016 «Напитки спиртные. Газохроматографический метод определения объемной доли метилового спирта» [5].

С применением разработанной методики проведены газохроматографические исследования более 37 образцов спиртных напитков. Проведенные исследования подтвердили высокую эффективность разработанной методики.

Применение разработанной методики на предприятиях отрасли и в контролирующих лабораториях будет способствовать повышению безопасности и качества алкогольной продукции.

Литература.
Шелехова Т.М. Контроль качества алкогольной продукции и биотехнологических процессов переработки сельскохозяйственного сырья с использованием хромато-масс-спектрометрических, газохроматографических и электрофоретичеких методов анализа/ Т.М. Шелехова, Н.В. Шелехова, О.В. Веселовская, О.А. Овчинников, Л.И. Скворцова// Производство спирта и спиртных напитков.-2012.-№3.-с.32-34.
Шелехова Н.В. Новые подходы к контролю качества и безопасности алкогольной продукции/Н.В. Шелехова // Сб. Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов ВНИИПБТ; Под редакцией В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. 2016. С. 237-242.
Шелехова Н.В. Современные экспресс-методы контроля качества и безопасности алкогольной продукции/ Н.В.Шелехова, Т.М. Шелехова, О.В. Веселовская, Л.И.Скворцова, Н.В. Полтавская //Сб. Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов ВНИИПБТ; Под редакцией В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. 2016. С. 243-250.
Караваев М.М., Мастеров А.П. Производство метанола. М.: Химия. 1973. -160 с.
ГОСТ 33833-2016 Напитки спиртные. Газохроматографический метод определения объемной доли метилового спирта.-Введ. 2018-01-01.-Москва:Стандартинформ,-2016.-16с.

.....

UDC 663.5

DETERMINATION METHANOL IN ALCOHOLIC BEVERAGES BY GAS CHROMATOGRAPHY

Shelekhova N.V., Polyakov V.A., Rimareva L.V., Shelekhova T.M., Veselovskaya O.V., Skvortsova L.I, Poltavskaya N.V.

Russian scientific research Institute of food biotechnology - branch of Federal state budget institution of science Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnologie and Food Safety, Moscow, Russia
111033 Moscow, Samokatnaya, 4b, e-mail: satella@mail.ru

To ensure operational quality control and safety of alcoholic production the technique of determining the volume fraction of methyl alcohol in alcoholic beverages by gas chromatography. The technique can be used in the industry, as well as by reference laboratories to detect adulterated alcohol. Application of the developed technique will improve the quality and safety of alcoholic products.

Key words: gas chromatography method of analysis, control, quality, safety, alcoholic beverages, alcoholic beverages, the volume fraction of methyl alcohol, methanol

It currently produces more than 500 types of alcoholic drinks, so the quality control and safety requires the development of advanced analytical techniques[1-3]. Methyl alcohol is highly toxic, and the smell and taste of it is indistinguishable from ethanol[4].

The aim of this study was to develop a methodology for determining the volume fraction of methyl alcohol in alcoholic beverages. Studies were performed on gas chromatographs domestic and foreign, equipped with a flame ionization detector.

To conduct research on the selection of the operating parameters of a gas chromatograph and a methodology for the preparation of the calibration solutions prepared model solutions volume fraction of methanol in terms of anhydrous alcohol in the measuring range from 0,003% to 0,120%.

Defined conditions for chromatographically, providing quantitative and qualitative determination of methanol: temperature detector, the temperature of the evaporator, the division ratio of the flow, the temperature of thermostat column, flow rate of carrier gas, the flow rate of hydrogen, air flow rate, sample volume.

As a result of the research developed a methodology to determine the content of methyl alcohol in alcoholic beverages. The accuracy rate of a technique is 22-28%. The developed method formed the basis of interstate standard GOST 33833-2016 «Alcoholic drinks. Gas chromatographic method for the determination of the volume fraction of methyl alcohol»[5].

With the application of the developed technique of gas chromatographic studies conducted over 37 samples of alcoholic beverages. Studies have confirmed the high efficiency of the developed technique.

Application of the developed technique in the industry and in regulatory laboratories will enhance the safety and quality of alcoholic beverages.

References:
1. Shelekhova T.M. Kontrol' kachestva alkogol'noj produkcii i biotekhnologicheskih processov pererabotki sel'skohozyajstvennogo syr'ya s ispol'zovaniem hromato-mass-spektrometricheskih, gazohromatograficheskih i ehlektroforetichekih metodov analiza/ T.M. Shelekhova, N.V. Shelekhova, O.V. Veselovskaya, O.A. Ovchinnikov, L.I. Skvorcova// Proizvodstvo spirta i spirtnyh napitkov.-2012.-№3.-s.32-34.
2. Shelekhova N.V. Novie podhody k kontrolyu kachestva i bezopasnosti alkogol'noj produkcii/N.V. Shelekhova // Sb. Perspektivnye fermentnye preparaty i biotekhnologicheskie processy v tekhnologiyah produktov pitaniya i kormov VNIIPBT; Pod redakciej V.A. Polyakova, L.V. Rimarevoj. 2016. S. 237-242.
3. Shelekhova N.V. Sovremennye ehkspress-metody kontrolya kachestva i bezopasnosti alkogol'noj produkcii/ N.V.Shelekhova, T.M. Shelekhova, O.V. Veselovskaya, L.I.Skvorcova, N.V. Poltavskaya //Sb. Perspektivnye fermentnye preparaty i biotekhnologicheskie processy v tekhnologiyah produktov pitaniya i kormov VNIIPBT; Pod redakciej V.A. Polyakova, L.V. Rimarevoj. 2016. S. 243-250.
4. Karavaev M.M., Masterov A.P. Proizvodstvo metanola. M.: Himiya. 1973. -160s.
5. GOST 33833-2016 Napitki spirtnye. Gazohromatograficheskij metod opredeleniya ob»emnoj doli metilovogo spirta.-Vved. 2018-01-01.-Moskva:Standartinform,-2016.-16s.

.....

УДК 663.5

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА СПИРТНЫХ НАПИТКОВ

Шелехова Н.В., Поляков В.А., Римарева Л.В., Шелехова Т.М., Веселовская О.В., Скворцова Л.И, Полтавская Н.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии– филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
11033, г. Москва, Россия, ул. Самокатная, 4Б
e-mail: satella@mail.ru

Разработана компьютерная программа Модуль КП «ККШ-КСП» для контроля стабильности показателя правильности. Модуль интегрирован в разработанный ранее программный комплекс ПК «С2Н5ОН-АНАЛИТИК». Усовершенствованный программный комплекс может быть использован на предприятиях отрасли и в организациях, осуществляющих контроль качества и безопасности спиртных напитков для обработки результатов измерений показателей качества и безопасности алкогольной продукции с построением контрольных карт Шухарта.

Ключевые слова: внутрилабораторный контроль, качество, безопасность, алкогольная продукция, этиловый спирт, водка, автоматизация, компьютерная программа, информационные технологии

В современных условиях в контроле качества алкогольной продукции широко применяются статистические методы, в том числе с использованием контрольных карт Шухарта. Следует отметить, что контрольные карты строятся на основании оперативных данных и являются инструментом статистического контроля. Выполнение обработки результатов вручную является трудоемким процессом, поэтому для решения данных задач целесообразно использовать информационные технологии[1-4].

Для создания Модуля КП «ККШ-КСП» нами выбрана платформа Delphi. Большое внимание было уделено проектированию пользовательского интерфейса и разработке печатных форм отчетов. Таким образом, в целях повышения эффективности контроля стабильности правильности результатов измерений при реализации газохроматографического метода анализа в соответствии с ГОСТ 30536-2013 и ГОСТ 32039-2013 разработана компьютерная программа Модуль КП «ККШ-КСП», автоматизирующая построение контрольных карт Шухарта.

Кроме того, в рамках исследования разработанный Модуль КП «ККШ-КСП» интегрирован в программный комплекс ПК «С2Н5ОН-АНАЛИТИК». Таким образом, были расширены возможности программного комплекса ПК «С2Н5ОН-АНАЛИТИК» по обработке результатов измерений показателей качества и безопасности алкогольной продукции при использовании газохроматографических методов анализа.

Программный комплекс ПК «С2Н5ОН-АНАЛИТИК» может быть использован на предприятиях отрасли и в организациях, осуществляющих контроль качества и безопасности спиртных напитков, для обработки результатов измерений показателей качества и безопасности алкогольной продукции и построения контрольных карт Шухарта [5,6]. Применение программного комплекса в аналитической лаборатории будет способствовать существенному повышению эффективности и производительности труда.

Литература.
1. Елисеева И.И., Руковишников В.О. Логика прикладного статистического анализа. – М.: Финансы и статистика, 1982. – 316с.
2. Миттаг Х.-Й., Ринне Х. Статистические методы обеспечения качества/Пер. с нем. – М.: Машиностроение, 1995. – 616 с.
3. Адлер Ю. П., Жулинский С. Ф., Шпер В. Л. (2009). Проблемы применения методов статистического управления процессами на отечественных предприятиях. - Методы менеджмента качества, №8, с.36-40; №9, с.24-29.
4.Шелехова Н.В. Автоматизация ведения внутрилабораторного контроля измерений при реализации современных методов контроля качества и безопасности алкогольной продукции/Шелехова Н.В., Поляков В.А.// Сб. материалов VII Московского межд. конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (17-20 марта 2015 г.) М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И.Менделеева, 2015. – Ч.1 – 504 с. С.455-446
5. Шелехова Н.В. Контроль стабильности показателя правильности измерений при выполнении исследований спиртов и водок методами газовой хроматографии/ Шелехова Н.В., Веселовская О.В.// Перспективы развития науки и образования: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 28 февраля 2015г.: в 16 частях. Часть 2. Тамбов: ООО «Конс. компания Юком»,2015. С.144-145.
6. Шелехова,Н.В. Перспективы применения метода контрольных карт Шухарта в целях контроля стабильности процесса/ Н.В.Шелехова., Т.М. Шелехова //Совр. общество, обр. и наука: сб. науч. тр. по мат. Межд. научно-практ. конф.-Тамбов: ООО «Конс. комп. Юком»,2015. - Ч7.-С.153-154

.....

UDC 663.5

INFORMATION TECHNOLOGIES IN QUALITY CONTROL OF ALCOHOLIC BEVERAGES

Shelekhova N.V., Rimareva L.V., Shelekhova T.M., Veselovskaya O.V., Skvortsova L.I, Poltavskaya N.V.

111033 Moscow, Samokatnaya, 4b
e-mail: satella@mail.ru

Developed a computer program Module KP «KKSH-KSP» for the stability control indicator is correct. The module is integrated into a previously developed software complex of PK «C2H5OH- ANALITIK». Advanced software package can be used in enterprises and organizations, monitoring the quality and safety of alcoholic beverages to processing the results of measurements of indicators of quality and safety of alcoholic production with the construction of Shewhart charts.

Key words: internal control, quality, safety, alcoholic products, ethyl alcohol, vodka, automation, computer software, information technology

In modern conditions in the quality control of alcohol products are widely used statistical methods, including the use of Shewhart charts. It should be noted that control charts are based on operational data and are a tool of statistical control. Processing data manually is a time consuming process, so for solve these problems, it is advisable to use information technology[1-4].

For development of the module KP «KKSH-KSP» we chose the platform Delphi. Great attention was paid to user interface design and development of printed report forms. Thus, in order to improve the control stability of the correctness of the measuring results of the implementation of the method of gas chromatographic analysis in accordance with GOST 30536-2013 and GOST 32039-2013 developed a computer program Module KP «KKSH-KSP», which automates the construction of Shewhart charts.

In addition, the study developed a Module KP «KKSH-KSP» integrated in the software package PK «C2H5OH-ANALITIK». Thus, it was expanded capabilities of the software complex of PK «C2H5OH- ANALITIK» processing of results of measurements of indicators of quality and safety of alcoholic beverages when using gas chromatographic methods of analysis.

The software PK «C2H5OH- ANALITIK» can be used in enterprises and organizations, monitoring the quality and safety of alcoholic beverages, for processing the results of measurements of indicators of quality and safety of alcoholic products and the construction of Shewhart charts [5,6]. Application of this software in analytical laboratories will contribute significantly to improving efficiency and productivity.

References:
1. Eliseeva I.I., Rukovishnikov V.O. Logika prikladnogo statisticheskogo analiza. – M.: Finansy i statistika, 1982. – 316s.
2. Mittag H.-J., Rinne H. Statisticheskie metody obespecheniya kachestva/Per. s nem. – M.: Mashinostroenie, 1995. – 616 s.
3. Adler YU. P., Zhulinskij S. F., Shper V. L. Problemy primeneniya metodov statisticheskogo upravleniya processami na otechestvennyh predpriyatiyah. - Metody menedzhmenta kachestva, №8, s.36-40; №9, s.24-29.
4.Shelekhova N.V. Avtomatizaciya vedeniya vnutrilaboratornogo kontrolya izmerenij pri realizacii sovremennyh metodov kontrolya kachestva i bezopasnosti alkogol'noj produkcii/Shelekhova N.V., Polyakov V.A.// Sb. materialov VII Moskovskogo mezhd. kongressa «Biotekhnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya» (17-20 marta 2015 g.) M.: ZAO «Ehkspo-biohim-tekhnologii», RHTU im. D.I.Mendeleeva, 2015. – CH.1 – 504 s. S.455-446
5. Shelekhova N.V. Kontrol' stabil'nosti pokazatelya pravil'nosti izmerenij pri vypolnenii issledovanij spirtov i vodok metodami gazovoj hromatografii/ Shelekhova N.V., Veselovskaya O.V.// Perspektivy razvitiya nauki i obrazovaniya: sbornik nauchnyh trudov po materialam Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii 28 fevralya 2015g.: v 16 chastyah. Chast' 2. Tambov: OOO «Kons. kompaniya Yukom»,2015. S.144-145.
6. Shelekhova,N.V. Perspektivy primeneniya metoda kontrol'nyh kart Shuharta v celyah kontrolya stabil'nosti processa/ N.V.Shelekhova., T.M. Shelekhova //Sovr. obshchestvo, obr. i nauka: sb. nauch. tr. po mat. Mezhd. nauchno-prakt. konf.- Tambov: OOO «Kons. komp. Yukom»,2015. - CH7.-S.153-154

УДК 664.2

НОВЫЙ ПРИНЦИП ГЛУБОКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ КРАХМАЛОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ САХАРИСТЫХ ПРОДУКТОВ

Степанов В.И.[1], Иванов В.В.[1], Шариков А.Ю.[1], Пономарев В.В.[2], Хабибулина Н.В.[2]

[1]Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», г. Москва, Россия
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д. 4-Б,
e-mail: foodbiotech@yandex.ru
[2]ЗАО «Партнер-М», г. Москва, Россия
109316, г. Москва,ул. Талалихина, д. 26

Получены сахаристые продукты различного дектрозного эквивалента (DE) с использованием экструзионно-гидролитической переработки пшеничной муки. Установлено влияние режимов нового принципа обработки сырья на свойства получаемой продукции.

Ключевые слова: экструзионно-гидролитическая переработка, крахмал, сахаристые продукты, декстрозный эквивалент (DE).

Сущность нового принципа глубокой переработки крахмалосодержащего сырья при получении гидролизатов различной степени декстринизации крахмала заключается в комплексном последовательном применении термомеханических и биокаталитических процессов в единой реакционной системе, в одну технологическую стадию и в одной установке – экструдере-гидролизаторе.

Этот способ был применен в технологии получения сахаристых продуктов (мальтодекстрин, глюкозные сиропы), где в качестве сырья использовалась пшеничная мука крахмалистостью 86,6%. Уровень глубины ферментативной обработки оценивался по DE в образцах фракций гидролизатов концентрацией 30% сухих веществ (СВ), выделенных центрифугированием и высушенных в конвективной сушилке. Регулирование степени глубины переработки крахмала, которая оценивалась по DE, осуществлялась путем варьирования режимных параметров термомеханических и биокаталитических процессов на пилотной установке. Изменение степени декструкции подисахаридов крахмала осуществлялась регулированием интенсивности энергозатрат экструзионного процесса. При увеличении нагрузки на 11% DE образцов экструдатов возрастает с 2,3 до 4,4. Варьированием дозировкой используемых ферментов (α-амилаза, гемицеллюлаза) изменялась степень декстринизации крахмала на стадии ферментативного гидролиза. Методом композиционного планирования эксперимента получена адекватная модель для показателей DE:

DE = 25,8 + 0,88·a – 0,052·a2 – 1,005·c2, где DE– декстрозный эквивалент; a – дозировка α-амилазы (0,5-9,5 ед.АС/г крахмала); c – дозировка гемицеллюлазы по ксиланазе (0,1-1,5 ед.КС/г СВ).

Можно отметить, что динамика увеличения значения DE связана в большей степени с повышением дозировки амлолитического ферментного препарата. Незначительное увеличение дозировки гемицеллюлазы также способствует увеличению DE, что связано не с субстратной специфичностью фермента, а, видимо, позволяет облегчить доступ амилолитического фермента к крахмалу за счет гидролиза некрахмалистых полисахаридов. Оценка реологии выделенных фракций гидролизатов показала, что увеличение дозировки α-амилазы с 0,5 до 5 ед.АС/ г крахмала позволяет резко снизить вязкость гидролизата с уровня 350-387 мПа•с до 42-60 мПа•с. При увеличении дозировки до 9,5 ед.АС/ г крахмала дальнейшее изменение вязкости замедляется и остается на уровне 34-38 мПа•с. Установлено незначительное влияние гемицеллюлазы на снижение вязкости для всех уровней варьирования α-амилазой. Так, увеличение дозировки гемицеллюлазы с 0,1 до 1,5 ед.КС/ г СВ позволяет снизить вязкость с 387 до 350 мПа•с. Качество разделения гидролизата крахмала центрифугированием на фракции, также зависит от дозировок ферментов, с увеличением α-амилазы с 0,5 до 5,0 ед.АС/г крахмала обеспечивается выделение 10-13% твердого осадка, что повышает чистоту получаемого сахаристого продукта. С увеличением гемицеллюлазы с 0,1 до 1,5 ед.КС/г СВ возрастает масса коллоидного раствора на 10% и снижение на 15-23% массы твердого осадка, что указывает на повышение степени гидролиза некрахмальных полисахаридов.

Экструзионно-гидролитическая технология обеспечивает глубокую переработку крахмала. В зависимости от режимов, в первую очередь дозировок ферментов, возможно получение сахаристых продуктов, различных по DE и функциональным свойствам, что расширяет их применение в пищевых продуктах.

UDC 664.2

NOVEL TECHNOLOGY OF PROCESSING OF STARCH-CONTAINING RAW MATERIALS INTO STARCH-BASED SWEETENERS AND FOOD INGREDIENTS

Stepanov V.I.[1], Ivanov V.V.[1], Sharikov A.Yu.[1], Ponomarev V.V.[2], Khabibulina N.V.[2]

[1]Russian research institute of food biotechnology — branch of Federal research centre of nutrition and biotechnology, Moscow, Russia
111033, Russia, Moscow, Samokatnaya Str., 4b,
e-mail: foodbiotech@yandex.ru
[2]Closed Joint-Stock Company «Partner-M», Moscow, Russia
109316, Russia, Moscow, ul. Talalikhina, d. 26

Starch-based sweeteners and food ingredients with various dextrose equivalent (DE) can be obtained using extrusion-hydrolytic technology. The effect of the technology regimes on the properties of the resulting products were investigated.

Key words: extrusion, hydrolysis, starch, dextrose equivalent (DE).

The gist of the novel technology of starchy raw materials processing into hydrolysates with various degree of dextrinization is an complex integration of extrusion thermomechanical and hydrolysis processes in one-step consistent reaction process system, which is implemented using experimental extruder-hydrolyser.

This novel method was applied in the technology of maltodextrin and glucose syrups production using wheat meal with 86.6% starch content as a raw material. Dextrinization degree was evaluated by dextrose equivalent of the hydrolysate samples with 30% solids, isolated by centrifugation and dried in convective dryer.

The adjustment of starch depolymerization degree was carried out by varying the regime parameters of thermomechanical and biocatalytic process. Degree of starch procesing was changed by the intensity of the energy consumtion of the extrusion process. Increase of the load by 11% caused increase of extrudates DE from 2.3 to 4.4. Dextrinization degree of the wheat starch was influenced also by dosage variation of the enzymes such as α-amylase and hemicellulase. Using response surface methodology, adequate model for extruded wheat meal hydrolysis was obtained:

DE = 25,8 + 0,88·a - 0,052·a2 – 1,005·s2, where DE- dextrose equivalent; a - dosage of α-amylase (0.5-9.5 amylolytic units (AU) / g of starch); s - hemicellulase dosage (0.1-1.5 xylanase units (XU) / g of solids).

It was shown that increase of DE was caused significantly by increase of α-amylase dosage. A minor increase of DE caused by increase of hemicellulase dosage was associated with enhancement of amylolytic enzyme access to the starch polymersby hydrolysis of non-starch polysaccharides. Evaluation of the hydrolysates rheology showed that increase of the α-amylase dosage from 0.5 to 5 AU can dramatically reduce the media viscosity from 350-387 mPa•s to 42-60 mPa•s. Further increase of the α-amylase dosage to 9.5 AU reduced the media viscosity insignificantly to 34-38 mPa•s. The viscosity reduction and variation of hemicellulase dosage were correlated insignificantly. Increase of hemicellulase dosage from 0.1 to 1.5 XU reduced viscosity from 387 to 350 mPa·s. The quality of the starch hydrolysate separation into fractions was dependent on the dosage of enzymes. Increase of α-amylase dosage from 0.5 to 5.0 AU allowed to separate 10-13% of the solids sediment and to enhance the purity of the hydrolysates. Variation of hemicellulase dosage from 0.1 to 1.5 XU increased the weight of colloidal solution at 10% and reduced the solids sediment at 15-23% as a result of non-starch polysaccharides hydrolysis.

It was shown that extrusion-hydrolytic technology provided processing of the starch materials to the dextrins and starch-based sweeteners. Variation of the extrusion regimes and dosages of hydrolytic enzymes allowed to obtain dextrins and starch-based sweeteners with various DE and functional properties, that can expand area of their application in food industry.

UDC 663.52

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ НЕПРЕРЫВНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ И КОНТРОЛЯ ЗА КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ДЕНАТУРИРУЮЩИХ ДОБАВОК В АВТОМАТИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА БИОЭТАНОЛА

Туршатов М.В., Соловьев А.О., Кононенко В.В. , Леденев В.П., Кривченко В.А., Моисеева Н.Д., Кириллов Е.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии– филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д. 4-Б.
тел. 8(495)361-71-90, e-mail: lab78@mail.ru.

Проведены исследования по денатурации этилового спирта в процессе производства на стадии ректификации различными денатурирующими добавками. Положительные результаты получены для изопропанола и кротонового альдегида. Разработана технология их непрерывного дозирования в автоматическом режиме и автоматизированная система контроля за их концентрацией в биоэтаноле

Ключевые слова: биоэтанол, денатурация, кротоновый альдегид, изопропиловый спирт, система ввода и контроля денатурирующих веществ (СВКДВ).

Согласно законодательству [1] для исключения применения биоэтанола на пищевые цели, с 2017 года необходимо проводить его денатурацию в непрерывном режиме в процессе ректификации [2,3]. Проведены исследования по денатурации спирта различными добавками [4,5]. Установлено что в наибольшей степени для этой цели подходят изопропанол и кротоновый альдегид в концентрации 0,2% об. Они не отделяются от спирта и не претерпевают изменений при ректификации и абсолютировании, определяются с большой точностью хроматографическим и спектрофотометрическим методами, делают спирт непригодным для пищевых целей. Для указанных веществ разработана технология и схема автоматического их внесения в поток флегмы ректификационной колонны, и контроля за их концентрацией, включающая вычислитель системы ввода и контроля денатурирующих веществ (СВКДВ), дозатор добавки, датчик расхода спирта, отсечные клапана и датчик концентрации добавки. Вычислитель предназначен для обработки сигналов с датчиков, выдачи управляющих воздействий на дозатор денатурирующих веществ и отсечные клапаны, отображения и архивирования данных и предоставления информации контролирующим органам.

Литература.
1 Федеральный закон № 171-ФЗ от 22.11.95 г. «О государственном регулировании производства и оборота этилового спирта, алкогольной и спиртосодержащей продукции и об ограничении потребления (распития) алкогольной продукции» (с последующими редакциями № 18-ФЗ от 07.01.99 г., № 102-ФЗ от 21.07.05 г., № 301-ФЗ от 01. 12. 07 г., № 279-ФЗ от 25.12.2008 г., № 366-ФЗ от 27.12.2009г.)
2. Туршатов М.В. Разработка энергосберегающей технологии этилового спирта на основе новых способов подготовки сырья / диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук // Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук. Москва. 2009
3 Серба Е.М Ресурсосберегающая биотехнология спиртового производства / Серба Е.М, Поляков В.А., Оверченко М.Б., Римарева Л.В., Погоржельская Н.С., Мартыненко Н.Н. // В сборнике: Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов ВНИИПБТ; Под редакцией В.А. Полякова, Л.В. Римаревой, 2016. с. 395-402.
4.Соловьев А.О. Исследование непрерывного способа денатурации этилового спирта в процессе его ректификации / А.О. Соловьев, М.В. Туршатов // Повышение качества, безопасности и конкурентоспособности продукции агропромышленного комплекса в современных условиях: Сборник научных трудов IX Международной конференции молодых ученых и специалистов – Москва: ФГБНУ ВНИИПБиВП, 2015. – 406 с.
5.Туршатов М.В. Исследование эффективности применения изопропилового спирта для денатурации биоэтанола / Туршатов М.В., Соловьев А.О. // сборник научных трудов «X Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук», Москва 27 октября 2016 года, с. 385-388

UDC 663.52

DEVELOPMENT OF CONTINUOUS DENATURATION TECHNOLOGY AND CONTROL OF DENATURING AGENTS CONCENTRATION IN AUTOMATIC MODE DURING BIOETHANOL PRODUCTION

Turshatov M.V., Solovyov A.O., Kononenko V.V. , Ledenev V.P. Krivchenko V.A., Moiseeva N.D., Kirillov E.A.

Russian scientific research Institute of food biotechnology - branch of Federal state budget institution of science Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnologie and Food Safety, Moscow, Russia
111033, Moscow, ul. Samokatnaya, d. 4-B.
tel. 8 (495) 361-71-90, e-mail: lab78@mail.ru.

Researched the process of ethanol denaturation at stage of rectification with different denaturing additives. Positive results were obtained with isopropanol and crotonaldehyde. The technology of continuous dosing in automatic mode and the automated system of control over their concentration in bioethanol was developed.

Key words: bioethanol, denaturation, crotonaldehyde, isopropyl alcohol, input and control system of denaturing agents.

According to the legislation [1] to avoid the use of bioethanol for food purposes, in 2017 is necessary to carry out it denaturation continuously in the process of rectification [2,3]. Studied denaturation of ethanol by various additives [4,5]. It is established that the most suitable for this purpose are isopropanol and crotonaldehyde in a concentration of 0.2%. They are not separated from the alcohol and do not changes during the rectification

and dehydration, are determined with great precision by chromatographic and spectrophotometric methods do alcohol unusable for food purposes. For these substances developed the technology and scheme of the automatic incorporation in the reflux stream of the distillation column, and control over their concentration, including the calculator input and control of denaturing agents, additive dispenser, alcohol consumption sensor, shut-off valve and the sensor concentration of the additive. The calculator is designed to process signals from the sensors, the control actions on the dispenser denaturing agents and shut-off valves, display and archiving of information regulatory authorities.

References:
1 Federal Law № 171-FZ, dated 22.11.95, «On state regulation of production and turnover of ethyl alcohol, alcohol and alcohol products and on the limitation of consumption (drinking) alcohol products» (with subsequent editions № 18-FZ dated 07.01.99 g ., number 102-FZ dated 21.07.05 city, number 301-FZ of 01. 12. '07, number 279-FZ dated 25.12.2008, number 366-FZ of 27.12.2009g.)
2. Turshatov M.V. The development of energy-saving technology of ethanol on the basis of new methods of preparation of raw materials / thesis for the degree of Candidate of Technical Sciences // All-Russian Scientific Research Institute of brewing, nonalcoholic and winery industry of the Russian Academy of Agricultural Sciences. Moscow. 2009
3 Serba E.M. Biotechnology Resource-alcohol production / Serbia E.M., Polyakov V.A., Overchenko M.B., Rimareva L.V., Pogorzhelsky N.S., Martynenko N.N. // In: Promising enzyme preparations and biotechnological processes in technologies of food and feed VNIIPBT; Edited by V.A. Polyakova, L.V. Rimareva, 2016. p. 395-402.
4.Solovev A.O. Investigation of the continuous process of ethanol denatured in the process of distillation / A.O. Soloviev, M.V. Turshatov // Increasing the quality, safety and competitiveness of agro-industrial complex in modern conditions: Proceedings of the IX International Conference of Young Scientists and Specialists - Moscow: FGBNU VNIIPBiVP, 2015. - 406 p.
5.Turshatov M.V. Research of efficiency of use of isopropyl alcohol to denature the ethanol / Turshatov M.V., Solovyov A.O. // Collection of scientific papers «X International scientific-practical conference of young scientists and specialists of Agricultural Sciences Branch of the Russian Academy of Sciences», Moscow October 27, 2016, p. 385-388

УДК 663.11: 579.87

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ СПОСОБНОСТИ СЕЛЕКЦИОНИРОВАННОГО ШТАММА ASPERGILLUS ORYZAE

Серба Е.М., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Мочалина П.Ю., Погоржельская Н.С.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д.4-Б,
E-mail: serbae@mail.ru

Осуществлен скрининг физиологически активных штаммов микромицетов рода Aspergillus, метаболиты которых используются в пищевой промышленности, а биомасса гриба A. oryzae - субстрат для получения БАД и функциональных добавок, при этом синтезируемые микромицетами ферменты – инструмент для осуществления биокаталитической деструкции полимеров микробного и растительного сырья.

Ключевые слова: Aspergillus oryzae, биомасса, ферменты, селекция, полисахариды, биополимеры.

Мицелиальные грибы Aspergillus oryzae имеют широкое применение в пищевой промышленности, т.к., не обладают патогенными и токсическими свойствами. Биосинтетическая способность по отношению к амилолитическим и протеолитическим ферментам, характерная для представителей микромицетов Aspergillus oryzae, используется для ферментативной конверсии растительного и животного сырья при производстве продуктов питания и кормов [1].

В связи с имеющейся в последнее время тенденцией увеличения объема и расширения ассортимента биотехнологических продуктов, получаемых с использованием микроорганизмов, особое значение приобретают вопросы утилизации отходов этих производств и в первую очередь грибного мицелия [2].

В результате многоступенчатой селекции и химического индуцированного мутагенеза (2,5% нитрозогуанидина - НГ) при тестировании продуктивности клонов выявлено, что отселекционированный вариант гриба Aspergillus oryzae F-931 превышал уровень активности родительского штамма по протеазе (ПС) – на 36,3%. При этом, повысился уровень активности синтезируемых микромицетом гемицеллюлаз: ксиланазы – в 2,5 раза, целлюлазы – в 6,4 раза и β-глюканазы –в 2,1 раза. Кроме того, в глубинной культуре обнаружена липаза, что позволит использовать

полученный ферментный препарат в мясной, молочной и масложировой промышленности.

Моделирование биосинтетических процессов гриба Aspergillus oryzae осуществлено в условиях стендовой установки в лабораторном ферментаторе. Культивирование гриба Aspergillus oryzae проводили на подобранной натуральной питательной среде, обеспечивающей синтез мицелиальной биомассы и образование гидролитических ферментов, при температуре 30°С в течение 2-х суток. Полученную после культивирования и отделения культуральной жидкости биомассу селекционированного гриба Aspergillus тестировали на содержание биополимеров, а также исследовали аминокислотный состав белковых веществ. Установлено, что наиболее высокий уровень образования биомассы и белковых веществ отмечен у селекционированного клона, что превышает показатели исходного штамма на 19 - 22%; содержание полисахаридов в биомассе грибов отличалось не значительно. Результаты исследований динамики роста показали снижение уровня содержания белков и полисахаридов на 2-ые сутки, что обусловлено повышением синтеза внутриклеточных протеолитических ферментов. Анализ аминокислотного состава биомассы селекционированного штамма подтвердил высокую биологическую ценность синтезируемых белковых веществ. Содержание незаменимых аминокислот составило порядка 50% от общего количества.

В результате исследований установлено, что селекционированный физиологически активный клон из промышленного штамма Aspergillus oryzae F-931 обладает способностью не только к повышенному синтезу гидролаз, но и биомассы с высоким содержанием биополимеров. Полученные данные о составе мицелиальной биомассы подтверждают перспективность ее использования в качестве субстратов для получения белково-аминокислотных корректоров пищи и функциональных ингредиентов.

Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-16-00104.

Литература.
1. Курбатова Е.И., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Алсивар С.К.А., Римарева Л.В. Скрининг физиологически активного штамма мицелиальных грибов - продуцента комплекса литических ферментов // Хранение и переработка сельхозсырья. - 2014. - № 8. - С. 38-42.
2. Поляков В.А., Римарева Л.В., Курбатова Е.И., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Тесля А.В. Белковые обогатители пищи на основе ферментативной деструкции белково-полисахаридного комплекса клеточных стенок дрожжей // Пищевая промышленность. -2012.- № 11. - С. 42-44.

UDC 663.11: 579.87

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ СПОСОБНОСТИ СЕЛЕКЦИОНИРОВАННОГО ШТАММА ASPERGILLUS ORYZAE

Serba E. M., Sokolova E. N., Borshchev, Y. A., Mochalina P. Y., Pogorzelsky N. S.

All-Russian research Institute of food biotechnology is a branch of Federal state budget institution of science Federal research center of food, biotechnology and food safety, Moscow, Russia
111033, Moscow, str. Samokatnaya, 4-B,
E-mail: serbae@mail.ru

Implemented screening physiologically active strains of micromycetes of the genus Aspergillus, the metabolites of which are used in the food industry, and the biomass of the fungus A. oryzae - substrate to obtain the dietary supplements and functional additives, wherein synthesized by micromycetes enzymes – a tool for the implementation of biocatalytic degradation of polymers of microbial and plant materials.

Key words: Aspergillus oryzae, biomass, enzymes, selection, polysaccharides, biopolymers.

Filamentous fungi Aspergillus oryzae have wide application in the food industry, because it is not pathogenic and have toxic properties. Biosynthetic ability in relation to the amylolytic and proteolytic enzymes, for members of Aspergillus oryzae mikromitcetov characteristic is used for the enzymatic conversion of vegetable and animal raw materials in the production of food and feed [1].

In connection with the existing trend in recent years to increase the volume and range of biotechnological products produced using microorganisms, are particularly important issues of waste management of these industries and especially of fungal mycelium [2].

The result is a multi-stage selection and chemical induced mutagenesis (2,5% nitrosoguanidine - NG) when testing the productivity of the clones revealed that the selected variant of Aspergillus oryzae F-931 exceeded the level of activity of the parent strain is the protease (PS) – 36.3%. Thus, increased activity of synthesized micromycete hemicellulose: xylanase – 2.5 times, cellulase – 6.4 times and β-glucanase –2.1 times. In addition, in submerged

culture discovered lipase, allowing to use the obtained enzyme preparation in meat, dairy and oil industry.

Modeling of the biosynthetic processes of the fungus Aspergillus oryzae carried out in a bench setup in laboratory fermenter. The cultivation of Aspergillus oryzae were carried out on selected natural nutrient medium, providing a synthesis of mycelial biomass and the formation of hydrolytic enzymes, at a temperature of 30°C for 2 days. Obtained after culturing and separation of culture liquid with biomass of fungus Aspergillus selected were tested for the content of biopolymers and investigated the amino acid composition of proteins. Established that the highest level of education of the biomass and of proteins observed in selected clone, higher than the original strain on the 19 - 22%; the content of polysaccharides in the biomass of fungi differed not significantly. The results of studies of growth dynamics showed a decrease in levels of proteins and polysaccharides on the 2nd day, due to increased synthesis of intracellular proteolytic enzymes. The analysis of amino acids in biomass of the selected strain confirmed the high biological value of proteins synthesized. The content of essential amino acids accounted for about 50% of the total.

As a result of researches it is established that physiologically active selected clone from the industrial strain of Aspergillus oryzae F-931 has the ability not only to increased synthesis of hydrolases but also of biomass with a high content of biopolymers. The obtained data on the composition of the mycelial biomass confirm the prospects of its use as substrates for production of protein-amino acid correctors and functional food ingredients.

The study was supported by Russian Sciency Foundanion, grant № 16-16-00104.

References:
1. Kurbatova E. I., Sokolova E. N., Borshchev, Yu. A., Alcivar S. K. A., Rimareva L. V. Screening of physiologically active strain of filamentous fungi - producer of a complex of lytic enzymes // Storage and processing of agricultural products. - 2014. - No. 8. - P. 38-42.
2. Polyakov V. A., Rimareva L. V., Kurbatova E. I., Sokolova E. N., Borshchev, Y. A., Teslya A.V. Protein richer of food based on enzymatic degradation of the protein-polysaccharide complex of the cell walls of yeast // Food industry. -2012.- No. 11. - P. 42-44.

УДК 664.644.53

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ СУХОЙ ПШЕНИЧНОЙ КЛЕЙКОВИНЫ

Колпакова В.В.[1], Лукин Н.Д[1], Лукин Д.Н.[1], Чумикина Л.В.[2], Арабова Л.И.[2]

[1]Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов, Московская область, Россия
140051, Московская обл., п. Красково, ул. Некрасова, д. 11
e-mail: val-kolpakova@rambler.ru
[2]Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский пр., 33

В работе исследованы функциональные свойства нативной и модифицированной сухой пшеничной клейковины (СПК). Показано, что методом ограниченного протеолиза можно повышать растворимость и пенообразующую способность клейковины до значений свойств яичного альбумина и одновременно уменьшать ее водо-, жиросвязывающую и жироэмульгирующую способность.

Ключевые слова: пшеничная клейковина, протеолиз, функциональные свойства

СПК является вторичным продуктом переработки зерна пшеницы на крахмал. В хлебопекарной и мукомольной промышленности СПК используется без модификации, но для производства, например, кондитерских изделий функциональные свойства не удовлетворяют требованиям по растворимости, пенообразующей способности и т.д. [1]. Отсюда целью данной работы явилась разработка процессов модификации функциональных свойств СПК с применением протеолитических ферментных препаратов (ФП) для расширения ее применения в пищевой промышленности.

В качестве материалов использовали 2 образца СПК. Образец № 1 имел низкий показатель упругой деформации прибора ИДК-1 (Ндеф.) – 40 ед., образец СПК № 2, наоборот, высокий – 80 ед. прибора. Образец СПК № 2 характеризовался как «слабый», образец СПК №1 - «короткорвущийся». Исходя из этого, гидролиз образца СПК №1 проводили с эндопротеиназным ФП Protamex®, гидролиз образца DWG № 2 - с Flavozyme 500 MG, содержащим одновременно эндопротеиназу и экзопептидазу [2]. Концентрация ФП в обоих случаях составляла 0.3 Е/г белка, pH – 6.5±0.2, температура - 50оС. Время гидролиза СПК с Protamex® изменяли от 10 до 80 мин, с Flavozyme 500 MG - от 40 до 160 мин. Значения функциональных свойств гдролизатов, в сравнении с нативными образцами СПК, приведены в табл. Видно, что белки нативной СПК (контроль)

растворялись на 3,2-3,6%, тогда как гидролизованной DWG - на 31.3-35.5%. У короткорвущейся СПК к концу гидролиза растворимость повышалась в 3,6 - 7,2 раза, а у слабой – в 4,8 - 10,8 раза. Максимальная растворимость наблюдалась у белков слабой СПК после 2-2,5 ч гидролиза. Пенообразующая способность (ПОС) и стабильность пены (СП) гидролизатов также были выше, чем у нативных образцов. К концу гидролиза у СПК № 1 и у СПК № 2 ПОС белков повышалась на 55 и 82%, соответственно, и превышала при этом значения ПОС яичного белка (283%). Параллельно у гидролизатов на 41-51% увеличилась СП. Степень гидролиза СПК № 1 при этом составила 2.21-2.89%, СПК № 2 – 3.41%. В отличие от ПОС и растворимости, значения жироэмульгирующей (ЖЭС), водосвязывающей (ВСС) и жиросвязывающей способности (ЖСС) белков с увеличением времени гидролиза уменьшались. Так, ЖЭС белков за время гидролиза 85 – 160 мин уменьшалась в 6 – 7 раз, ВСС – в 4,5 – 9,0 раз. У гидролизата короткорвущейся СПК ПОС, ЖСС и растворимость несколько выше, чем у слабой, тогда как ЖЭС и ВСС, наоборот, ниже. Таким образом, временем протеолиза с ФП можно регулировать функциональные свойства СПК: повышать растворимость, ПОС и понижать другие свойства для кондитерских изделий.

Таблица – Функциональные свойства нативной и гидролизованной СПК

Свойства	$Н_{деф.}$ 40 ед. приб.					$Н_{деф.}$ 80 ед. приб.				
	Контроль	Время гидролиза, мин				Контроль	Время гидролиза, мин			
		10	40	60	80		40	80	120	160
ВСС, г/г	1.20	0.71	0.58	0.42	0.13	0.90	0.75	0.61	0.32	0.20
СЭ, %	62.0	54.0	38.0	14.0	11.0	59.0	54.0	30.0	14.0	8.00
ЖСС, г/г	0.66	0.64	0.39	0.44	0.60	0.60	0.45	0.45	0.72	0.43
ПОС, %	200	216	250	300	310	174	216	243	276	316
СП, %	46.0	50.0	56.0	60.0	65.0	45.0	48.0	57	63.0	68.0
Растворимость, %	3.60	13.1	16.2	26.2	31.3	3.2	15.3	27.2	35.1	35.5
Степень гидролиза,%	0	1.10	1.72	2.21	2.89	0	1.76	2.86	3.22	3.41

Литература.
Wang J., Zhao M., Yang X., Jiang Y. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration // J. Cereal Sci. 2006, Vol. 44. № 1. P. 93–100.
Kolpakova V.V., Chumikina L.V., Vasiliev A.V., Arabova L.I., Topunov A.F./ Int. J.Agronomy and Agri.Res. 5(2), 72-86. 2014 ISNN:2223-7054 (print) 2225-3610 (Online) htpp//www.innspub.net.

ENZYMATIC MODIFICATION OF DRY WHEAT GLUTEN

Kolpakova V.V.[1], Lukin N.D.[1], Lukin D.N.[1], Chumikina L.V.[2], Arabova L.I.[2]

[1]All-Russian Research Institute for Starch Products, Moscow region, Russian Federation
140051, Moscow region, Kraskovo, 11 Nekrasova St.
+7 495-557-15-00 +7 915-284 -85-50
e-mail: val-kolpakova@rambler.ru
[2]Bach Institute of Biochemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
119071, Moscow, Leninskii Pr., 33,
+7 495-954-52-83

The functional properties of native and modified dry wheat gluten (DWG) were studied. It is shown that method of limited proteolysis can increase the foaming capacity of the gluten to ovalbumin property values and at the same time reduce its water-, fat binding and fat emulsifying capacity

Key words: wheat gluten, proteolysis, functional properties

DWG is a byproduct processing of wheat starch. The bakery and milling industries DWG is used with modification, but for the production of, for example, confectionery products functional properties do not meet the requirements of solubility, foaming ability etc. [1]. Hence, the aim of this work was the development of processes of modifying the functional properties of the DWG proteolytic enzyme prepapations (EP) for the expansion of its use in the food industry.

We used two DWG samples produced by BM company (Kazakhstan). DWG sample №. 1 had a low compressive

deformation index (40 instr. units), while DWG sample № 2, on the contrary, had a high index, 80 instr. units. The DWG sample № 1 was characterized as «short-tearing», while the DWG sample №. 2 was «weak». Based on the above, hydrolysis of the DWG sample № 1 was run with endoprotease EP Protamex®, while hydrolysis of the DWG sample № 2, with Flavozyme 500 MG, which contained both endoproteinase and exopeptidase [2]. In both cases, EP concentration amounted to 0.3 E/g of protein, with pH 6.5 ± 0.2, and temperature 50ºC. DWG hydrolysis time with Protamex® was adjusted from 10 to 80 min., with Flavozyme 500 MG, from 40 to 160 min.

Our findings in functional properties of hydrolysates in comparison with native DWG samples properties are summarized in table. It is seen that native DWG is diluted in water by 3.2–3.6%, while hydrolyzed DWG, by 31.3–35.5%. By the end of hydrolysis, solubility of short-tearing DWG was increased by 3.6–7.2 times, of weak DWG, by 4.8–10.8 times. Maximum solubility was observed in weak gluten proteins after 2–2.5 hours of hydrolysis. Foam-forming properties of hydrolysates were also better than the ones found in native samples. As hydrolysis time was increased up to 85 minutes in DWG № 1 and up to 160 minutes in DWG № 2. Protein foam forming capacity (FFC) and foam stability (FS) was increased by 55 and 82%, respectively, thus exceeding FFC values of eff protein (283%). In parallel, from hydrolysates on 41-51% increased foam stability.

At the same time, hydrolysis degree of proteins in the DWG sample № 1 amounted to 2.21–2.89%, in the DWG sample № 2, to 3.22–3.41%. In contrast to FCC and solubility, such protein properties as fat emulsifying capacity (FAC), water-binding capacity (WBC), and fat-binding capacity (FBC) were gradually reduced as hydrolysis time was increased. Thus, for example, within the hydrolysis time range of 85–160 minutes, protein FAC was decreased by 6–7 times, WBC, by 4.5–9.0 times. In hydrolyzed short-tearing DWG, FFC, FBC and solubility proved to be somewhat higher than in weak DWG, while both FAC and WBC were lower instead. Thus, we can adjust EP of DWG by controlling hydrolysis time, as we increase its solubility and foam forming capacity, while reducing all other parameters for confectionery products.

Table - Functional properties of native and hydrolyzed samples of DWG

Indicators	H_{def} 40 instr. units					H_{def} 80 instr. units				
	Control	Hydrolysis time, min.				Control	Hydrolysis time, min.			
		10	40	60	80		40	80	120	160
WBC, g/g	1.20	0.71	0.58	0.42	0.13	0.90	0.75	0.61	0,32	0,20
FAC, %	62.0	54.0	38.0	14.0	11.0	59.0	54.0	30.0	14.0	8.00
FBC, g/g	0.66	0.64	0.39	0.44	0.60	0.60	0.45	0.45	0.72	0.43
FFC, %	200	216	250	300	310	174	216	243	276	316
FS, %	46.0	50.0	56.0	60.0	65.0	45.0	48.0	57	63.0	68.0
Solubility, %	3.60	13.1	16.2	26.2	31.3	3.2	15.3	27.2	35.1	35.5
Degree of hydrolysis,%	0	1.10	1.72	2.21	2.89	0	1.76	2.86	3.22	3.41

References:
Wang J., Zhao M., Yang X., Jiang Y. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration // J. Cereal Sci. 2006, Vol. 44. № 1. P. 93–100.
Kolpakova V.V., Chumikina L.V., Vasiliev A.V., Arabova L.I., Topunov A.F./ Int. J.Agronomy and Agri.Res. 5(2), 72-86. 2014 ISNN:2223-7054 (print) 2225-3610 (Online) htpp//www.innspub.net.
oteolysis time can be controlled onality of SEC

УДК 664.681.15

РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПОЗИТНЫХ СМЕСЕЙ В ПРОИЗВОДСТВЕ МУЧНЫХ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Дерканосова Н.М., Курчаева Е.Е., Королькова Н.В., Глотова И.А.

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия 394087, Воронеж, ул. Мичурина, д. 1, e-mail: glotova-irina@yandex.ru

На основе принципов комбинаторики разработан состав печенья сдобного, обогащенного композитной смесью на основе биоактивированных путем проращивания семян бобовой культуры маш, порошка боярышника и топинамбура. Подобрано оптимальное содержание компонентов композитной смеси, вносимой к массе муки при получении песочного полуфабриката, которое составило: порошок топинамбура – 5,0-6,0%, мука из биоактивированных семян маша – 9,0-12,0%, порошок боярышника - 3,0-5,0%. Полученные

изделия имеют внешний вид, вкус и аромат, свойственные песочному печенью и по показателям качества соответствуют требованиям ГОСТ 24901-2014.

Ключевые слова: композитная смесь, функциональные продукты, сдобное печенье, топинамбур

Мучные кондитерские изделия традиционно пользуются большим спросом у населения России. Однако в связи с растущей информированностью части потребителей о принципах здорового питания к качеству кондитерских изделий начинают предъявляться повышенные требования. В связи с чем, для корректировки состава и повышения потребительских свойств мучных кондитерских изделий применяют местное растительное сырье и продукты его переработки [1 - 3].

Цель исследований заключалась в разработке на основе принципов комбинаторики оригинального состава печенья сдобного с применением композитной смеси на основе порошка из топинамбура, муки из биоактивированных семян маша и цельносмолотой муки плодов боярышника, как функционального пищевого ингредиента.

Обосновано использование растительных композитов с точки зрения содержания функциональных ингредиентов и их положительного влияния на функционирование систем организма человека. С целью оптимизации рецептурных ингредиентов было применено симплекс-решетчатое планирование эксперимента и подобрано оптимальное содержание компонентов композитной смеси, вносимой к массе муки при получении песочного печенья, которое составило: порошок топинамбура – 5,0-6,0%, мука из биоактивированных семян маша – 9,0-12,0%, порошок боярышника - 3,0-5,0%.

На основе полученных данных была разработана рецептура сдобного печенья на основе, которой были проведены опытные выпечки изделий. Установлено, что сдобное печенье с добавлением композитной смеси имеет светло-коричневый цвет, незначительное растрескивание поверхности, обладает приятным сладким ореховым привкусом и ароматом. Результаты оценки качества выпеченных изделий показали, что смесь на основе клубней топинамбура, биоактивированных семян маша и порошка боярышника не оказывает отрицательного влияния на качество печенья и способствует повышению его намокаемости (контроль – 121,0%, опыт - 164,2%).

Полученные изделия с внесением новых потенциально полезных ингредиентов растительного происхождения имеют внешний вид, вкус и аромат, свойственные песочному печенью и по показателям качества соответствуют требованиям ГОСТ 24901-2014.

Литература.
Варнавская О.Д. Оценка качества изделий из замороженного песочного теста повышенной пищевой ценности/ О.Д. Варнавская, И.П. Березовикова. – Техника и технология пищевых производств. – 2011. - №3. – с. 9-13.
Егорова Е.Ю. Расширение ассортимента сырья для мучных кондитерских изделий / Е.Ю. Егорова, М.С. Бочкарев // Кондитерское и хлебопекарное производство. – 2008. – № 2. – С. 12 -13.
Матвеева Т.В. Способ снижения энергетической ценности кексовых и песочных изделий/ Т.В. Матвеева, С.Я. Корячкина, Н.М. Дерканосова//Современные наукоемкие технологии. - №5. – 2008. – с. 63-64.

УДК 664.681.15

THE DEVELOPMENT AND USE OF COMPOSITE MIXTURES IN THE PRODUCTION OF FLOUR CONFECTIONERY PRODUCTS

Derkanosova N. M. Kurchaeva E. E., Korolkova N.V., Glotova I. A.

Voronezh state agrarian University named after Emperor Peter I Voronezh, Russia
394087, Voronezh, Michurina str., 1, e-mail: glotova-irina@yandex.ru

On the basis of principles of combinatorics we have developed the formulation of short bread cookies enriched with composite mixture based on bioactivating of germinated legumes mash, powder hawthorn and Jerusalem artichoke. The optimum content of the components of a composite mixture introduced to the mass of flour when receiving shortcrust mix, which was made of: powder of Jerusalem artichoke – 5,0-6,0%, flour from seeds bioactivated mash seeds – 9,0-12,0%, hawthorn powder - 3,0-5,0%. The obtained products have the appearance, taste and aroma, characteristic of short crust and quality indices meet the requirements of GOST 24901-2014.

Key words: composite blend, functional foods, short bread cookies, Jerusalem artichoke

Pastry is traditionally in great demand among the population of Russia. However, with the growing awareness of consumers about healthy food to the quality of confectionery products are beginning to demand increased requirements. Therefore, for composition adjustment and improvement of consumer properties of flour confectionery products use the producers local vegetative raw materials and its processing products [1 - 3].

The purpose of the research was to develop on the basis of the combinatorics of the original composition of short bread cookie with the use of composite mixtures on the basis of the powder of Jerusalem artichoke flour of bioactivated seeds mash and wholemeal milling flour of hawthorn berries as a functional food ingredient.

It justifies the use of vegetable composites from the point of view of the content of functional ingredients and their positive effects on the functioning of the systems of the human body. To optimize formula ingredients it was applied a simplex-lattice planning of experiment with the optimum content of the components of a composite mixture introduced to the mass of flour upon formula of shortbread, which was made of: powder of Jerusalem artichoke – 5,0-6,0%, flour from seeds of bioactivating mash – 9,0-12,0%, hawthorn powder - 3,0-5,0%.

On the basis of the obtained data it was developed the formula of butter cookies on the basis, which was performed by an experienced baking products. It is established that biscuits, with the addition of the composite mixture has a light brown color, slight surface scratching, has a pleasant sweet nutty flavor and aroma. The results of the evaluation of the quality of the baked products showed that the mixture of Jerusalem artichoke tubers, seeds of bioactivated mash and powder hawthorn has no negative impact on the quality of biscuits and promotes its swelling properties (control – 121,0%, experience - 164,2%).

Produced items with the introduction of new potentially useful ingredients of plant origin have the appearance, taste and aroma, characteristic of shortbread cookies and quality indices meet the requirements of GOST 24901-2014.

References:
Varnavskaya O. D. Quality assessment of products from frozen dough with higher nutrition value/ Varnavskaya O. D., I. P. Berezovikova. – Equipment and technology of food production. – 2011. - No. 3. – pp. 9-13.
Egorova E. Yu. expanding the range of raw materials for pastry / E. Yu. Egorova, M. S. Bochkarev // Confectionery and baking production. – 2008. – No. 2. – P. 12 -13.
Matveeva T. V. a Method of reducing the energy value of a cupcake and shortcrust/ T. V. Matveeva, S. Y. Karachkina, N. M. Derkanosova//Modern high technologies. - No. 5. – 2008. – S. 63-64.

УДК 637.514.23

НОВЫЕ ПИЩЕВЫЕ БЕЛКОВЫЕ НАНОКОМПОЗИЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТЕИН-ГЛУТАМИН γ-ГЛУТАМИЛТРАНСФЕРАЗЫ

Курчаева Е.Е., Глотова И.А., Максимов И.В., Рязанцева А.О.

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия
394087, Воронеж, ул. Мичурина, д. 1, e-mail: alena.kurchaeva@yandex.ru

Разработаны новые пищевые белковые нанокомпозиции с использованием протеин-глутамин γ-глутамилтрансферазы, которые позволяют эффективно использовать низкосортное мясное и альтернативное растительное сырье в технологии эмульгированных продуктов с повышенной пищевой и биологической ценностью.

Ключевые слова: протеин-глутамин γ-глутамилтрансфераза, нанокомпозиты, люпиновая мука

Для интенсификации структурообразования в комбинированных мясо-растительных системах перспективно использование биокатализа. Фермент трансглутаминаза (ТГ) катализирует реакции ацильного переноса, вводящие ковалентные ε-(γ-глутамил)лизиновые связи между белками и создающие полимеры высокой молекулярной массы. Модификация белков с помощью ТГ позволяет изменить их растворимость, гидратирование, термостабильность, а также их желирующие, реологические свойства, эмульгирование и сычужную свёртываемость в случае молочных продуктов [1].

Актуальной задачей является разработка новых пищевых белковых нанокомпозиций для применения в технологии эмульгированных изделий.

В качестве объектов исследований использовали мясо птицы механической обвалки, шпик боковой, свинину жилованную полужирную, говядину жилованную, люпиновую муку, полученную путем размола се-

мян люпина сорта Деснянский селекции ГНУ ВНИИ люпина (Брянск), ферментный препарат (ТГ) трансглютаминаза «REVADA TG 11». За основу, выступающую в роли контроля, был использован фарш мясного хлеба «Заказной». Были изучены функционально-технологические свойства модельных фаршей, с заменой 50% основного сырья на мясо птицы механической обвалки с внесением люпиновой муки в количестве 0-10% и коммерческого ферментного препарата REVADA TG 11 в количестве 0,1 – 1,1% к массе фарша.

Для проявления ферментативного эффекта фарш выдерживался при температуре 2°С в течение 24 ч [2]. Установлено, что контрольные образцы имели рыхлую, пастообразную консистенцию, а опытные - плотную и упругую. Максимальные значения величин влагосвязывающей и влагоудерживающей способности составляют 85,5 и 78,5% соответственно. Они достигаются при введении гидратированной муки в фарш в количестве 5,0% и ферментного препарата в количестве 0,3%.

Разработана рецептура и технологическая схема производства мясного хлеба, а также проведена опытно-промышленная выработка мясного хлеба «Лискинский» на базе ИП «Протеин-Воронеж» с использованием 5% люпиновой муки и 0,3% ферментного препарата ТГ к массе основного сырья. Контрольный образец вырабатывали с добавлением 1% яичного белка в качестве структурообразователя. Результаты комплексных физико-химических, технологических и органолептических исследований показали, что опытные образцы мясных хлебов, выработанных с добавлением растительного белка и ферментного препарата трансглютаминаза «Revada TG 11», не уступали по основным показателям контрольным изделиям. Положительным результатом испытаний явилось также повышение выхода мясных хлебов до 120%, обусловленное увеличением массовой доли белка за счет введения люпиновой муки и фермента трансглютаминазы.

Новые пищевые белковые нанокомпозиции с использованием протеин-глутамин γ-глутамилтрансферазы позволяют эффективно использовать низкосортное мясное и альтернативное растительное сырье в технологии эмульгированных продуктов с повышенной пищевой и биологической ценностью.

Литература.
1. Birol K. Effect of microbial Transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken doner kebab // Meat Science. 2003, 63. - p.98-101
2. Evolutionary-biological peculiarities of transglutaminase. Structure, physiological functions, application Shleikin A.G., Danilov N.P. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2011. T. 47. № 1. C. 1-14.

УДК 637.514.23

NEW FOOD PROTEINACEOUS NANOCOMPOSITIONS WITH USE THE PROTEIN-GLUTAMINE γ-GLUTAMILTRANSFERAZA

Kurchaeva E.E., Glotova I.A., Maxsimov I.V., Rayzantseva A.O.

Voronezh state agrarian University named after Emperor Peter I Voronezh, Russia
394087, Voronezh, Michurina str., 1, e-mail: alena.kurchaeva@yandex.ru

New food proteinaceous nanocompositions with use a γ-glutamiltransferaza protein glutamine which allow to use effectively low-grade meat and alternative vegetable raw materials in technology of the emulsified products with the increased nutrition and biological value are developed.

Key words: protein glutamine of a γ-glutamiltransferaz, nanocomposites, lyupinovy flour

For intensification of structure formation in the combined meat-vegetable systems is prospectively the use of biocatalysis. The enzyme transglutaminase (TG) catalyzes the reaction of acyl migration, introducing covalent ε-(γ-glutamyl)lysine links between proteins and producing polymers of high molecular weight [5]. Modification of proteins by TG allows you to change their solubility, hydrating, thermostability, and their gelling, rheological properties, emulsification and rennet coagulation in the case of dairy products [1].

Thus, the urgent task is to develop new food protein nanocomposite for use in technology of emulsified products. Elements of the new concept for the creation of combined meat products on the basis of emulsions are alternative herbal ingredients and processing methods of enzymatic processing of combined food systems with transglutaminases.

Of the research we used poultry of mechanical deboning, mid-back, semifat trimmed pork, pine flour obtained

by grinding the seeds of the lupine varieties of Desnianskyi selection GNU Institute of lupine (Bryansk), an enzyme (TG) transglutaminase «REVADA TG 11».

For the foundation, acting as control, was used minced meat loaf "Zakaznoi". We studied functional and technological properties of the model minced meat with 50% replacing of the basic raw material by mechanically deboned chiken meat with the addition of lupine flour in the amount of 0-10% and commercial enzyme preparation REVADA TG 11 in the amount of 0.1 to 1.1% to the weight of meat.

For displaying the enzymatic effect the stuffing was maintained at a temperature of 2°C for 24 h [2]. It is established that the control samples had loose, pasty consistency, and experienced - tight and elastic. The maximum values of moisture-binding and water-holding capacity are for 85.5 and 78.5%, respectively. They are achieved with the introduction of hydrated flour in the stuffing in the amount of 5.0% and enzyme preparation in the amount of 0.3%.

On the results of these surveys was developed the formulation and technological scheme of the production of meat loaf, and was carried out the experimental-industrial production of meat loaf «Liskinsky» on the basis of the Individual Enterprise "Protein-Voronezh" using 5% lupine flour and 0.3% enzyme preparation TG to the weight of the main raw material. Control sample was developed with the addition of 1% egg protein as the gelatinizer.

The results of the complex physico-chemical, technological and organoleptic studies have shown that experimental samples of meat loaves made with vegetable protein and enzyme preparation transglutaminase «Revada TG 11», were the same on main indices as control products, and according to a number of indices had the advantage. A positive test result was the increase of the yield of meat loaves up to 120%due to the increase in the mass fraction of protein due to the introduction of lupine flour and enzyme transglutaminase.

The new food protein nanocomposites with the use protein-glutamine γ-glutamyltransferase enable the efficient use of low-grade meat and alternative vegetable raw materials in technology of emulsified products with high nutritional and biological value.

References:
1. Birol K. Effect of microbial Transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken done kebab // Meat Science. 2003, 63. - p.98-101.
2. Evolutionary-biological peculiarities of transglutaminase. Structure, physiological functions, application Shleikin A.G., Danilov N.P. Journal of Evolutionary Biochemistry and discrimination. 2011. So 47. No. 1. S. 1-14.

УДК 664:613.2:635.652

РАЗРАБОТКА ТЕХНИЧЕСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФАСОЛИ СОРТОВ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ РАЗЛИЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ

Вебер А.Л.[1], Казыдуб Н.Г.[1], Есмурзаева Ж.Б[1], Леонова С.А.[2]

[1] ФГБОУ ВО Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Омск, Россия
644008, г. Омск, ул. Институтская пл.2
e-mail: anna.web@mail.ru
[2] ФГБОУ ВО Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия

Настоящая работа посвящена рациональному использованию сырья животного (молоко коровье) и растительного происхождения сырья и его фито-химических свойств (фасоль сорта селекции Омского ГАУ).

Ключевые слова: коровье молоко, белок, фасоль сорта селекции Омского ГАУ, биологическая безопасность, фасолевая дисперсия, кисломолочный продукт, пищевая ценность.

Использование биохимических и биотехнологических методов при получении фасолевого компонента представляет особый интерес для получения широкого ассортимента различных пищевых добавок и специализированных молочных продуктов различной функциональной направленности. Вновь созданные сорта, в том числе омской селекции, нуждаются в изучении их химического состава, показателей безопасности, потребительских свойств, способности к комбинированию с иными ингредиентами.

Мы провели оценку показателей безопасности, нормируемых техническим регламентом таможенного союза ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна». В изученных образцах фасоли сортов селекции Омского ГАУ

содержание токсичных элементов, мг/кг (свинец 0,048, мышьяк 0,005, кадмий 0,007, ртуть 0,002) не превышает допустимый уровень безопасности: так, афлатоксин В1 отсутствовал; количество пестицидов составляет 0,245 мг/кг, что в два раза меньше допустимой норм (0,500 мг/кг). Все исследованные сорта фасоли характеризовались относительно высоким содержанием белка (от 21,07 до 27,22%) и пищевых волокон (от 2,0 до 4,0%), незначительным содержанием жира (менее 2%), а также достаточно высокой зольностью(3,9-4,8).

Такой состав, в особенности наличие пищевых волокон, обусловило целесообразность использования фасоли для создания комбинированного кисломолочного продукта. Для придания продукту биологической активности зерно фасоли предварительно проращивали, используя для этого омагниченную воду, что позволило сократить продолжительность проращивания на 12 часов. [1]. Совместное использование молока коровьего, заквасок фирмы Danisco (йогуртовых культур и защитных культур) в соотношении 0,5:1 в присутствии 5% фасолевого компонента обусловило сравнительно быстрое нарастание кислотности в процессе ферментации, позволило сократить время ведения технологического процесса как минимум от 40-60 мин. Указанная комбинация также повышала пробиотические свойства готового продукта с разносторонней биологической активностью. Так, количество жизнеспособных клеток в готовом продукте составило, КОЕ/см3, не менее: бифидобактерий $1x10^6$; пропионовокислых $1x10^7$, молочнокислых $1x10^8$, лактобактерий $1x10^7$. Включение фасолевого компонента в рецептуру кисломолочного продукта позволило регулировать его вязкость, обеспечивая заданное качество. Комбинированный кисломолочный продукт с фасолевым компонентом существенно превзошел контроль по содержанию минеральных веществ, в особенности калия, кальция, магния, фосфора, натрия, а также витаминов группы В.

Таким образом, производство кисломолочных продуктов с использованием фасоли сортов селекции Омского ГАУ позволит расширить ассортимент конкурентоспособных продуктов удовлетворяющие современным требованиям различных категорий населения и нивелирующих негативное воздействие окружающей среды на организм, что является актуальным не только для Уральского и Сибирского регионов.

Литература.
1. Патент РФ № 2599569, 15.09.2016.
2. Veber A. L., Kazydub N.G. , Leonova C.A. The use of new biological safety selection varieties legumes in dairy technology high potential of phytochemicals / Mat.- formula Int. scientific-practical. conference «Modern state of the prospects for the development of dairy farming and processing of agricultural products.» - Omsk 2016 .- PP. 203-206 (article in English).

UDC 664:613.2:635.652

THE DEVELOPMENT OF TECHNICAL AND TECHNOLOGICAL SOLUTIONS ON DOMESTIC SELECTION HARICOT USE AND THEIR APPLICATION IN PRODUCTION OF SPECIALIZED PRODUCTS OF VARIOUS FUNCTIONAL ORIENTATION

Veber A.L.[1], Kazydub N.G.[1], Esmurzaeva Zh.B.[1], Leonova S.A.[2]

[1] *FSBEI HE Omsk State Agrarian University named after P.A.Stolypin, Omsk, Russia*
644008, Omsk, st. Institutskaya pl.2
e-mail: anna.web@mail.ru
[2] *FSBEI HE Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia*

This work is devoted to rational use of animal raw materials (cow's milk) and effective use of high biological and nutrition value of vegetable raw materials and its phyto-chemical properties (haricot of Omsk SAU selection).

Key words: cow's milk, protein, haricot of Omsk SAU selection, biological safety, haricot dispersion, fermented dairy product, nutritional quality.

The use of biochemical and biotechnological methods in the process of getting haricot component is of special interest for production of a wide range of various nutritional supplements and specialized dairy products of various functional orientations. The new sorts including samples of Omsk SAU selection need to be assessed of their chemical content, indicators of safety, consumptive properties, and ability of combination with the other ingredients.

The assessment of indicators of safety, which are standardized by the Technical Regulation of the Customs Union 015/2011 «About safety of grain» was carried out. The studied samples of Omsk SAU selection haricot show

that content of toxic elements does not exceed the admissible level of safety (mg/kg lead 0, 048, arsenic 0, 005, cadmium 0,007, quicksilver 0, 002): aflatoxin B1 was absent; the content of pesticides is 0,245 mg/kg twice less than the permissible level (0, 500 mg/kg). The studied grades of Omsk SAU selection haricot are characterized by rather high content of protein (from 21, 07 to 27, 22%) and food fibers (from 2,0 to 4,0%), insignificant content of fat (less than 2%) and rather high ash content (3,9 – 4, 8).

Such content, especially presence of food fibers caused the expedience of haricot use for production of combined dairy product. To give the product biological activity the haricot seed was germinated using magnet water that allowed to reduce the time of germination to 12 hours. Combination of cow's milk and ferments of Danisco (yogurt cultures and protective cultures) in the ratio 0,5: 1 in presence of 5% of a haricot component caused rather quick increase of acidity in the process of fermentation , allowed to reduce the time of technological process from 40 to 60 min. This combination increased biotic quality of a ready-made product with versatile biological activity. The quantity of viable cells in a ready-made product made at least CFU/cm3: bifida bacteria 1 * 10^6, propionate 1*10^7, lactic acid 1*10^8, lactobacillus 1*10^7. The use of haricot component in technology of combined dairy production allows regulating its viscosity and providing the required quality.

Combined dairy product with the haricot component exceeded the control in the content of mineral substances, especially potassium, calcium, magnesium, phosphorus, sodium and group B vitamins. Consequently, fermented milk production with the use of Omsk SAU selection haricot will allow expanding the range of competitive products which can satisfy modern requirements of various population categories and leveling negative impact of the environment on a man's organism. This factor is urgent not only for the Ural and Siberian regions.

References:
1. Patent of the RF № 2599569, 15.09.2016.
2. Veber A. L., Kazydub N.G. , Ziarno M. The use of new biological safety selection varieties legumes in dairy technology high potential of phytochemicals / Mat.- formula Int. scientific-practical. conference «Modern state of the prospects for the development of dairy farming and processing of agricultural products.» - Omsk 2016 .- PP. 203-206

УДК 637.2.05:631.14: [636.2+636.39]

РАЗРАБОТКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ СМЕСЕЙ С НАТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ БИОПРОТЕКТОРНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ

Глотова И.А., Ерофеева Н.А., Курчаева Е.Е., Прянишников В.В., Тормышов М.В., Шахов А.С.

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия 394087, Воронеж, ул. Мичурина, д. 1, e-mail: glotova-irina@yandex.ru

Разработаны условия получения и состав двух- и трехкомпонентных быстрорастворимых пищевых смесей на основе продуктов лактации крупного и мелкого рогатого скота. Режимы обезвоживания обеспечивают стабильность нативных свойств и биологической активности продуктов

Ключевые слова: молоко, молозиво, пищевые смеси, оптимизация состава, вакуум-сублимационное обезвоживание, дериватографический анализ

Продукты лактации сельскохозяйственных животных, в частности, мелкого рогатого скота, являются уникальными биообъектами по набору пищевых и биологически активных веществ, в том числе с биопротекторными свойствами [1]. Сезонный характер производства, вариабельность состава и свойств продуктов в зависимости от стадии лактации, а также биологических факторов и технологических параметров процессов хранения и переработки делают актуальной организацию сквозных агробиотехнологий. Они интегрируют процессы промышленного производства, хранения, экспрессного контроля качества и комплексного использования составных частей продуктов разных периодов лактации, включая биополимеры и другие БАВ в составе сырья. При этом необходимо решить проблему стабилизации свойств и биологической активности ингредиентов при хранении.

При исследовании и разработке условий стабилизации нативных свойств продуктов лактации коз при хранении мы использовали данные дериватографических исследований [2] и сенсорометрические характеристики равновесной газовой фазы продуктов. Исследование продуктов лактации коз проводили на устройстве термогравиметрического и дифференциального термического анализа METTLER TOLEDO STARE TGA/SDTA 851e (Швейцария). Установленные закономерности могут быть использованы для совершенствования тради-

ционной схемы получения сухого продукта с использованием вакуум-выпарной установки и распылительной сушки, однако этот способ отличается громоздким аппаратурным оформлением и малоприменим в условиях фермерских хозяйств и предприятий средней и малой мощности. Современное решение проблемы состоит в использовании вакуум-сублимационного обезвоживания продукта в тонком слое (4-5 см при давлении 50Па). Ряд технических подходов, реализующих данное направление, позволяет обеспечить энергетическую эффективность процесса вакуум-сублимационного обезвоживания термолабильных продуктов [3, 4]. С учетом вектора потребительских предпочтений и с использованием программы оптимизации рецептурного состава многокомпонентных пищевых смесей Generic 2.0 обоснован состав двух- и трехкомпонентных основ для быстрорастворимых напитков, в том числе с иммуномоделирующими свойствами. В их состав входят продукты лактации сельскохозяйственных животных. Наибольшие значения функции желательности соответствуют следующему составу компонентов: 70-80% коровье молоко, 20-30% козье молоко; 68% коровье молоко, 14% козье молоко, 18% колостральная сыворотка.

Литература.
1. Yang X.-Yu, Chen J.-P., Zhang F.-X. Research on the chemical composition of Saanen goat colostrum// International Journal of Dairy Technology. 2009. Vol. 62, № 4. P. 500-504. 2. Ерофеева Н.А., Арапов В.М., Глотова И.А. Дериватографическое исследование водных фракций в продуктах лактации коз// Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. - 2016. - № 4. - С. 3-8. 3. Кретов И.Т., Шахов С.В., Бляхман Д.А. Вакуум-сублимационная сушилка непрерывного действия на инертных носителях// Патент России № 2169323. 2001. Бюл. № 17. 4. Шахов С.В. , Бляхман Д.А., Черных В.Б. Устройство ввода жидкого продукта на инертных носителях в вакуумную камеру сублимационной установки// Патент России № 2184324. 2002. Бюл. № 18.

УДК 637.2.05:631.14: [636.2+636.39]

DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FOOD MIXES WITH NATIVE PROPERTIES OF BIOPROTECT INGREDIENTS

Glotova I. A., Erofeeva N. A. Kurchaeva E. E., Pryanishnikov V. V., Tormyshov M. G., Shakhov A. S.

Voronezh state agrarian University named after Emperor Peter I Voronezh, Russia 394087, Voronezh, Michurina str., 1, e-mail: glotova-irina@yandex.ru

We have developed conditions of production and composition of two - and three-component instant food mixes based on the products of lactation of large and small cattle. Modes of dehydration ensure the stability of the native properties and biological activity of the products.

Key words: milk, colostrum, food mixes, optimization of the vacuum freeze-dehydration, derivatographical analysis

Products of lactation of agricultural animals, particularly ruminants, are unique biological objects on a set of food and biologically active substances, including bioprotect properties [1]. Seasonal nature of production, variability of composition and properties of products depending on stage of lactation, as well as biological factors and technological parameters of the processes of storage and processing make actual the organization through agrobiotechnologies. They integrate the industrial processes of production, storage, and rapid quality control and comprehensive utilization of the component parts of products of different periods of lactation, including biopolymers and other biologically active substances in the composition of raw materials. It is necessary to solve the problem of stabilization of the properties and biological activity of ingredients during storage. In the research and development of the conditions of stabilization of the native properties of the products of goats lactation during storage we used data of derivatographic studies [2] and sensoro-metric characteristics of the equilibrium gas phase products. Study of the products of goats lactating was carried out on the device thermogravimetric and differential thermal analysis mettler toledo stare tga/sdta 851e (Switzerland). The obtained regularities can be used to improve the traditional scheme of obtaining dry product using vacuum evaporator and spray drying, but this method is characterised by cumbersome hardware design and is not very applicable in the conditions of farms and enterprises of medium and small capacity. The modern solution is to use vacuum-sublimation dehydration of the product in a thin layer (4-5 cm at a pressure of 50 psi). A number of technical approaches that implement this direction, allows to ensure the energy efficiency of the process of vacuum sublimation dehydration of thermolabile products [3, 4]. Taking into accont the vector of consumer pReferences: and with using the optimization program of the prescription of multi-component food mixtures 2.0 Generic there has been justified the two - and three-component bases for instant drinks, in particular immunomodulating properties. They include products of lactation of farm animals. The highest value of the desirability function correspond to the following components: 70-80%

cow milk, 20 to 30% goat's milk; 68% cow's milk, 14% goat's milk, 18% of colostral serum.

References:
1. Yang X.-Yu, Chen J.-P., Zhang F.-X. Research on the chemical composition of Saanen goat colostrum// International Journal of Dairy Technology. 2009. Vol. 62, No. 4. R. 500-504. 2. Erofeeva N. A. Arapov V.M., Glotova I. A. Derivatographical study of water fractions in products of lactation goats// Technology innovation and merchandising of food products. - 2016. - No. 4. - P. 3-8. 3. Kretov I. T., Shakhov S. V., D. A. Blachman Vacuum freeze dryer of continuous action on inert media// Patent of Russia № 2169323. 2001. Bull. No. 17. 4. Shakhov S. V. , Blachman D. A., Chernykh V. B. The input device of the liquid product to an inert carrier in a vacuum chamber of the freeze installation// Patent of Russia № 2184324. 2002. Bull. No. 18.

УДК 573.6.086.83:579.66

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ РАПСА И ПОДСОЛНЕЧНИКА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Королькова Н.В., Кубасова А.Н., Манжесов В.И., Курчаева Е.Е., Глотова И.А.

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия
394087, Воронеж, ул. Мичурина, д. 1, e-mail: glotova-irina@yandex.ru

Установлены закономерности экзогенного биокатализа при использовании в качестве субстратов жмыхов рапса и подсолнечника. Биомодифицированные белки рапса и подсолнечника перспективны в качестве альтернативы импортным белковым препаратам на основе продуктов переработки сои

Ключевые слова: подсолнечный жмых, рапсовый жмых, белковые препараты, ферментные препараты, гидролазы, биомодификация

К важным факторам, определяющим выбор сырьевых источников для производства белковых препаратов, относятся массовая доля и биологическая ценность белка, а также функционально-технологические свойства белковых продуктов. Сырье должно иметь невысокую стоимость и быть доступным для переработки в промышленных масштабах. Актуальной проблемой является обоснование подходов, обеспечивающих комплексное воздействие на биополимерные комплексы в составе белоксодержащего растительного сырья с целью интенсификации процессов извлечения целевых компонентов [1].

Нами исследованы и предложены к использованию жмыхи рапса и подсолнечника в качестве альтернативного сое источника белковых веществ, получаемых путем экстрагирования их из измельченных субстратов с применением ферментативного гидролиза балластных биополимеров и последующей биомодификацией.

Объектами исследования служили: жмыхи рапса и подсолнечника, продукты их биомодификации с использованием комплексных ферментных препаратов гидролитического действия. Мы использовали отечественные ферментные препараты: грибного происхождения Амилолюкс А и Целлолюкс А, бактериального происхождения Протосубтилин Г10 х, животного происхождения – коллагеназа пищевая, а также бактериальный ферментный препарат GC-401 (производитель - «Jenicor INTERNATIONAL» США).

Специфика биомодификации белковых фракций рапса под действием гидролитических ферментных препаратов соответствует поставленной цели: изменению их соотношения с увеличением доли солерастворимой фракции и снижению содержания щелочерастворимой фракции. Соотношение водо- и солерастворимых белковых фракций при использовании ферментных препаратов составляет: 1:1,1-1,5. Однако применение для биомодификации протеина рапса ферментного препарата Целлолюкс А приводит к наибольшему увеличению доли водо- и солерастворимых фракций белка в препарате (соответственно 28 и 67%).

Тенденции в направлении биомодификации белковых фракций жмыха подсолнечника под действием ферментных препаратов аналогичны установленной специфике действия на белковые фракции жмыха рапса. Наиболее эффективно применение препарата Целлолюкс-А, при котором достигается соотношение водо-, соле- и щелочерастворимой фракций 2:3,7:1.

Установлены следующие значения показателей функционально-технологических свойств изолированных белков из жмыхов масличных культур: для белка подсолнечника водосвязывающая способность (ВСС) - 73%; влагоудерживающая способность (ВУС) - 53%; жироудерживающая способность (ЖУС) – 199%; эмульгирующая способность (ЭС) -78%; для белка рапса: ВСС - 75%; ВУС - 87%; ЖУС – 122%; ЭС -86%.

По основным функциональным свойствам белковый изолят подсолнечника практически не уступает

белкам сои и рапса, а по показателю ЖУС их превосходит.

Для оценки биологической безопасности нативных и подвергнутых биомодификации белков рапса была использована тест-культура Paramecium caudatum. Установлено, что исследуемые образцы не оказывают токсического действия на культуру Paramecium caudatum и обладают биологической активностью, то есть физиологичны для биотеста.

Литература.
1. Glotova I.A., Galochkina N.A., Shahov S.V., Mateev E.Z., Kadirbaev M.K. Biocatalytic properties and substrate specificity of proteinase preparations from different sources// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015. Vol. 6., №1. P. 1640-1645.

УДК 573.6.086.83:579.66

MODIFICATION OF THE PROTEIN FRACTIONS OF RAPESEED AND SUNFLOWER UNDER THE ACTION OF EXOGENOUS ENZYME COMPLEXES

Korolkova N.V., Kubasova A.N., Manzhesov V.I., Kurchaeva E.E., Glotova I.A.

Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter the Great,
Voronezh, Russia
394087, Voronezh, Michurina str., 1, e-mail: glotova-irina@yandex.ru

We have established the patterns of exogenous biocatalysis when using as substrates the oilcakes of rapeseed and sunflower. The biomodified substrates are promising as the alternative to imported protein preparations based on soybean processing

Key words: sunflower cake, rapeseed cake, protein preparations, enzyme preparations, hydrolases, biomodification

The important factors determining the selection of raw material sources for the production of protein preparations, are the mass fraction and the biological value of the protein, as well as the functional and technological properties of protein products. The raw materials should be low cost and be available for processing in industrial scale. The actual problem is the justification of the approaches, providing a complex effect on the biopolymer complexes composed of protein-containing raw materials for the purpose of an intensification of processes of extraction of target components [1].

We have investigated and suggested to use the cakes of rapeseed and sunflower as as an alternative to soy sources of proteins obtained by its extraction from crushed substrates with the use of enzymatic hydrolysis of ballast biopolymers and the subsequent biomodification.

The objects of study were oil cakes of rapeseed and sunflower, products of their biomodification using complex enzyme preparations of hydrolytic actions. We used Russian enzyme preparations: of fungal origin Amilolux A and Cellolux A, of bacterial origin Protosubtilin G10Zx, of animal origin - food collagenase, as well as import preparation of bacterial origin - GC-401 (manufactured by «Jenicor INTERNATIONAL» USA).

The specificity of biomodification the protein fractions of rapeseed under the action of the hydrolytic enzymes meet the objective: to change their ratio with increasing the proportion of salt-soluble fraction and decrease in the content dilacerations fraction. The ratio of water and salt-soluble protein fractions in the case of using enzyme preparations is 1:1,1-1,5. However, the use of Cellolux A for biomodification of rapeseed's protein

leads to the greatest increase in the share of water-soluble and salt-soluble protein fractions in the product (respectively, 28 and 67%).

The tendencies in the direction of biomodification of protein fractions of cakes of sunflower under the influence of enzyme preparations are similar to the established specifics of action on protein fractions of cake of rapeseed. Use of Cellolux A is the most effective. The application of Cellolux A provide the ratio of water-soluble, sole- soluble and alkali-soluble fractions 2:3,7:1.

The following values of indicators of functional and technological properties of the isolated proteins from cakes of oil-bearing crops are established: for sunflower protein

water binding capacity (WBC) - 73%; water-holding capacity (WHC) – 53%; fat-holding capacity (FHC) – 199%; emulsifying capacity (EC) – 78%; for rapeseed protein WBC - 75%; WHC - 87%; FHC – 122%; EC - 86%.

On the main functional properties the protein isolate of sunflower practically doesn't concede to proteins of soy and rapeseed, and surpasses them in an indicator of fat-holding capacity.

We evaluated the biological safety of native and biomodification proteins of rapeseed and sunflower using the

test-culture Paramecium caudatum. We found that the studied samples do not have a toxic effect on the culture of Paramecium caudatum and have biological activity, that is physiologic for biotest.

References:
1. Glotova I.A., Galochkina N.A., Shahov S.V., Mateev E.Z., Kadirbaev M.K. Biocatalytic properties and substrate specificity of proteinase preparations from different sources// Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015. Vol. 6., № 1. P. 1640-1645.

УДК 573.6.086.83

МОДИФИКАЦИЯ КОЛЛАГЕНА С ПОЛУЧЕНИЕМ МАТРИЦ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С БИОПРОТЕКТОРНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Глотова И.А., .Галочкина Н.А., Прянишников В.В., Королькова Н.В., Курчаева Е.Е.

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия 394087, Воронеж, ул. Мичурина, д. 1, e-mail: glotova-irina@yandex.ru

Изучены условия модификации коллагена в составе жилок, сухожилий, фасций крупного рогатого скота, которые обеспечивают сорбционную емкость этого биополимера в отношении биологически активных веществ с биопротекторными свойствами и свойства гидроколлоидов в пищевых системах

Ключевые слова: коллаген, пероксидно-щелочной гидролиз, ферментативный гидролиз, иммобилизация, сорбционная емкость, диметилдипиразолилселенид

Одной из проблем при производстве функциональных продуктов питания с биопротекторными свойствами является получение иммобилизованных форм биопротекторов. Такой подход позволяет обеспечить целевое действие биопротектора на орган-мишень и пролонгировать его период активности по сравнению с непосредственным включением в рецептуру продукта.

Роль коллагеновых белков в качестве источника для получения биополимерной матрицы связана с их высоким ресурсным потенциалом и большим количеством реакционноспособных функциональных групп. В работе решалась задачи выбора источников и способов получения модифицированных селеном коллагеновых матриц для использования в качестве функциональных пищевых добавок.

Объектами исследования служили выделенные из жилок и сухожилий крупного рогатого скота коллагеновые белки. При получении селенсодержащей коллагеновой добавки реализован подход по иммобилизации селена на структурные белки животных тканей с использованием биомодифицированных коллагеновых белков. Модификацию коллагена проводили путем последовательного пероксидно-щелочного и ферментативного гидролиза [1]. В качестве источника селена для иммобилизации на коллагеновой матрице использовали диметилдипиразолилселенид (ДМДПС).

Операции по выделению, очистке и биомодификации коллагена из жилок и сухожилий КРС проводили в следующей последовательности: приемка, сортировка коллагенсодержащего сырья; промывка в течение 2-3 ч; пероксидно-щелочной гидролиз с(NaOH) = 10%, с(H2O2)=3%, продолжительность 6 ч при температуре 16-25 ºС; декантация, центрифугирование; нейтрализация до pH=8,5 (CH3COOH 0,5 моль/дм3; измельчение на волчке с диаметром отверстий dотв=2-3 мм; ферментативный гидролиз 36-38 оС препаратом «коллагеназа пищевая» при дозировке 0,02% к массе остатка при гидромодуле 1:2-2,5 с выдержкой при периодическом перемешивании.

Установлено, что предложенные технологические режимы обеспечивают получение продукта биомодификации коллагена (ПБК), молекулярно-массовое распределение полипептидных фракций в составе которого характеризуется следующим соотношением: 62 кDa – 13%, свыше 80 до 100 кDa – 50%; свыше 100 кDa – 37%, в том числе свыше 120 кDa – 24% [2]. Данное соотношение полипептидных фракций обеспечивает, одной стороны, сорбционную емкость в отношении биологически активных веществ, а с другой - способность формировать пространственный каркас в пищевых биополимерных системах.

Установлены спектральные, сорбционные, функционально-технологические свойства, показатели биобезопасности модифицированных ДМДПС коллагеновых белковых добавок. Исследованы закономерности влияния новых селеносодержащих добавок на процессы сквашивания, формирования молочного сгустка и его синерезис.

Литература.
1. Глотова И.А., Галочкина Н.А. // Способ получения полифункциональной добавки для обогащения селеном пищевых продуктов// Патент России № 2542123. 2015. Бюл. № 3.
2. Галочкина Н.А., Литовкин А.Н., Глотова И.А., Свешникова И.А. Исследование молекулярно-массового распределения белковых фракций при модификации пищевых биополимерных систем// Современные наукоемкие технологии. - 2014. - № 5-1. - С. 187а.

MODIFICATION OF THE COLLAGEN WITH RECEIVING MATRIXES FOR THE IMMOBILIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS WITH BIOPROTECTING PROPERTIES

Glotova I.A., Galochkina N.A., Pryanishnikov V. V., Korolkova N. V., Kurchaeva E. E.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Voronezh State Agrarian University»
1, Michurina St., Voronezh,394068, galochkina.na@mail.ru

We have studied conditions of modification of collagen as a part of strings, tendons, fascia of cattle which provide the sorption capacity of this biopolmer concerning biologically active agents with bioprotecting properties as well as the properties of hydrocolloids in alimentary systems.

Key words: collagen, peroxide-alkaline hydrolysis, enzymatic hydrolysis, immobilization, sorption capacity, 4,4-di[3(5-methylpiperazine)]selenide.

One of the problems at the production of functional food products with the bioprotecting properties is the obtaining of the immobilized forms of bioprotectors. Such approach allows to provide target action of a bioprotector on a target organ and to prolong its period of activity in comparison with direct inclusion in a product compounding.

The role of collagenic proteins, as a source for receiving a biopolymer matrix, is connected with their high resource potential and a large number of reactive functional groups.We solved problems of the choice of sources and ways of receiving the collagenic matrixes modified by selenium for use as functional food additives.

As objects of a research served the collagenic proteins allocated from veins and sinews of cattle. For receiving selenium-containing collagenic additive carried out the selenium immobilization on structural proteins of animal tissues with use of the biomodified collagenic proteins. Modification of a collagen carried out by sequential peroxide-alkaline and enzymatic hydrolysis [1]. As a selenium source for an immobilization on a collagenic matrix used 4,4-di[3(5-methylpiperazine)]selenide (DMDPS).

The operations involved an extracting, cleaning and biomodification of a collagen from veins and tendons of cattle were carried out in the following sequence: acceptance, sorting of collagen-containing raw materials; washing during 2-3 h; the peroxide-alkaline hydrolysis (NaOH) = 10%, about% (H2O2)=3, duration is 6 h at a temperature of 16-25 °C; decantation, centrifugation; neutralization to pH =8,5 (CH3COOH 0,5 mol/dm3); grinding on a top with a diameter of openings of dotv of =2-3 mm; enzymatic hydrolysis of 36-38 ° C the drug «collagenase pischevaya» at a dosage of 0,02% to the mass of the rest at the hydromodule 1:2-2,5 with endurance at periodic hashing.

It is established that the offered technological modes provide product receipt of biomodification of collagen (PBK), molecular-mass distribution of polypeptide fractions as a part of which is characterized by the following ratio: 62 kDa – 13%, over 80 to 100 kDa – 50%; over 100 kDa – 37%, including over 120 kDa – 24% [2]. This ratio of polypeptide fractions provides, one party, sorption capacity concerning biologically active agents, and with another - ability to form a spatial framework in food biopolymer systems.

We have established spectral, sorption, functional and technological properties, indicators of biosafety of the collagenic proteinaceous additives modified by DMDPS. We investigated regularities of influence of new the selenium-containing additives on processes of souring, formation of a dairy clot and its syneresis.

References
1. Glotova I. A., Galochkina N.A. // A method of obtaining multifunctional additives for selenium enrichment of food products// Patent of Russia № 2542123. 2015. Bull. No. 3.
2. Galochkina N. A. Litovkin A. N., Glotova I. A., Sveshnikova I. A. investigation of the molecular mass distribution of protein fractions in the modification of food biopolymer systems// Modern high technologies. - 2014. No. 5-1. - P. 187a.

УДК 637.146.14

ТЕХНОЛОГИИ ПИЩЕВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ И ПРОДУКТОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГЛУБОКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ

Лодыгин А.Д., Евдокимов И.А., Храмцов А.Г

ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь, Россия, 355009, ул. Пушкина, 1
e-mail: allodygin@yandex.ru

Обоснована целесообразность применения химического и ферментативного гидролиза сывороточных белков в технологии пребиотических концентратов из вторичного молочного сырья. Установлены оптимальные параметры процессов.

Ключевые слова: вторичное молочное сырье, лактоза, сывороточные белки, изомеризация, протеолиз, продукты функционального назначения.

Анализ современного состояния и тенденций развития техники и технологий переработки молочного сырья [1, 2, 3] позволяет выделить наиболее перспективные направления их совершенствования:

- глубокое фракционирование молочного белково-углеводного сырья баромембранными, электромембранными, а также адсорбционными и хроматографическими методами;
- направленная физико-химическая (конверсия лактозы на принципах гомогенного и гетерогенного катализа; управляемый химический гидролиз белков молочного сырья) и биологическая (гидролиз, трансгалактозилирование и ферментация лактозы; протеолиз сывороточных белков с получением биогенных пептидов и гидролизатов с регулируемым уровнем конверсии) трансформация компонентов вторичного молочного сырья.

Применение процесса гидролиза сывороточных белков в технологии пребиотических концентратов на основе вторичного молочного сырья, обогащенных лактулозой, обусловлено возможностью оптимизации их состава по источникам азотного питания, доступным для бифидобактерий.

Представляется возможным совмещение процессов изомеризации лактозы в лактулозу и гидролиза сывороточных белков. Данные процессы реализованы при разработке технологии сгущенных и сухих бифидогенных концентратов. Изучена динамика гидролиза сывороточных белков в процессе изомеризации лактозы в лактулозу. Анализ экспериментальных данных показывает, что максимальная степень щелочного гидролиза сывороточных белков достигается на уровне (37,5 – 39)% в интервале температур (80 – 85)^{0}С и продолжительности термостатирования (22 – 26) минут.

При разработке инновационной технологии получения ферментативных гидролизатов сывороточных белков был использован процесс регулирования pH субстрата методом электрохимической активации. Препарат панкреатина вводился в ретентат подсырной сыворотки после установления значений pH в интервале от 7,5 до 9,5. Ферментация осуществлялась при температуре 50^{0}С. Установлены закономерности ферментативного гидролиза белков в электроактивированном ретентате подсырной сыворотки. Максимальные значения концентрации аминного азота и степени гидролиза белка достигаются в диапазоне значений (8,5 – 9,0). Наиболее интенсивное нарастание аминного азота наблюдается при продолжительности ферментации (6 – 12) часов. В целом результаты экспериментов подтвердили эффективность использования электрохимической активации ретентата при получении концентратов сывороточных белков с регулируемым уровнем протеолиза.

В настоящее время разрабатываются технологии продуктов функционального назначения (кисломолочные напитки, хлебобулочные изделия, каши и хлопья быстрого приготовления) для профилактики основных алиментарно зависимых состояний с использованием пребиотических концентратов на основе вторичного молочного сырья.

Литература.
1. Bargeman G. Separation technologies to produce dairy ingredients. Dairy processing. Improving quality. Edited by Gerrit Smit. – Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2003. – P. 367 – 390.
2. Храмцов А.Г. Новации молочной сыворотки. – СПб. : ИД Профессия, 2016. – 490 с.
3. Morgan F, Maugas J. J. Whey, the natural source for a broad range of food ingredients // Proceedings of the 5th International Whey Conference. – Paris, France, 2008. – P. 4 – 5.

UDC 637.146.14

TECHNOLOGY OF FOOD CONCENTRATES AND FUNCTIONAL FOODSTUFFS ON THE BASE OF SECONDARY DAIRY RAW MATERIALS DEEP PROCESSING

Lodygin A.D., Evdokimov I.A., Khramtsov A.G.

North-Caucasus Federal University

The feasibility of whey proteins chemical and enzymatic hydrolysis as a process step of prebiotic concentrates on the base of secondary dairy raw materials manufacturing is proved. Optimal parameters of this processes are determined.

Key words: secondary dairy raw materials, lactose, whey proteins, isomerisation, proteolysis, functional foodstuffs.

The analysis of state-of-art and trends of development of dairy raw materials processing technique and technology allows to underline the most prospective directions of their retrofit [1, 2, 3]:

- dairy protein-carbohydrate raw materials deep fractionation with use of baromembrane, electromembrane, adsorption and chromatography methods;
- directed physical-chemical (lactose conversion on the base of homogenous and heterogeneous catalysis; controlled chemical hydrolysis of dairy proteins) and biochemical (hydrolysis, transglycosylation and fermentation of lactose; reception of biogenous peptides and hydrolysates with adjusted level of conversion on the base of whey proteins enzymatic hydrolysis) transformation of secondary dairy raw materials components.

Application of whey proteins hydrolysis for prebiotic concentrates on the base of secondary dairy raw materials, enriched with lactulose, reception is conditioned by the opportunity their amino acid composition optimization as a source of Bifidobacteria nourishing.

It is possible to combine processes of lactose into lactulose isomerization and whey proteins hydrolysis. These processes has been realised in the framework of condensed and dry bifidogenous concentrates technology development. The dynamics of whey proteins hydrolysis while lactose into lactulose isomerization process is studied. The data analysis shows, that maximal degree of whey proteins alkaline hydrolysis is reached at a temperature (80 – 85) ^{0}C with an exposition during (22 – 26) minutes at the level of (37,5 – 39) per cent.

The process of substrate pH adjustment by the method of electrochemical activation was implemented in the framework of whey proteins enzymatic hydrolysates technology development. Pancreatic enzyme preparation was inoculated in cheese whey retentate after substrate pH adjustment in the interval from 7.5 to 9.5. Fermentation was carried out at a temperature 50^{0}C. Regulations of whey proteins enzymatic hydrolysis in cheese whey retentate, treated by electrochemical activation method, are established. The maximal value of amine nitrogen concentration and protein hydrolysis degree was reached in the retentate pH range of 8.5 to 9.0. The most intensive amine nitrogen concentration buildup appeared at a fermentation duration from 6 to 12 hours. Generally outcome of experiments validated efficiency of retetntate electrochemical activation application for whey protein concentrates with adjusted hydrolysis degree reception.

Technologies of functional foodstuffs for nutritional diseases prophylaxis (fermented milks, bread and bakery products, cereals and flakes) with addition of prebiotic concentrates on the base of secondary dairy raw materials are developed nowadays.

Литература.

1. *Bargeman G. Separation technologies to produce dairy ingredients. Dairy processing. Improving quality. Edited by Gerrit Smit. – Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2003. – P. 367 – 390.*
2. *Khramtsov A.G. Novation of whey processing. – St. Petersburgh : Profession, 2016. – 490 p.*
3. *Morgan F, Maugas J. J. Whey, the natural source for a broad range of food ingredients // Proceedings of the 5th International Whey Conference. – Paris, France, 2008. – P. 4 – 5.*

УДК 579.64

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОГО ВЫРАЩИВАНИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Кодачигова Е. В., Бутолина М. А., Бузиков Р. М., Дармов И. В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вятский государственный университет», Киров, Россия
610000 Кировская обл., Киров, ул Московская, д. 36
e-mail: biologiavgu@yandex.ru

Выявлен фактор, лимитирующий рост цианобактерий, поставлена серия экспериментов с целью оптимизации состава питательной среды. В результате определена оптимальная концентрация гидрофосфат-иона.

Ключевые слова: цианобактерии; питательная среда, капиллярный электрофорез, оптическая плотность.

Цианобактерии являются перспективным объектом микробной биотехнологии, они способны синтезировать различные биологически активные вещества, находящие применение в пищевой промышленности, косметике, биотехнологии, диагностике и медицине [1–3].

В отличие от эубактерий, цианобактерии недостаточно быстро наращивают биомассу. Поэтому оптимизация процесса их культивирования является актуальной проблемой биотехнологии.

Методические подходы к оптимизации процесса культивирования цианобактерий включают: подбор режима освещения, температуры, оптимизация состава питательной среды.

Для проведения работы из коллекции микроорганизмов ВятГУ были выбраны четыре изолята цианобактерий рода Nostoc, которые культивировались на питательной среде Громова № 6 универсальной для цианобактерий и микроводорослей [4], при температуре 26-28°С, относительной влажности воздуха 74-76%, фотопериод составлял 18 часов в сутки.

По результатам сравнения состава культуральной жидкости с исходной питательной средой методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель 105М» нами сделан вывод, что лимитирующим фактором является концентрация гидрофосфата, который наиболее активно поглощался цианобактериями из среды. Представлялось целесообразным оптимизировать концентрацию фосфата для ускорения прироста биомассы цианобактерий рода Nostoc. Был проведен полнофакторный эксперимент с шестью средами, содержащими разные концентрации K2HPO4 в интервале от 0,2 до 0,7 г/л. Для оценки кинетики роста биомассы через каждые семь суток отбирались пробы, по оптической плотности которых при длине волны 730 нм судили о концентрации цианобактерий в культуральной среде.

Как видно из графика (рис.1) наибольший эффект оказало повышение концентрации фосфата до 0,6 г/л. В целом у всех исследованных штаммов при таком составе среды прирост биомассы составляет порядка 20%.

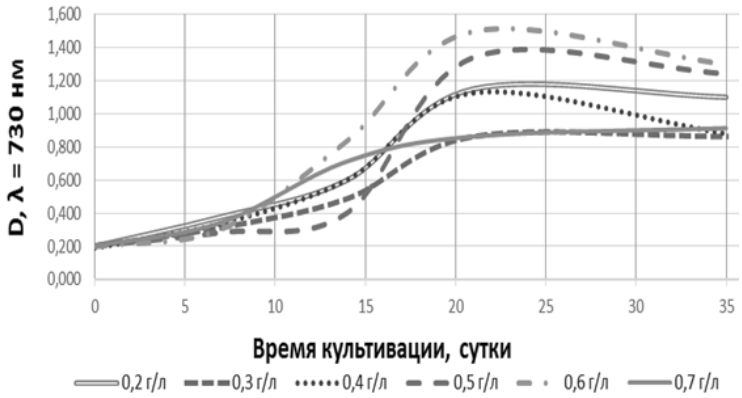


Рис.1 Изменение оптической плотности культур Nostoc в зависимости от концентрации фосфата в среде

Литература.
1. Hrouzek P., Kuzma M., Cerny J. The Cyanobacterial Cyclic Lipopeptides Puwainaphycins F/G Are Inducing Necrosis via Cell Membrane Permeabilizationand Subsequent Unusual Actin Relocalization // Chem. Res. Toxicol. – 2012. – V.25. – P. 1203–1211.
2. Wiesner C., Kopecky J., Pfluegerb M. Endothelial Cell-Based Methods for the Detection of Cyanobacterial AntiInflammatory

and Wound-Healing Promoting Metabolites // Drug Metabolism Letters. – 2007. – V.1. – № 3. – P. 1–7.
3. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р.Современные методы выделения и культивирования водорослей: учебное пособие. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 152с.

OPTIMIZATION OF COMPOSITION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR GROWING CYANOBACTERIA IN LABORATORY

Kodachigova E.V., Butolina M.A., Buzikov R.M., Darmov I.V.

Federal State Educational Institution of Higher Education «Vyatka State University», Kirov, Russia
610000 Kirov region, Kirov, Moskovskaya street, h. 36
e-mail: biologiavgu@yandex.ru

We identified factors limiting the growth of cyanobacteria, staged a series of experiments in order to optimize the composition of the culture medium. As a result, we determined the optimal concentration hydrophosphate ion.

Key words: cyanobacteria; nutrient medium, capillary electrophoresis, the optical density.

Cyanobacteria are a promising target microbial biotechnology. They are able to synthesize a variety of biologically active substances, which find application in food industry, cosmetics, biotechnology, medicine and diagnosis [1,2].

Unlike eubacteria, cyanobacteria biomass build up fast enough. Therefore, optimization of cultivation process is an actual problem of biotechnology.

Methodical approaches to optimization of the process of cultivation of cyanobacteria include the selection of lighting mode, temperature, optimization of compositions of the nutrient medium.

To carry out the work were selected four isolates of cyanobacteria Nostoc sort from VSU's collection of microorganisms, which were cultured in a Gromov's nutrient medium № 6 universal for cyanobacteria and microalgae [3], at a temperature of 26-28 ° C, relative humidity 74-76%, photoperiod was 18 hours a day.

By comparing results of the composition of culture liquid with nutrient medium by capillary electrophoresis instrument «Capel 105M» we concluded that the limiting factor is the concentration of phosphate (HPO42-), which is most actively absorbed by cyanobacteria from the environment.

It seemed appropriate to optimize the concentration of the phosphate to accelerate the growth of biomass cyanobacteria genus Nostoc. We conducted a full factorial experiment with six media containing K2HPO4 different concentrations ranging from 0.2 to 0.7 g/l.

To evaluate the kinetics of growth of the biomass every seven days, we sampled culture fluids, and measured for their absorbance at 730 nm, which gives an indication of the concentration of cyanobacteria in the culture medium.

As seen from the graph, increasing phosphate concentration to 0.6 g/l had the greatest effect. In all cases, the biomass from the culture medium at this composition has increased approximately 20% in comparison with the conventional medium.

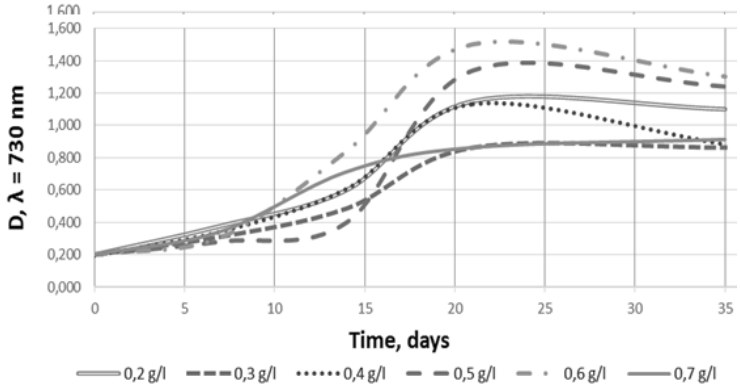


Fig.1 Change of optical density of Nostoc cultures as a function of phosphate concentration in the medium

References:
1. Hrouzek P., Kuzma M., Cerny J. The Cyanobacterial Cyclic Lipopeptides Puwainaphycins F/G Are Inducing Necrosis via Cell Membrane Permeabilizationand Subsequent Unusual Actin Relocalization // Chem. Res. Toxicol. – 2012. – V.25.

– P. 1203–1211.
2. Wiesner C., Kopecky J., Pfluegerb M. Endothelial Cell-Based Methods for the Detection of Cyanobacterial AntiInflammatory and Wound-Healing Promoting Metabolites // Drug Metabolism Letters. – 2007. – V.1. – № 3. – P. 1–7.
3. Gaysina L.A. Fazlutdinova A.I. Kabirov R.R.Sovremennyye metody vydeleniya i kultivirovaniya vodorosley:uchebnoye posobiye. – Ufa: Izd-vo BGPU. 2008. – 152s.

УДК 637.5:636.4.082

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ХРЕБТОВОГО ШПИКА ГИБРИДНОГО МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ КАНАДСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Миколайчик И.Н., Морозова Л.А., Ильтяков А.В., Неупокоева А.С.,[1]Панов Н.С.

[1]Университет Оттавы, Канада
ФГБОУ ВО «Курганская государственная сельскохозяйственная академия имени Т.С. Мальцева»
г. Курган, Россия
641300, Курганская область, с. Лесниково
e-mail: min_ksaa@mail.ru

Анализ жирнокислотного состава хребтового шпика молодняка свиней канадской селекции показал, что лучшими функционально-технологическими свойствами обладает шпик, полученный от трехпородных гибридов (ландрас х йоркшир х дюрок).

Ключевые слова: свиньи, хребтовый шпик, жирнокислотный состав.

Исследования отечественных и зарубежных ученых убедительно доказывают тесную корреляцию между структурой питания населения, заболеваемостью и смертностью. Так, болезни сердца и системы кровообращения в России находятся на первом месте среди причин смертности. Поэтому особое значение в профилактике основных факторов возникновения заболеваний необходимо придавать специализированным продуктам питания, в частности лечебно-профилактическим и функциональным продуктам. Пищевая и биологическая ценность продуктов специального назначения во многом зависит от количества и качества жиров, входящих в состав рецептурных композиций [1-3].

В качестве объекта исследования послужил хребтовый шпик, полученный от молодняка свиней завезенных из Канады породы ландрас, двухпородных (ландрас х йоркшир) и трехпородных гибридов (ландрас х йоркшир х дюрок), выращенных в ИП Глава КФХ Ильтяков В.Н. Курганской области и снятых с контрольного откорма при достижении средней живой массы 100-101 кг.

Анализ жирнокислотного состава показал, что суммарное количество насыщенных жирных кислот было больше в шпике молодняка породы ландрас, чем у помесных свиней. Однако в хребтовом шпике трехпородных гибридов (ландрас х йоркшир х дюрок) на 0,82% ($P<0,05$) больше содержалось стеориновой кислоты, чем у чистопородных ландрасов, что свидетельствует о более твёрдой консистенции шпика и более высокой температуре плавления. Это сокращает возможность деформации жирового сырья при нарезании и смешивании с другими компонентами рецептуры, улучшает условия диспергирования и эмульгирования жира при тонком измельчении, снижает вероятность отекания жира при тепловой обработке.

Проведенными исследованиями установлено, что в образце шпика молодняка свиней трехпородных гибридов содержание олеиновой кислоты было на 0,80% ($P<0,05$), линолевой кислоты – на 0,40% ($P<0,05$) больше, чем у чистопородных ландрасов, что свидетельствует о его большей биологической ценности, так как исследования последних лет показали, что ненасыщенные жирные кислоты нормализуют жировой обмен, повышают пластичность кровеносных сосудов, уменьшают вязкость крови, препятствуют образованию тромбов, стимулируют иммунитет (участвуют в образовании Т-лимфоцитов), продукцию простагландинов, обладают антиоксидантным и антиканцерогенным действием. Так же установлена их положительная роль в профилактике атеросклероза, ишемической болезни сердца, гипертонической болезни и др.

По содержанию линоленовой и арахидоновой жирных кислот в образцах шпика подопытных свиней существенных различий не отмечено.

Оценка качественных показателей жирнокислотного состава хребтового шпика, полученного от гибридных свиней канадской селекции, позволяет обоснованно использовать это сырье в качестве основного для улучшения технологических свойств фаршевых систем с твёрдой консистенции шпика, а также в

разработке функциональных мясных продуктах для людей, предрасположенных или страдающих сердечнососудистыми заболеваниями.

Литература.
1 Ильтяков А.В., Миколайчик И.Н., Морозова Л.А., Ступина Е.С. Метод повышения биологической полноценности мышечной и жировой ткани свиней // Аграрный вестник Урала. – 2015. – №6 (136). – С. 34-37.
2 Миколайчик И.Н., Морозова Л.А., Ильтяков А.В. Новое в производстве экологически безопасной свинины // Главный зоотехник. – 2015. – №2. – С. 21-28.
3 Миколайчик И.Н., Морозова Л.А., Ильтяков А.В., Прянишников В.В. Технологические основы переработки мяса: учебное пособие. – Курган: изд-во Курганской ГСХА, 2016. – 366 с.

УДК 637.5:636.4.082

FATTY ACID COMPOSITION OF BACKFAT OF CROSSBRED YOUNG PIGS OF CANADIAN SELECTION

Mikolaychik I. N., Morozova L. A., Iltyakov A. V., Neupokoyeva A. S.[1]Panov N.S.

[1]Univesrity of Ottawa, Canada
Kurgan State Agricultural Academy by T.S. Maltsev, Russia
Kurgan, Russia
641300, Kurgan region, with Lesnikovo,
e-mail: min_ksaa@mail.ru

Backfat young pigs of the Canadian selection was subject to a fatty acid composition analysis. It was determined that a three-pedigree hybrid of Landrace, York-Shire, and Duroc breeds produced fat with the best functional and technological properties.

Key words: pigs, back fat, fatty acid composition.

Correlations between the nutrition, morbidity and mortality rates within a particular population have been well established by the academic research of domestic and foreign scientists. In Russia, diseases affecting the heart and the circulatory system are the primary causes of natural death. Thus, the importance of specialized food products – healthcare and functional dietary products, in particular – must be emphasized in order to mitigate the risks associated with these diseases. Dietary and biological value of special-purpose food products largely depends on the quantity and quality of fat that is present within the product [1-3].

The object of the study was back fat obtained from young pigs imported from Canada. Breeds subject to the investigation were the Landrace, a two-pedigree hybrid of Landrace and Yorkshire (Landrace x Yorkshire), and a three-pedigree hybrid of Landrace, Yorkshire, and Duroc (Landrace x Yorkshire x Duroc). All pigs were grown in the PI Head of Peasant farms Iltyakov V. N. of the Kurgan region upon reaching an average live weight of 100-101 kg, after which they were taken off the controlled feeding.

Analysis of the fatty acid composition indicated that the saturated fatty acid content was higher for the Landrace breed than for either of the crossbred specimens. However, the back fat of the three-pedigree hybrid (Landrace x Yorkshire x Duroc) contained 0.82% ($P<0.05$) more stearic acid than the purebred Landrace, which yields fat with a more solid consistency and a higher melting point. This reduces the possibility of deformation of the raw fat products during cutting and mixing with other components of the formulation, improves the conditions of dispersion and emulsification of the fat during grinding, and reduces the likelihood of flow off during heat treatment.

During this investigation, it was determined that back fat of the three-pedigree hybrid contained 0.80% ($P<0.05$) more oleic acid and 0.40% ($P<0.05$) more linoleic acid than the back fat of the purebred Landrace. Because of the health benefits associated with unsaturated fatty acids, this result renders the fat of the three-pedigree hybrid as more biologically valuable. In particular, these health benefits include normalized fat metabolism, increased flexibility of blood vessels, reduced blood viscosity, prevention of blood clot formation, stimulation of the immune system (formation of T-lymphocytes), production of prostaglandins, antioxidant and anticarcinogenic effects, and the contribution to the prevention of atherosclerosis, coronary heart disease, hypertension etc.

No significant difference was observed in the content of linolenic and arachidonic fatty acids in samples of back fat of the pig breeds subject to the investigation.

Evaluation of the fatty acid composition in back fat obtained from the crossbred pigs of Canadian selection, allows for the implementation of this raw material in improving the technological properties of meat systems with

a solid fat consistency, and also in the development of functional meat products for people predisposed to or suffering from cardiovascular diseases.

References:
1. Iltyakov, A.V., Mikolaychik, I. N., Morozova L. A., Stupina, E. S. Method for the increase of biological value of muscle and adipose tissue of pigs // Agricultural gazette Urals. – 2015. – №6 (136). – P. 34-37.
2. Mikolaychik, I. N., Morozova L. A. Iltyakov A.V. Innovations in the production of organic pork // Chief Livestock. – 2015. – №2. – Pg. 21-28.
3. Mikolaychik, I. N., Morozova L. A. Iltyakov, A. V., Pryanishnikov V. V. Technological basis of meat processing: a tutorial. – Kurgan: publishing of Kurgan State Agricultural Academy, 2016. – Pg. 366.

УДК 637.4

ПРОИЗВОДСТВО ПИЩЕВЫХ ЯИЦ, ОБОГАЩЕННЫХ ЙОДОМ

Коршева И.А.

ФГБОУ ВО Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия
644122, г. Омск, ул. Октябрьская, 92
e-mail: kafptic@mail.ru

Использование препарата «Монклавит-1» в кормлении кур-несушек Хайсекс Уайт позволяет увеличить содержание йода в яйцах до 33,3%, а также увеличить яичную продуктивность и рентабельность производства на 4,2%.

Ключевые слова: пищевые яйца; йод; яичная продуктивность; Монклавит-1; функциональные продукты

В настоящее время проводится большое количество исследований, направленных на обогащение продукции животноводства и птицеводства микроэлементами, в частности йодом, который имеет большое значение для здоровья человека. Физиологическая роль йода, а также лечебные свойства уже достаточно хорошо изучены. Установлено, что территория России является йододефицитной, в связи с чем, при отсутствии профилактических мероприятий по восполнению йода в питании, его недостаток неблагоприятно сказывается на здоровье, как людей, так и сельскохозяйственной птицы [1].

Обогащение йодом продукции животноводства современным препаратом «Монклавит-1» является комплексным решением, поскольку позволяет не только обогатить товарные яйца и мясо птицы йодом, но и улучшить качество скорлупы, а также профилактировать заболевания поголовья [2].

Исследование проводилось в условиях промышленной птицефабрики Омской области на курах-несушках кросса Хайсекс Уайт в период с 23- по 48-недельный возраст. Поголовье составило 10000 голов. В период исследования кормление птицы подопытных групп было одинаковым (сбалансированные комбикорма), при этом опытная группа дополнительно получала препарат «Монклавит-1». Препарат вводился в рацион через систему поения в количестве 300 мл на 1000 л воды. Для поения кур-несушек использовались ниппельные поилки, расположенные внутри клетки. В результате исследований было установлено, что ввод йодсодержащего препарата благоприятно повлиял на жизнеспособность птицы – сохранность поголовья опытной группы за весь период содержания была на 3,1% больше, чем контрольной. Существенных различий по яйценоскости на среднюю несушку за период исследований в контрольной и опытной группах не наблюдалось, но можно отметить, что ввод повышенных доз йода позволил увеличить яйценоскость на 0,3% по сравнению с контрольной группой. Масса яиц является также одним из немаловажных показателей при оценке качества яйца, так как при одинаковой яйценоскости, но разной массе яиц, будет получено разное количество яичной массы. Во все возрастные периоды масса яиц в опытной группе превышала контрольную на 2,6-8,7%. В итоге, выход яичной массы был больше, чем в контрольной на 6,8%. Введение в рацион кур-несушек препарата йода оказало положительное влияние на качество скорлупы. Толщина скорлупы яиц в группе, получавшей в рационе йод, была на 8,5% выше, чем в контрольной группе, что можно объяснить оптимальным функционированием щитовидной железы, обеспечивающей полноценный обмен веществ, в частности, наилучшее усвоение кальция организмом.

Использование препарата «Монклавит-1» позволило повысить содержание йода в яйце до 33,3%. Более того, по результатам ранее проведенных исследований, яйца кур, обогащённые йодом при помощи данного препарата, практически полностью сохраняют его при кулинарной обработке и могут считаться функциональными продуктами, обеспечивающими организм человека необходимыми микронутриентами [2].

В результате, за счет более высокой продуктивности и сохранности поголовья, а также реализационной стоимости яиц, обогащенных йодом, рентабельность производства в опытной группе была выше, чем в контрольной на 4,2%.

Литература.
1. Обогащение яиц йодом / В.И. Фисинин [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2011. - № 4. – С. 37-40
2. Спиридонов А., Кислова О. Обогащение йодом яиц и мяса кур // Птицеводство. – 2011. - № 3. - С. 21-25

PRODUCTION OF IODINE-RICH EDIBLE EGGS

Korsheva I.A.

FSBEI HPE Omsk State Agrarian University
Omsk, Russia
644122, Omsk, ul.Oktyabrskaya, 92
e-mail: kafptic@mail.ru

Using Monklavit-1 in the feeding of laying hens allows to increase the iodine level in their eggs up to 33,3%, which makes them functional products, as well as to increase the production profitability by 4,2%.

Key words: edible egg; iodine; egg production; Monklavit-1; functional foods

Nowadays much research is conducted in order to enrich animal and poultry products with minor nutrient elements including iodine, which is very important for human health. Its physiologic role and medical properties are already thoroughly studied. The Russian Federation territory is considered to be iodine-deficient, which produces a bad influence on poultry as well as people's health if no preventive measures aimed at nutrition iodine enrichment are taken [1].

Using Monklavit-1 modern medicament to enrich animal products with iodine is an overall solution, because it allows to enrich market eggs and poultry meat with iodine as well as increase eggshell quality and prevent livestock diseases [2].

The research was conducted in the conditions of industrial poultry farms in the Omsk region chickens-laying hens Hisex White cross during the period 23- to 48-week age. The population was 10,000 hens. In the study period, feeding the birds experimental groups was identical (complete feed), the experimental group received an additional Monklavit-1. The drug is was administered in the diet by watering system in an amount of 300 ml per 1,000 liters of water. For the watering of hens used nipple drinkers located inside the cell.

As a result, studies have found that the introduction of an iodine-containing drug favorably affected the viability of birds - the conservation the experimental group during the entire period was 3.1% higher than the control group.

There were no significant differences in egg production on the hen for a period of research in control and experimental groups were not observed, but it may be noted that the introduction of high doses of iodine allowed to increase egg production by 0.3% compared with the control group.

Egg weight is also one of the important indicators in assessing the quality of the eggs, as at the same egg, but different mass of eggs, you will receive a different amount of egg mass. In all age periods of the mass of eggs in the experimental group than the reference to 2,6-8,7%. As a result, the output of egg mass was greater than the control at 6.8%.

Introduction to the ration laying hens iodine preparation has had a positive impact on the egg shell quality. The thickness of the egg shell in the group treated with iodine in the diet was 8.5% higher than in the control group, which can be attributed to the optimal functioning of the thyroid gland, providing a complete metabolism, in particular, the best absorption of calcium.

Using the preparation Monklavit-1 allowed to raise the iodine content in the egg to 33.3%. Moreover, according to the results of previous studies, chicken eggs enriched with iodine using the drug, almost completely retain his when cooked and can be regarded as functional products that provide the human body needs micronutrients [2].

As a result, due to the higher productivity and of conservation livestock and realizable value eggs enriched with iodine, profitability of production in the experimental group was higher than in the control to 4.2%.

References:
1. Obogashchenie yaic jodom / V.I. Fisinin [i dr.] // Ptica i pticeprodukty. – 2011. - № 4. – S. 37-40
2. Spiridonov A., Kislova O. Obogashchenie jodom yaic i myasa kur // Pticevodstvo. – 2011. - № 3. - S. 21-25

УДК 637.352

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА МЯГКОГО СЫРА ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Гаврилова Н.Б., Макарова Е.А.

Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Омск, Россия
646410, Омская область, Саргатский район, д. Ивановка, ул. Трактовая, д.8
e-mail: makarovaea88@bk.ru

В качестве функционального ингредиента выбраны гречневые отруби, они бедны углеводами, но богаты белком и растворимыми пищевыми волокнами. Определен режим подготовки и внесения гречневых отрубей в мягкий сыр. Предложен вариант решения проблемы по равномерному распределению функционального компонента по всей массе продукта.

Ключевые слова: мягкий сыр; гречневые отруби; иммобилизация; биополимеры; мембраны.

Продукты питания являются одними из важнейших факторов, определяющих здоровье человека. Они должны удовлетворять потребности человека в основных питательных веществах и энергии, а также обладать профилактическими и лечебными свойства [1].

Организация целевого питания подразумевает создание продуктов с определенными свойствами и составом. Этим требованиям отвечают пищевые функциональные продукты питания, при создании которых важны выбор и обоснование ингредиентов, формирующих новые свойства, связанные со способностью оказывать физиологическое воздействие на организм человека.

В современных условиях важным фактором является проблема все возрастающего дефицита нативного пищевого белка и пищевых волокон в питании населения.

Особо ценным источником натуральных пищевых волокон являются продукты переработки зерновых культур, так в молочной промышленности уже нашли применение такие виды, как отруби пшеничные и ржаные. Менее известными являются гречневые отруби.

На кафедре продуктов питания и пищевой биотехнологии (Омский ГАУ) проводятся аналитические и экспериментальные исследования, по изучению способа подготовки гречневых отрубей и их использованию в технологии нового вида мягкого сыра.

Просушенные при температуре 190-180 °С в течение 5-7 мин гречневые отруби, охлаждаются до температуры 20 °С. Затем через специальный дозатор, при перемешивании вносится в смесь биополимеров при t = 40 °С. Полученный раствор дозируется слоями в стерильные формы, которые выдерживаются в течение 15-20 мин в стерильных условиях специального бокса для получения пленок (мембран). Герметично закрытые формы с мембранами хранятся при температуре (4±2) °С до использования в экспериментальных исследованиях. Перед внесением в нормализованную пастеризованную смесь мембраны из гречных отрубей и смеси биополимеров измельчаются и вносятся при перемешивании в заквашенную смесь.

В результате экспериментальных и аналитических исследований разработана технология производства мягкого сыра с гречневыми отрубями.

Литература.
1. Гаврилова, Н. Б. Использование растительных ингредиентов в технологи мягкого сыра / Н. Б. Гаврилова, Е. А. Макарова // Сыроделие и маслоделие. – 2016. – № 5. – С. 36-37.

UDK 637.352

THE DEVELOPMENT OF PRODUCTION TECNIQUES OF SOFT CHEESE FOR DYNAMIC NUTRITION

Gavrilova N. B., Makarova E. A.

Omsk state agrarian University named after P. A. Stolypin, Omsk, Russia
646410, Omsk Region, Sargatskiy district, Ivanovka village,8 Traktovaya Str.
e-mail: makarovaea88@bk.ru

Buckwheat bran is taken as a dynamic component, it is poor in carbohydrates but rich in protein and soluble food fiber. The mode of preparation and introduction of buckwheat bran in soft cheese is determined. The solution to the problem of even distribution of the functional component throughout the product mass is proposed.

Key words: soft cheese; buckwheat bran; immobilization; biopolymers; membranes.

Food is one of the most important factors determining human health. It should meet the needs of people in key nutrients and energy as well as possess preventive and therapeutic properties [1].

The mode of principle diet involves the creation of products with some specified properties and composition. These requirements are met by functional food products, being produced with the careful selection and validation of the ingredients which form the new properties giving a physiological effect on the human body.

In modern life the important factor is the problem of the growing shortage of native food protein and dietary fiber in the people diet.

A particularly valuable source of natural dietary fiber are the products of grain crops processing and the dairy industry has already found application to such ingredients as wheat and rye bran. Buckwheat bran is used less.

The Department of food and nutritional biotechnology (Omsk state agrarian university) conducts analytical and experimental researches to study the method of buckwheat bran preparation and its use in the technology of a new kind of soft cheese.

Having been dried up at the temperature of 190-180 °C for 5-7 min buckwheat bran should be cooled to the temperature of 20 °C. Then through a special proportioner while stirring it is introduced into the mixture of biopolymers at t = 40 °C. The resulting solution is dosed in layers in sterile forms then taken for 15-20 min in sterile conditions in a special box to get the films (membranes). Hermetically closed forms with the membranes are stored at the temperature of 4±2 °C till being used in experimental studies. Before introducing in the normalized pasteurized mixture the biopolymers and buckwheat bran membranes are ground up and added with stirring in a fermented mixture.

As a result of the experimental and analytical studies the soft cheese with buckwheat bran production technology has been developed.

References:
1. Gavrilova, N. B. The usage of vegetable ingredients in soft cheese technology / N. B. Gavrilova, E. A. Makarova // Cheese and butter industry. – 2016. – No. 5. – p. 36-37.

УДК 637.146

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОЙОГУРТА НА ОСНОВЕ КОЗЬЕГО МОЛОКА ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Темербаева М.В.

Павлодарский Государственный Университет им. С.Торайгырова, Павлодар, Казахстан
140008, Павлодар, ул. Ломова, д 46
marvik75@yandex.ru

Проведены исследования по подбору смесевой композиции из козьего и коровьего молока. Представлена технология производства биойогурта на основе козьего молока.

Ключевые слова: молоко козье, биойогурт, пектин, биотехнология, органолептические показатели.

В настоящее время молочное козоводство в Республике Казахстан – небольшой и медленно растущий сегмент молочного рынка. Поэтому увеличение производства молочных продуктов из козьего молока – одна из основных задач молочной промышленности на современном этапе. С 1 мая 2015 г. введен в действие новый межгосударственный стандарт на козье питьевое молоко – ГОСТ 32259-2013. Молоко цельное питьевое козье. Технические условия. [1].

Проведены исследования по подбору смесевой композиции из козьего и коровьего молока. Изучены

составы козьего и коровьего молока, и их различных композиций на их основе. Установлено, что плотность сгустка возрастает при соотношении козьего молоко к коровьему 70/30. В современных условиях одним из необходимых элементом питания человека являются пищевые волокна. В результате исследований было выявлено, что положительное влияние на консистенцию опытных продуктов в большей степени оказано стабилизирующей системой ГЕНУ® пектин тип LM-106 AS-YA в отличие ГЕНУ® пектин тип YM-115-L.[2]. Процесс производства осуществлялся согласно традиционной технологии. Смесевую композицию молоко козье/коровье (70/30) подогревали до (35 ± 1) °С, затем нормализовали. [3]. Нормализованную смесь пастеризовали при (71 ± 2) °С, гомогенизировали, охлаждали до температуры заквашивания (40 ± 2) °С, вносили закваску, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophillus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus paracasei, Strepotococcus thermophillus, пектин ГЕНУ® пектин тип LM-106 AS-YA в количестве 0,5%, пребиотик лактитол в количестве 1%. Процесс скашивания осуществлялся в течение 6-8 часов. По окончании процесса сквашивания вносились вкусовые наполнители (ананасовый, манговый, киви). Готовый продукт перемешивался в течение 10 минут, фасовался, оправлялся но созревание.

По органолептическим и физико-химическим показателям новый продукт соответствует ГОСТ 31981-2013. Йогурты. Общие технические условия. Органолептические показатели: внешний вид и консистенция однородная, в меру вязкая, с ненарушенным сгустком, поверхность и масса однородная, кремообразная с частицами внесенных вкусовых компонентов. Вкус и запах чистые, кисломолочные, без посторонних привкусов и запахов, в меру сладкий, с соответствующим вкусом и ароматом внесенных компонентов. Цвет обусловлен цветом внесенных компонентов, однородный или с вкраплениями нерастворимых частиц, равномерный по всей массе. Физико-химические показатели: массовая доля белка 2,8± 0,5%, углеводы 14,2± 1%, массовая доля жира 4 ± 1%, кислотность 75± 1° Т, энергетическая ценность 108 / 452 ккал/кДж. В результате экспериментальных и аналитических исследований разработана технология производства биойогурта на основе козьего молока.

Литература.
Темербаева М.В. Подбор полисахаридного комплекса для стабилизации структуры биойогурта на основе козьего молока // «Аграрная наука сельскому хозяйству». Алтайский государственный Аграрный университет, 2014. Т.3. С. 205–207.
Даниярова Г. М., Гумарова А. К., Абуова А. Б., Суханбердина Ф. Х. Сравнительная оценка органолептических и физико-химических показателей йогурта из козьего и коровьего молока // Молодой ученый. 2015. № 63. С. 29–33.
Канарейкина С.Г., Ребезов М.Б., Нургазезова А.Н., Касымов С.К. Методологические основы разработки новых видов молочных продуктов // Учебное пособие. Алматы, 2015. 126 с.

UDK 637.146

TECHNOLOGY DEVELOPMENT OF BIOYOGHURT BASED ON GOAT MILK FOR FUNCTIONAL NUTRITION

Temerbayeva M. V.

Pavlodar State University. by S.Toraigyrov, Pavlodar, Kazakhstan
140008, Pavlodar, Lomov St, house 46
marvik75@yandex.ru

The selection research of the mixture composition both of goat and cow milk was conducted. Technology production of bioyoghurt based on goat milk was presented.

Key words: goat milk, bioyoghurt, pectin, biotechnology, organoleptic characteristics.

At present, the dairy goat breeding in the Republic of Kazakhstan is a small and slow-growing segment of dairy market. Therefore, an increase in production of dairy products made from goat milk is one of the main tasks of the dairy industry at the present stage. On the first of May, 2015 a new interstate standard for goat milk drinking, namely, GOST 32259-2013 was entered. Drinking goat whole milk. Specifications. [1].

The research of the selection of the mixture consistency of goat and cow milk was conducted. Consistency of goat and cow milk, and various compositions based on them were studied. It was found out that the clot density increases at a ratio of goat milk to cow's 70/30. In modern conditions an essential element of human nutrition is

dietary fiber. The studies revealed that a positive effect on the consistency of the products experienced to a greater degree provided a stabilizing system of GENE® pectin type LM-106 AS-YA in contrast to GENE® pectin type YM-115-L. [2].The production process was carried out according to the conventional technology.

The mixed composition of goat milk/cow (70/30) was heated up to (35 ± 1) °C, then normalized [3]. The normalized mixture was pasteurized at (71 ± 2) °C, homogenized, cooled to fermentation temperature (40 ± 2) °C, leaven was added, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophillus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus paracasei, Strepotococcus thermophillus, pectin GENU® pectin type LM-106 AS-YA in the amount of 0.5%, prebiotic lactitol in the amount of 1%. The cutting process was carried out for 6-8 hours. After the fermentation process was introduced flavored fillings (pineapple, mango, kiwi) were added. The finished product was stirred for 10 minutes, packed up, then sent to maturation.

By organoleptic and physico-chemical parameters of the new product complies with GOST 31981-2013. Yogurt. General specifications. Organoleptic characteristics: appearance and homogeneous is consistency, moderately viscous, with intact clot, surface and mass is homogeneous, creamy, on the surface of the product there are inclusion of insoluble particles typical for the inserted components. Taste and smell are clean, fermented milk, without any foreign tastes and odors, moderately sweet, with the appropriate taste and aroma made components. The color caused by the color made components that are homogenous with inclusions of insoluble particles, uniform throughout the mass.

Physical and chemical properties: mass fraction of protein 2,8 ± 0,5%, carbohydrates 14.2 ± 1% fat mass fraction 4 ± 1%, acidity of 75 ± 1 °T, energy value of 108/452 kcal/kJ.

As a result of experimental and analytical studies the technology of bioyoghurt production based on goat milk was elaborated.

References:
1. Temerbaeva M.V. Podbor polisaharidnogo kompleksa dlja stabilizacii struktury biojogurta na osnove koz'ego moloka // «Agrarnaja nauka sel'skomu hozjajstvu». Altajskij gosudarstvennyj Agrarnyj universitet, 2014. T.3. S. 205–207.
2. Danijarova G. M., Gumarova A. K., Abuova A. B., Suhanberdina F. H. Sravnitel'naja ocenka organolepticheskih i fiziko-himicheskih pokazatelej jogurta iz koz'ego i korov'ego moloka // Molodoj uchenyj. 2015. # 63. S. 29–33.
3. Kanarejkina S.G., Rebezov M.B., Nurgazezova A.N., Kasymov S.K. Metodologicheskie osnovy razrabotki novyh vidov molochnyh produktov // Uchebnoe posobie. Almaty, 2015. 126 s.

УДК 66.047

РАЗРАБОТКА РАЦИОНА ПИТАНИЯ ДЛЯ ЛЮДЕЙ, СТРАДАЮЩИХ НЕПЕРЕНОСИМОСТЬЮ КОРОВЬЕГО МОЛОКА И БЕЛКА ЗЛАКОВЫХ – ГЛЮТЕНА.

Ушакова Ю.В., Рысмухамбетова Г.Е., Белова М.В., Бухарова Е.Н., Забелина М.В.

ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова
410012, Театральная пл. 1.
e-mail:ushakovaj1990@gmail.com

Разработан рацион питания, для людей с пищевой аллергией на коровье молоко и на белок злаковых – глютен. Данный рацион предлагается применять в столовых специализированных пансионатов для профилактики и лечения данных видов непереносимости, а также ряда функциональных расстройств, связанных с несбалансированным питанием.
Ключевые слова: пищевая непереносимость коровьего молока, непереносимость белка злаковых – глютена, бесказеиновое питание, пищевой рацион, безглютеновое питание, блюда с добавлением козьего молока, целиакия.

Разработка полноценных рационов питания является актуальной задачей современной пищевой отрасли, так как от правильно организованного питания зависит здоровье человека.Одной из проблем диетологии является обеспечение полноценным питанием людей с непереносимостью коровьего молока и белка злаковых-глютена [1,2]. Из литературных источников известно, что при некоторых заболеваниях (например, аутизм), показана безглютен - безказеиновая диета (БГБК)[3].

В ходе работы был составлен рацион питания для людей, страдающих непереносимостью коровьего молока и белка злаковых (глютена) на основе разработанных нами рецептур и технологий кулинар-

ной продукции. Согласно рекомендациям диетологов, при глютеновой энтеропатии (целиакии) пищевая ценность рациона составляет: белки – 100-140 г, жиры – 100-120 г, углеводы – 400-500г, энергетическая ценность – 3000-3700 ккал. При аллергии на коровье молоко пищевая ценность рациона составляет: белки-90-100 г, жиры – 90-100 г, углеводы – 360-425 г, энергетическая ценность – 2600-3000 ккал [4].

В разработанный суточный рацион питания для больных, страдающих аллергией на коровье молоко и глютеновой энтеропатией, входят следующие блюда: на завтрак - рисовая каша на козьем молоке, пудинг из гречневой крупы с овсяной мукой, апельсины свежие, чай с лимоном; на обед - суп из овощей, каша гречневая рассыпчатая, рыба (треска),тушеная в томате с овощами, салат из свежих огурцов, напиток из плодов шиповника; на полдник - оладьи с козьим молоком и кукурузной мукой, соус молочный сладкий, чай с сахаром; на ужин №1 - капуста тушеная, птица (курица) отварная, салат из свеклы с сыром, кисель из яблок; на ужин № 2 - йогурт «Айвиша», бананы. Пищевая ценность суточного рациона составляет: белки – 103 г, жиры – 93 г, углеводы – 371 г, энергетическая ценность –2728 ккал. Таким образом, нами был разработан рацион для людей с пищевой аллергией на коровье молоко и на белок злаковых – глютен, который рекомендуется применять в столовых специализированных пансионатов для профилактики и лечения данных видов непереносимости, а также ряда функциональных расстройств, связанных с несбалансированным питанием.

Литература.
Балаболкин И.И. Пищевая аллергия у детей первого года жизни //Вопр. современной педиатрии. - 2006; № 5. – С. 77-80.
Ногаллер А.М. Хронические энтеропатии // Клиническая медицина 1990, №7. – С. 25-34.
Бейкер И. А. Диета в лечении раннего детского аутизма // Вита портал. интернет-журн.URL:http://vitaportal.ru/medicine/psihiatriya-i-dushevnyebolezni/dieta-v-lechenii-rannego-detskogo-autizma.html (дата обращения: 17.04.2014).
Покровский А. А., Самсонов М. А. Справочник по диетологии. М.: Медицина, 1981. - 703 с.

UDC 66.047

DEVELOPMENT OF A DIET FOR PEOPLE SUFFERING FROM INTOLERANCE TO COW'S MILK AND GLUTEN (CEREAL PROTEIN)

Yu.V. Ushakova, G.E. Rysmuhambetova, M.V. Belova, and E.N. Bukharova, Zabelina M.V.

Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov
1 Teatralnaya Sq., Saratov 410012, Russian Federation
E-mail:ushakovaj1990@gmail.com

A diet for people with food allergies to cow's milk and gluten (a cereal protein) was developed. This diet is proposed to use in the canteens of specialized boarding houses to prevent and treat these types of intolerance and a number of functional disorders related to unbalanced nutrition.

Key words: intolerance to cow's milk, intolerance to gluten, casein-free food, diet, gluten-free food, dishes with goat's milk added, celiac disease.

The development of high-grade diets is an urgent task of the modern food industry, because human health depends on the properly organized nutrition. To supply people with intolerance to cow's milk and gluten (a cereal protein) with adequate nutrition is a problem of dietology [1, 2]. It is known from the literature that a gluten-free and casein-free diet is good at certain diseases (e.g., autism) [3].

In the course of our work, a diet was composed for people suffering from intolerance to cow's milk and gluten (a cereal protein) on the basis of culinary recipes and technologies developed by us. According to the recommendations of nutritionists, at gluten enteropathy (celiac disease), the nutritional value of the diet should be: proteins 100–140 g, fat 100–120 g, carbohydrates 400–500 g, the energy value 3,000–3,700 kcal. In the case of allergy to cow's milk the diet value should be: proteins 90–100 g, fats 90–100 g, carbohydrates 360–425 g, the energy value 2,600–3,000 kcal [4].

The daily diet designed for patients allergic to cow's milk and with celiac disease includes the following meals: breakfast—rice porridge with goat milk, buckwheat pudding with oatmeal, fresh oranges, and lemon tea; dinner—vegetable soup, crumbly buckwheat porridge, fish (cod) stewed in tomato sauce with vegetables, cucumber salad, and drink from the hips; lunch—pancakes with goat's milk and corn flour, sweet milk sauce, and tea with sugar;

supper No 1— stewed cabbage, boiled chicken, beet salad with cheese, and apple jelly; supper No 2—Ivisha® yogurt and bananas. The nutritional value of this daily diet is: proteins 103 g, fat 93 g, carbohydrates 371 g, the energy value 2,728 kcal.

Thus, we have developed a diet for people with food allergies to cow's milk and gluten (a cereal protein), which is recommended for use in the canteens of specialized boarding houses to prevent and treat these types of intolerance, as well as a number of functional disorders related to unbalanced nutrition.

References:
I.I. Balabolkin. Food allergy in infants // Problems of Modern Pediatrics. - 2006; No 5. - P. 77–80.
A.M. Nogaller. Chronic enteropathy // Clinical Medicine, 1990, No 7. - P. 25–34.
I.A. Baker. Diets in the treatment of infantile autism // Vitaportal, URL http://vitaportal.ru/medicine/psihiatriya-i-dushevnyebolezni/dieta-v-lechenii-rannego-detskogo-autizma.html (reference date: 17.04.2014).
A.A. Pokrovsky and M.A. Samsonov. Guide to Nutrition. Moscow, Medicine, 1981. - 703 p.

УДК 637.051+66-963

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ НАКОПЛЕНИЯ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ В ПРОЦЕССЕ ФЕРМЕНТАЦИИ МОЛОКА

Потороко И.Ю., Калинина И.В., Цирульниченко Л.А., Ботвинникова В.В.

Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия
454080, Челябинск, Проспект Ленина, 76
e-mail: irina_potoroko@mail.ru

Исследовано влияние ультразвуковой кавитации на рост симбиотической закваски кефирного грибка в процессе ферментации молока. Показано, что в кефирах, полученных с применением ультразвуковой обработки, количество кефирана составляет 164,2…204,9 мг/л.

Ключевые слова: ультразвуковая кавитация, ферментация; экзополисахарид, кефиран

Регулярное присутствие в рационах населения экзополисахаридов создает условия для поддержания защитных систем организма человека, предупреждения и профилактики онкологических и аутоиммунных заболеваний, улучшения качества жизни в целом. Успешная реализация поставленных задач возможна на основе применения ультразвукового кавитационного воздействия на гетерогенные пищевые среды с жидкой фазой (молоко). В качестве интегрального показателя физиологической ценности кисломолочных напитков может быть накопление полисахарида кефирана, обладающего противоопухолевой, иммуномодулирующей активностью. Кефиран – это водорастворимый экзополисахарид, продуцируемый Lactobacillus kefiranofaciens, L. kefirgranum, L. parakefir, L. kefir and L. delbrueckii subsp. bulgaricus. Кефиран состоит примерно в равных пропорциях из D-глюкозы и D-галактозы.

Целью настоящей работы является поиск методов модификации технологии производства кисломолочных продуктов, направленных на интенсификацию накопления экзополисахарида кефирана.

Установлено, что для кефиров, полученных по традиционной технологии, (90% случаев) отсутствует типичный симбиоз бактериальных и дрожжевых клеток и, как следствие, наблюдается снижение уровня накопления кефирана.

Установлено, что динамика накопления кефирана находится в прямой зависимости от режимов УЗВ и активности заквасочных культур. В опытных образцах отмечается активизация процесса роста кефирного грибка сопровождается накоплением продуктов метаболизма. В кефирах, полученных с применением ультразвуковой обработки, количество кефирана составляет 164,24…204,94 мг/л, а в напитках, полученных на основе комбинированной закваски кефирана продуцируется 187,7…190,7 мг/л.

Таким образом, применение УЗВ может обеспечить достижение функциональных свойств кисломолочной продукции, повышения ее качества и интенсификации процессов производства

UDC 637.051+66-963

INTENSIFICATION OF ACCUMULATION OF EXOPOLYSACCHARID IN THE COURSE OF MILK FERMENTATION

I. Potoroko, I. Kalinina, I. Tsirulnichenko, V. Botvinnikov

South Ural State University, Russia
454080, Chelyabinsk, Lenina, 76
e-mail: irina_potoroko@mail.ru

Influence of ultrasonic cavitation on growth of symbiotic ferment of a kefir fungus in the course of milk fermentation is investigated.n the prototypes the intensification of the kefir grains growth is accompanied by accumulation of metabolic products. In kefir, produced with ultrasonic treatment, the quantity of kefiran is 164,24…204,94mg/l, and in drinks, derived from the combination of the leaven kefiran the quantity is 187,7…190,7 mg /l(1).

Key words: ultrasonic cavitation, fermentation; exopolysaccharid, kefiran

A regular presence of exopolysaccharides in the diets of people creates the conditions for maintaining of the human body safety systems, prevention of cancer and autoimmune diseases, improving the quality of life in general. The successful implementation of the tasks can be based on the use of ultrasonic cavitation impact on heterogeneous food media with a liquid phase (milk). As an integral indicator of fermented milk drinks physiological value could be the accumulation of polysaccharide kefiran, that has an anti-tumor, immunomodulatory activity. Kefiran - a water-soluble exopolysaccharide produced by the Lactobacillus kefiranofaciens, L. kefirgranum, L. parakefir, L. kefir and L. delbrueckii subsp. bulgaricus. Kefiran consists of almost equal proportions of D-glucose and D-galactose(1).

The aim of this work is to search the methods of the technology modification of fermented milk products focused on intensification of kefirana exopolysaccharide accumulation.

It is found that for kefir obtained by conventional technology (90% of cases) there is no typical symbiosis of bacterial and yeast cells and as a consequence there is a decrease in the level of kefiran accumulation. It is found that the dynamics of kefiran accumulation is in direct relationship to the activity of the ultrasound modes and starter cultures. In the prototypes the intensification of the kefir grains growth is accompanied by accumulation of metabolic products. In kefir, produced with ultrasonic treatment, the quantity of kefiran is 164,24…204,94mg/l, and in drinks, derived from the combination of the leaven kefiran the quantity is – 187,7…190,7 mg /l(1).

Thus, the use of the ultrasound can provide the achievement of functional properties of dairy products, improvement of quality and intensification of production processes. The use of the ultrasound can be promising for the development of new products in the functional composition of diets aimed at correcting behavioral disorders during stress.

УДК 665.1:66.096

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНЗИМНОЙ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ И ПОЛУЧЕНИЕ ЖИРОВЫХ ПРОДУКТОВ, ОБОГАЩЕННЫХ МОНО- И ДИГЛИЦЕРИДАМИ

Шеламова С.А., Дерканосова Н.М., Василенко О.А.

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия
394087, Воронеж, ул. Мичурина, д. 1
e-mail: shelam@mail.ru

Получены жировые продукты, обогащенные моно- и диглицеридами путем энзимной этерификации олеиновой кислоты и глицерина и глицеролиза подсолнечного масла. Соотношением глицеридов можно управлять путем изменения соотношения субстратов, наличия и вида растворителя.

Ключевые слова: масло, жирные кислоты, глицерин, этерификация, глицеролиз, липаза, моноглицериды, диглицериды.

Моно- и диацилглицериды являются наиболее широко используемыми в пищевой промышленности эмульгаторами [1, 2]. Известно получение жировых продуктов, обогащенных такими глицеридами, как путем химической, так и ферментативной переэтерификации. Внедрение ферментативных технологий сдерживается по ряду причин – недостаточной активности и стабильности липолитических препаратов в органической среде, высокой стоимости иммобилизованных липаз, отсутствием отечественного производства препаратов.

В настоящей работе исследованы процессы переэтерификации жиров с помощью иммобилизованной липазы с позиционной специфичностью, высокой трансацилирующей активностью и стабильностью в органических средах [3]. Продукты переэтерификации определялись методами тонкослойной и высокоэффективной хроматографии. Процесс этерификации исследован при различном соотношении субстратов – глицерина и олеиновой кислоты; дозировка ферментного препарата составляла 10% к массе субстратов; температура – 35 ºС. При увеличении молярного отношения от 1,54 до 9,22 выход моноглицеридов повышался от 39,6 до 53,1%; количество диглицеридов составляло 46,2–41,9%. На состав продуктов значительное влияние оказывал тип растворителя. При равной массовой доле глицерина и олеиновой кислоты (молярное отношение 3,08) в неполярном растворителе количество моно- и диглицеридов выравнивается; проведение этерификации в полярном растворителе позволяет получить больший выход моноглицеридов (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние растворителя на состав продуктов этерификации (мол.%) в равновесном состоянии (за 8 ч)

Растворитель	МАГ	ДАГ
2-Метил-2-пропанол	70,2±4,2	16,7±1,2
Гексан	44,3±2,5	48,7±2,7
Без растворителя	40,9±2,4	45,8±2,6

В процессе глицеролиза в системе без растворителя при соотношении глицерин:ацильные группы 1,3:1 к 8 ч трансформировалось до 97 мол.% триглицеридов; моноглицериды накапливались в количестве 68,7 мол.%, диглицериды составляли 26,1 мол.%. Жирные кислоты появлялись в реакционной смеси начиная с 4 ч, в равновесном состоянии их количество находилось в пределах 2%. Проведение глицеролиза в среде с растворителем (2-метил-2-пропанол) при концентрации глицерина 10% показало, что процесс конверсии триглицеридов идет несколько медленнее, что, по всей вероятности, связано с влиянием растворителя на активность фермента. Равновесное состояние отличалось составом продуктов от системы без растворителя: больше образовывалось моноглицеридов – до 85,8 мол.% и, соответственно, меньше диглицеридов – 7,2 мол.%. Таким образом, данный ферментный препарат позволяет провести эффективную конверсию глицеридов при малых энергозатратах и ограниченной продолжительности.

Литература.
1. О'Брайен Р. Жиры и масла. Производство, состав и свойства, применение. – СПб.: Профессия, 2007. 752 с.
2. Мазалова Л. М. Тенденции в области производства специализированных жиров // Кондитер. пр-во. – 2011. – № 3. – С. 16–17.
3. Шеламова С.А. Научно-практические аспекты технологии модификации растительных масел для жировых продуктов с функциональными свойствами: Автореф. дис. докт. техн. наук. – Москва, 2012. – 51 с.

УДК 665.1:66.096

STUDY OF ENZYMATIC INTERESTERIFICATION AND OBTAINMENT FAT PRODUCTS, ENRICHED MONO- AND DIGLYCERIDES

Shelamova S. A., Derkanosova N. M., Vasilenko O. A.

FGBOU VO «Voronezh state agrarian University named after Emperor Peter I», Voronezh, Russia
394087, Voronezh, Michurina str., 1
e-mail: shelam@mail.ru

Received fat products enriched with mono- and diglycerides by enzyme esterification of oleic acid and glycerol and glycerolysis sunflower oil. Ratio of glycerides can be controlled by changing the ratio of substrates, the presence and kind of solvent.

Key words: oil, fatty acids, glycerol, esterification, glycerols, lipase, monoglycerides, diglycerides.

Mono - and diacylglyceride are the most widely used in the food industry emulsifiers [1, 2]. Known to produce fat products, enriched glycerides such as by chemical and enzymatic interesterification. The introduction of enzymatic technologies deriva is for several cause – insufficient activity and stability of lipolytic preparations in organic medium, the high cost of immobilized lipase, a lack of domestic production of preparations.

In the present work we have studied the processes of transesterification of fats using immobilized lipases with positional specificity, high synthetic activity and stability in organic media [3]. The products of transesterification was determined by thin layer and high performance chromatography. The process of etherification was investigated under different ratio of substrates of glycerol and oleic acid; the dosage of the enzyme preparation was 10% by weight of substrates; temperature – 35 ºC. By increasing the molar ratio of from 1,54 to 9.22 yield of monoglycerides was increased from 39.6 to 53.1 percent; the amount of diglycerides was of 46.2–41.9 percent. The composition of the products are significantly influenced by solvent type. At equal mass concentration glycerin and oleic acid (molar ratio of 3.08) non-polar solvent number of mono - and diglycerides aligned; conducting the esterification in the polar solvent allows to obtain a greater yield of monoglycerides (table 1).

Table 1 – Influence of solvent on composition of products of esterification (mol.%) in the equilibrium state (for 8 hours)

Solvent	MAG	DAG
2-Methyl-2-propanol	70,2±4,2	16,7±1,2
Hexane	44,3±2,5	48,7±2,7
Without solvent	40,9±2,4	45,8±2,6

In the process of glycerolysis in the system without solvent at a ratio of glycerol:acyl groups of 1.3:1 to 8 h was transformed to 97 mol.% triglycerides; monoglycerides accumulated in the amount of 68.7 mol.%? diglycerides amount of 26.1 mol.%. Fatty acids appear in the reaction mixture ranging from 4 h in equilibrium, their number was within 2%. Conducting glycerolysis in the environment with the solvent (2-methyl-2-propanol) at a concentration of glycerol of 10% showed that the process of conversion of triglycerides is occur much slower, which, in all probability, due to the influence of the solvent on enzyme activity. The equilibrium state was distinguished by the composition of the products from the system solvent: more formed monoglycerides – to 85.8 mol.% and, respectively, less diglycerides of 7.2 mol.%. Thus, this enzyme preparation allows to make an effective conversion of glycerides at low energy consumption and limited duration.

References:
1. O'Brien, R. Fats and oils. Production, composition and properties, application. – SPb.: Profession, 2007. 752 p.
2. Mazalova, L. M. Trends in the field of production of specialized fat // Konditer. Industry. – 2011. – No. 3. – P. 16-17.
3. Shelamova S. A. Scientific and practical aspects of the technology modification of vegetative oils fat products with functional properties: Autoabstract. dis. doctor. tech. sciences. – Moscow, 2012. – 51 p.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПАЛЬМОВОГО МАСЛА ПРИ ФАЛЬСИФИКАЦИИ МОЛОЧНОГО ЖИРА

EL-Hadad S.S; Abd El-Aziz M and Sayed A.F.

Национальный исследовательский центр, отдел молочной промышленности, Докки, Каир, Египет.
E-mail: samehsobhygalal@yahoo.com

Проведено исследование композиций молочного жира с пальмовым маслом различными методами и показано эффективное использование для фальсификации определения стеринов и токоферолов.

Ключевые слова: молочный жир, пальмовое масло, сливочное масло, константы жира, профили жирных кислот, стеринов, токоферолов .

Готовили композиции сливочного масла (СМ) и пальмового масла (ПМ). Для этого расплавленное сливочное и пальмовое масло смешивали в следующем соотношении: 10:0; 8:2; 6:4; 4:6; 2:8; и 0:10. В эксперименте использовали первую и последнюю композиции в виде натурального сливочного масла и на-

турального пальмового масла, соответственно. И четыре бинарных композиции в разном соотношении СМ и ПМ. В композициях определяли константы жира: число омыления (ЗО), число Reichert-Meissl (RM) и число Polenske (ЗР), йодное число (ЙО), а также количество жирных кислот с короткой цепью (КЦЖК), со средней (МЦЖК), насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты и фракции стеринов и токоферолов. Добавление ПМ к СМ приводило к изменению констант жира пропорционально количеству ПМ. С увеличением дозы ПМ увеличивалось количество ненасыщенных жирных кислот, бета-ситостерола и токоферолов. При содержании ПМ ниже 40% недостаточно для определения фальсификации молочного жира пальмовым маслом определения констант жира, а именно: ЗО, RM, ЗР, ЙО. При добавлении 20% ПМ к молочному жиру выявляется изменение содержания линолевой кислоты, при этом содержание миристиновой жирной кислоты, которая наиболее распространена в МЦЖК, остается в пределах нормы, характерной для молочного жира. Добавление 5% ПМ к СМ показало начальное изменение в содержании холестерина, бета-ситостерола и токоферолов, особенно γ-фракции.

Таким образом, показано, что наиболее эффективным способом определения пальмового масла в составе молочного жира (фальсификацию сливочного масла пальмовым маслом) можно осуществить не с помощью определения констант жира, а по содержанию стеринов и/или фракций токоферолов.

STUDY OF PALM OIL IN FALSIFICATIONS BUTTER FAT

S.S. El-Hadad; M. Abd El-Aziz and A.F. Sayed

Dairy Dept., National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt.
E-mail: samehsobhygalal@yahoo.com

A study milk fat composition with palm oil and various methods shown effective use to falsify determination of sterols and tocopherol.
Key words: Milk fat, palm oil, butter, fat constants fatty acid profiles, sterols, tocopherols.

Butter oil (BO) composition was prepared and palm oil (PO). For this melted butter oil and palm oil were mixed in the following ratio: 10: 0; 8: 2; 6: 4; 4: 6; 2: 8; and 0:10. In the experiment, the first and last compositions as natural butter oil and natural palm oil, respectively. And the four binary composition in different proportions of BO and PO. The compositions were determined fat constants: saponification number (SN) number Reichert-Meissl (RM) and the number Polenske (PV), Iodine value (IV), and the amount of fatty acids with short chain (SCFA), with an average (MSFA) saturated and unsaturated fatty acids and sterols and tocopherols fraction. Adding PO to BO led to a change in proportion of fat PO constants. With increasing doses of PO increased amount of unsaturated fatty acids, β-sitosterol and tocopherols. When the content is below 40% of PO is insufficient to determine the falsification of milk fat palm oil fat determining constants, namely SN, RM, PV, IV. By adding 20% to the milk fat PM detected change in the content of linoleic acid, with myristic fatty acid content, which the most abundant MCFAs it remains within the normal range, characteristic of milk fat. Addition of 5% PO to the BO showed an initial change in the content of cholesterol, β-sitosterol and tocopherol, especially γ-fraction.

Thus, it is shown that the most effective way to determine the composition of palm oil in milk fat (butter oil falsification palm oil) may be carried out not by determining constants fat, and the content of sterol and / or tocopherols fractions.

УДК 664.681.15

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПРОДУКТОВ ПЧЕЛОВОДСТВА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ КОНДИТЕРСКИХ ИЗДЕЛИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ

Черненкова А.А., Леонова С.А.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет», 450001 Россия, Республика Башкортостан, г.Уфа, ул. 50-летия Октября,34, e-mail: timasheva-1991@mail.ru
Изучен химический состав продуктов пчеловодства – пыльцы-обножки, перги, меда полученных от популяции башкирской пчелы для разработки рецептур мучных кондитерских изделий функционального назначения.

Ключевые слова: продукты пчеловодства, химический состав, мучные кондитерские изделия, функциональное назначение.

В настоящее время многие производители пищевой продукции ориентированы на выпуск функциональных продуктов питания. Мотивацией производителей в этом случае являются новые тенденции развития рынка продуктов здорового питания. В последние годы, по мере роста информированности потребителей о полезных свойствах различных пищевых ингредиентов и развития интереса к здоровому питанию, к категории функциональных стали присоединять даже те виды продукции, потребление которых должно быть ограничено, например, в силу их высокой калорийности или содержания жира и сахара. Тем не менее такие продукты, в том числе мучные кондитерские изделия, продолжают занимать важное место в рационе всех категорий населения. Одним из способов уменьшить или исключить негативные последствия потребления подобных продуктов становится их модификация путем снижения содержания жира и сахара, а также обогащения дефицитными микронутриентами. В связи с вышеизложенным, целью исследования является изучение химического состава продуктов пчеловодства для разработки рецептур мучных кондитерских изделий функционального назначения [1]. Новизна работы заключается в определении содержания водо- и жирорастворимых витаминов, заменимых и незаменимых аминокислот и минеральных веществ, что позволят использовать изученное сырье в рецептурах мучных кондитерских изделий.

Объектами исследования выступают пыльца-обножка, перга и мед, полученные от популяции башкирской пчелы, а также мучные кондитерские изделия. Проанализировали указанные объекты на содержание жиро- и водорастворимых витаминов и аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе LC-20AD Prominence производства фирмы Shimadzu. Количество минеральных веществ определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Shimadzu AA-6300 с электотермическим атомизатором GFA EX-7 [2].

В пыльце-обножке преобладали витамины Е - 0,9 мг/100 г; РР - 7,87 мг/100 г; С - 2,57, мг/100 г. Отмечена также достаточно высокая концентрация витаминов группы D. Установлено, что в пыльце-обножке содержится железо в количестве 83,5 мг/ кг., марганец – 14,0 мг / кг., медь – 20,0 мг/кг и цинк – 67,0 мг/кг. Выявлено, что в пыльце-обножке содержится 11 аминокислот, 5 из которых являются незаменимыми для человеческого организма. В значительных количествах обнаружены: аспаргиновая кислота, глутаминовая кислота, тирозин, изолейцин, фенилаланин, триптофан и лизин.

Установлено, что в перге содержатся водорастворимые витамины, мг/100 г.: С - 2,90; РР - 11,75; В5 - 2,20; В6 - 0,66, а также жирорастворимые витамины мг/100 г.: D2 - 3,20; D3 - 0,10; Е - 6,40.; минеральные вещества, мг/кг.: Fe - 90,2; Cu - 12,0; Co - 0,2; Zn - 55,0. Обнаружены такие аминокислоты, как аспаргиновая кислота, глутаминовая кислота, тирозин, изолейцин, фенилаланин, триптофан и лизин.

Далее был изучен химический состав меда. В исследуемом меде были обнаружены в значительном количестве водо- и жирорастворимые витамины, мг/100 г.: С - 2,23; РР - 5,71; В3 - 2,15; В6 - 1,05 и жирорастворимые витамины, мг/100 г.: А - 0,4; D2 - 0,2; D3 - 0,1; Е - 0,7, а также минеральные вещества, мг/кг.: Fe - 1,50; Co - 0,10; Zn - 2,05. Преобладали такие аминокислоты, как аспаргиновая кислота, глутаминовая кислота, аланин, тирозин, также в значительном количестве незаменимых аминокислот валин, триптофан, лизин [3].

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод, что продукты пчеловодства, полученные от пчел башкирской породы, являются ценным сырьем, которое целесообразно использовать при разработке рецептур мучных кондитерских изделий функциональной направленности.

Литература.

1. Черненкова А.А., Леонова С.А., Пусенкова Л.И Улучшение качества и биологической ценности сахарного печенья путем добавления пыльцы-обножки // Техника и технология пищевых производств. - 2015. - № 3. - С. 70-75.

2. Черненкова А.А., Черненков Е.Н. Возможность повышения биологической ценности сахарного печенья путем добавления в рецептуру пыльцы-обножки и меда // В сборнике: Химия в сельском хозяйстве материалы Всероссийской научно-практической конференции для студентов и аспирантов. - 2014. - С. 291-295.

3. Черненкова А.А., Леонова С.А. Исследование влияния продуктов пчеловодства и овсяного талкана на срок хранения сахарного печенья // В сборнике: Инновационные подходы и технологии для повышения эффективности производств в условиях глобальной конкуренции Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти член-корресподента КазАСХН, д.т.н., профессора Тулеуова Елемеса Тулеуовича. - 2016. - С. 560-563.

UDC 664.681.15

STUDY OF CHEMICAL COMPOSITION OF BEE PRODUCTS FOR DEVELOPING CONFECTIONERY PRODUCTS FUNCTIONAL ORIENTATION

Chernenkova A.A., Leonova S.A.

Bashkir State Agrarian University, 450001 Russia, Ufa, 50 years of October street, 34
e-mail: timasheva-1991@mail.ru

The chemical composition of bee products - pollen, bee bread, honey produced by the bees of the Bashkir population was investigated to work out recipes of flour confectionery products of a functional purpose.

Key words: beekeeping products, chemical composition, flour confectionery, functional purpose.

Nowadays many producers of food products are oriented onto release of functional food, being motivated by new marketing tendencies. In recent years, as consumer knowledge about useful properties of various food ingredients and interest in healthy food have been risen, the products which consumption is usually limited of their high caloric content or fat and sugar have been begun to be categorized as functional.

However, such products, including pastries, continue to occupy an important place in the diet of all population groups. One way to reduce or eliminate the negative effects of consumption of these products is their modification by reducing the amount of fat and sugar, as well as the enrichment of scarce micronutrients.

In view of the above, the purpose of this study is to investigate the chemical composition of bee products in order to work out the recipes of flour confectionery products of a functional purpose [1]. The novelty of the work is to determine the content of water-soluble and fat-soluble vitamins, essential and nonessential amino acids and minerals which would allow the usage of bee products in elaboration of pastry.

The objects of study are the pollen, bee-bread and honey produced by the bees of the Bashkir population, as well as pastries. We have been analyzed the content of fat- and water-soluble vitamins and amino acids in these objects by high-effective liquid chromatography, using for these purposes LC-20AD Prominence (Shimadzu). The amount of minerals was determined using the atomic absorption spectrophotometer Shimadzu AA-6300 equipped by atomizer GFA EX-7 [2].

There have been dominated such vitamins in pollen as E - 0.9 mg / 100 g; PP - 7.87 mg / 100 g; C - 2.57 mg / 100 g. We also have been noted a high concentration of vitamins of group D. It have been established that the pollen contained iron in an amount of 83.5 mg / kg, magnesium -14.0 mg / kg, copper - 20.0 mg / kg, zinc - 67.0 mg / kg. It was revealed that in the pollen-pollen contains 11 amino acids, 5 of which are essential to the human body. The significant quantities of aspartic acid, glutamic acid, tyrosine, isoleucine, phenylalanine, tryptophan and lysine have been detected.

It has been found that water-soluble vitamins contained in bee-bread in next amounts (mg / 100 g): C - 2,90; PP - 11,75; B5 - 2,20; B6 - 0,66, as well as fat-soluble vitamins mg / 100 g .: D2 - 3,20; D3 - 0,10; E - 6,40 ; minerals (mg / kg): Fe - 90,2; Cu - 12,0; Co - 0,2; Zn - 55,0. We also detected such amino acids as aspartic acid, glutamic acid, tyrosine, isoleucine, phenylalanine, tryptophan and lysine.

Further, the chemical composition of honey has been studied. This investigation The honey investigated revealed a significant amount of water- soluble and fat-soluble vitamins (mg / 100 g): C - 2,23; PP - 5,71; B3 - 2,15; B6 - 1,05;: A - 0,4; D2 - 0,2; D3 - 0,1; E - 0,7, and minerals mg / kg .: Fe - 1,50; Co - 0,10; Zn - 2,05. Aspartic acid, glutamic acid, alanine, tyrosine, also essential amino acids valine, tryptophan, lysine have been dominated among amino acids [3].

Summarizing the results, we can conclude that beekeeping products derived from the Bashkir breed of bees, is a valuable raw material that should be used for elaboration of recipes of flour confectionery with functional orientation.

References:
1. Chernenkova AA, Leonov SA, Pousenkova LI. Improving the quality and biological value of sugar cookies by adding pollen-pollen // Engineering and technology of food production. - 2015. - № 3. - S. 70-75.
2. Chernenkova AA., Chernenkov EN. The ability to increase the bioavailability of sugar cookie recipe by adding pollen, pollen and honey // In: Chemicals in Agriculture Materials All-Russia scientific-practical conference for undergraduate and graduate students. - 2014. - P. 291-295.
3. Chernenkova AA, Leonova SA. Investigation of the effect of bee products and oat talkan the shelf life of sugar cookies // In: Innovative approaches and technologies to improve the efficiency of production in the conditions of global competition, the International scientific-practical conference dedicated to the memory member korrespondent KazASKHN, Ph.D., professor Tuleuova Yelemesov Tuleuovich. - 2016. - P. 560-563.

УДК 573.6.086.83.001.5

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ БИОИНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Жилинская Н.Т., Базарнова Ю.Г., Политаева Н.А.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Высшая школа биотехнологии и пищевых технологий, Санкт-Петербург, Россия, 194021, Санкт-Петербург, Новороссийская ул., д.50.
e-mail: jilinskie@mail.ru

Показана перспективность применения методов компьютерной цитоморфометрии и биоинформатики для исследования морфофункционального состояния различных микроорганизмов: коллекционных и производственных штаммов дрожжей и бактерий – продуцентов целевых биотехнологических продуктов; фитопатогенных грибов рода Fusarium.

Ключевые слова: биоинформатика, компьютерная цитоморфометрия, микроорганизмы – продуценты биотехнологических продуктов, грибы рода Fusarium.

При исследовании микроорганизмов актуальным является поиск новых информативных методов определения морфофункционального состояния клеток. Объекты исследований: 1. Чистые культуры непатогенных штаммов микроорганизмов – продуцентов биотехнологических пищевых продуктов: дрожжей (Saccharomyces cerevisiae, Mycoderma vini, Rhodotorula gracilis), бактерий (Escherichia coli, Baccilus subtilis, Micrococcus sulfaticus, Pseudomonas fluorescens).2. Сухие дрожжи штамма Sacharomyces cerevisiae DistilaMax® MW фирмы Lallemand Biofuels&Distilled Spirits, предназначенные для производства солодового виски, с применением комплексных подкормок DistilaVite VM и DistilaVite GN. 3. Микроскопические плесневые грибы рода Fusarium, вызывающие сухую картофельную гниль.

Морфологическое исследование клеток дрожжей, бактерий, плесневых грибов проводили с применением светооптического видеомикроскопа тип «Micros» (Австрия), модель MC 100 (XP). Морфометрические характеристики клеток (площадь, периметр, длина, ширина, количество), окрашенных 1% раствором метиленового синего, получали с применением программного обеспечения компьютерного анализатора изображений микроскопа «Micros», при увеличении в 1000 раз.

На основании данных компьютерного морфометрического анализа разработаны алгоритм и компьютерная программа для расчета значений биоинформационных характеристик клеток исследуемых микроорганизмов. Вычисляли следующие информационные характеристики клеток [1]:

H - информационная энтропия, характеризующая степень ее упорядоченности системы; Hmax – информационная емкость, характеризующая максимальное структурное разнообразие биосистемы; R- коэффициент избыточности, характеризующий способность системы противостоять воздействию внешних и внутренних факторов.

Для изученных штаммов чистых культур дрожжей значения R (%) составили: Saccharomyces cerevisiae - 82,02; Mycoderma vini – 68,84; Rhodotorula gracilis – 81,12. Для изученных штаммов чистых культур бактерий значения R (%) равнялись: Escherichia coli – 88,46; Baccilus subtilis – 65,94; Micrococcus sulfaticus – 49,29; Pseudomonas fluorescens – 38,83 [2].

Для исследованных клеток сухих дрожжей штамма Sacharomyces cerevisiae DistilaMax® MW, культивируемых на солодовом сусле с применением комплексных подкормок, значения R составили 97,6% - 97,8%. Без применения комплексных добавок значения R у дрожжевых клеток равнялись 96,9% [3].

Для исследованных клеток грибов рода Fusarium выявленные высокие значения коэффициента избыточности R (99,40% - 99,69%) доказывают максимальную степень адаптации клеток грибов рода Fusarium к условиям их биоценоза с растительными клетками в процессе микробной контаминации клубней картофеля [4].

Доказана возможность применения предложенного метода расчета биоинформационных характеристик клеток микроорганизмов при изучении их адаптационно-приспособительных реакций.

Литература.
1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. - М.: Медицина, 1990. - Стр. 139-149.
2. Жилинская Н.Т., Шлейкин А.Г., Хамидова Д.Н. Применение методов информационно-морфометрического анализа при исследовании микроорганизмов – продуцентов биотехнологических продуктов // VII международная научно-техническая конференция «Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке» (Санкт-Петербург, 17-20 ноября 2015 г.). Ч.II: Материалы конференции. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – С.272-276.

3. Зайцева М.Ю., Баракова Н.В., Жилинская Н.Т. Комплексная оценка влияния питательных добавок на физиологическое состояние дрожжевых клеток штамма Sacharomyces cerevisiae при сбраживании солодового сусла. - Неделя науки СПбПУ: материалы конференции с международным участием. Высшая школа биотехнологии и пищевых технологий - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2016. - С. 106 - 108.
4. Zhilinskaia N., Bazarnova J., Shleikin A., Peshuk L., Galenko O.Using of bioinformatics and computer morphometry in study of Fusarium spp. causing potato dry rot // Ukrainian Food Journal.- Vol.5.- Iss.3.-2016.- P.515-522. - http://ufj.ho.ua/

THE USING OF BIOINFORMATICS IN MICROBIOLOGICAL RESEARCH

Zhilinskaia N.T., Bazarnova J.G., Politaeva N.A.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Graduate School of Biotechnology and Food Science, St. Petersburg, Russia,
194021, St. Petersburg, Novorossiyskaya str. 50.
e-mail: jilinskie@mail.ru

It's shown the importance of bioinformatics and computer cytomorphometry methods in study of microorganism morphofunctional state: yeats, bacteria - biotechnological producers, phytopathogenic fungi of Fusarium.

Key words: bioinformatics, computer cytomorphometry, microorganisms – producers of biotech products, fungi of the genus Fusarium.

It's important to search for new informative methods for the determination of morphofunctional state of microorganism cells. The objects to study: 1. Yeats (Saccharomyces cerevisiae, Mycoderma vini, Rhodotorula gracilis), bacteria (Escherichia coli, Baccilus subtilis, Micrococcus sulfaticus, Pseudomonas fluorescens) - producers of biotech products. 2. Yeats Sacharomyces cerevisiae DistilaMax® MW firm Lallemand Biofuels&Distilled Spirits using for malt whisky production, with complex admixtures DistilaVite VM and DistilaVite GN. 3. Fusarium spp. causing potato dry rot.

Morphological research of microorganism fixed preparations was made on microscope «Micros» (Austria), model MS 100 (XP), under magnification x 400 or x 1000. Morphometric cell characteristics of microorganisms (square, perimeter, length, wide, number) were obtained by automatic image analyzer "Micros".

The following information characteristics of fungal cells have been calculated [1]:

H - information entropy characterizing the real structural diversity; Hmax - the storage capacity characterizing the maximum structural time-diversity of biological systems; R (%) - information redundancy coefficient that characterizing the true biosystem organization.

Previously we've obtained informative characteristics for yeast and bacteria cells – producers of biotechnological products [2]. The information redundancy coefficient R was calculated for each type of microorganism.

For different yeast the values of redundancy coefficient R (%) were: Saccharomyces cerevisiae - 82,02; Mycoderma vini – 68,84; Rhodotorula gracilis – 81,12. For different bacterial species the values of redundancy coefficient R (%) were: Escherichia coli – 88,46; Baccilus subtilis – 65,94; Micrococcus sulfaticus – 49,29; Pseudomonas fluorescens – 38,83.

The R values for yeats Sacharomyces cerevisiae DistilaMax® MW firm Lallemand Biofuels&Distilled Spirits using for malt whisky production, with complex admixtures DistilaVite VM and DistilaVite GN, was 97.6% - 97.8%. The R values for yeast cells without complex admixtures was 96,9% [3].

The redundancy coefficient R in Fusarium cells had high values (99,40% to 99,69%) thus demonstrated a high degree of orderliness and relative organization in microbial cells contaminating potato tubers [4].

The method of the bioinformatic modelling is demonstrated to help in study of adaptive reactions of microorganisms (yeat, bacteria, fungi) during their cultivation and storage, and can be recommended as a testing system in development of new plant protecting preparations.

References:
Avtandilov G. Meditsinskaya morfometriya. – Meditsina: Moscow, 1990. – PP. 139 – 140.
Zhilinskaia N., Shleikin A., Khamidova D. Primenenie metodov informatsionno-morfometricheskogo analiza pri issledovanii mikroorganizmov – produtsentov biotekhnologicheskikh produktov . -VII mezhdunarodnaya nauchno-tekhnicheskaya konferentsiya «Nizkotemperaturnye i pishchevye tekhnologii v XXI veke» (Sankt-Peterburg, 17-20 noyabrya 2015 goda). Ch.II: Materialy konferentsii, Universitet ITMO, SPb, 2015. - PP. 272-276.
Zaitseva M. Yu., Barakova N.V., Zhilinskaia N. T. A comprehensive assessment of the impact of nutritional supplementation

on the physiological state of yeast cells Sacharomyces cerevisiae during fermentation of malt whisky. - Science week SPbSPU: proceedings of conference with international participation. Graduate School of biotechnology and Food Science - SPb.: Publishing house of Polytechnical Institute. University press, 2016. - PP. 106 - 108.
Zhilinskaia N., Bazarnova J., Shleikin A., Peshuk L., Galenko O. Using of bioinformatics and computer morphometry in study of Fusarium spp. causing potato dry rot // Ukrainian Food Journal.- Vol.5.- Iss.3.-2016.- P.515-522. - http://ufj.ho.ua/

УДК 637.146.2 : 641.56

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТИРОВАННОГО ПРОДУКТА ДЛЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ПИТАНИЯ

Гаврилова Н. Б., Чернопольская Н. Л., Трофимов И.Е.

Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Омск, Россия
644008, Омск, ул. Институтская площадь, 1
e-mail: adm@omgau.org

Одной из категорий специализированного питания являются продукты для лиц, систематически занимающихся физической культурой, фитнесом, любительским и профессиональным спортом. Поэтому проведение исследований и разработка технологий отечественных продуктов специализированного питания с использованием натуральных продуктов животного и растительного происхождения в легкоусвояемой форме является актуальным. Учеными ФГБОУ ВО Омский ГАУ разработан ферментированный продукт для специализированного питания с повышенной пищевой ценностью.

Ключевые слова: ферментированный продукт, специализированное питание, пантогематоген, спортивное питание, пробиотическая микрофлора.

В настоящее время разработан целый ряд продуктов и рационов для питания отдельных групп населения: спортсменов, детей разного возраста, беременных и лактирующих женщин, различных профессиональных групп рабочих промышленных предприятий и др., которые объединены в одну категорию – специализированное питание.

Одной из категорий специализированного питания являются продукты для лиц, систематически занимающихся физической культурой, фитнесом, любительским и профессиональным спортом. Следует отметить, что специализированные продукты питания для спортсменов представлены на рынке очень широко, однако объем таких продуктов отечественного производства в продаже недостаточен.

Поэтому проведение исследований и разработка технологий отечественных продуктов специализированного питания с использованием натуральных продуктов животного и растительного происхождения в легкоусвояемой форме является актуальным.

Основная цель научной работы - исследование и разработка технологии ферментированного продукта для специализированного питания с повышенной пищевой ценностью.

Продукты для специализированного и, прежде всего, спортивного питания, как правило, дополнительно содержат вещества, стимулирующие белковый, углеводный, энергетический обмен, а также являются адаптогенами, способствующими восстановлению организма спортсменов после усиленных нагрузок во время тренировок и соревнований. Для данного продукта в качестве такого вещества выбран «Пантогематоген Северный», а также витаминно-минеральный премикс, дополняющий качественный и количественный состав витаминов (прежде всего Е, С, группы В) и минеральных веществ (натрий, калий, фосфор, кальций), которые содержатся в молочной основе и других компонентах рецептуры, таких как изолят сывороточного белка, мёд натуральный.

При определении рационального количества исследуемого ингредиента наиболее значимо было определить степень его влияния на динамику развития пробиотической микрофлоры во время процесса ферментации и органолептические показатели ферментированного (кисломолочного) продукта. После определения количественной дозы ингредиента установили химический состав кисломолочного продукта. Пантогематоген предварительно диспергировали при перемешивании с небольшим количество обезжиренного молока, затем смешивали с молочной основой, ИСБ, мёдом и мальтодекстрином при температуре 45-50 °С, смесь гомогенизировали, пастеризовали и охлаждали до температуры инокулирования заквасочных культур и ферментировали. Шаг внесения доз пантогематогена в смесь компонентов 2 % – опыт 1 (1 %), опыт 2 (3 %), опыт 3 (5 %), опыт 4 (7 %).

На основании комплексного исследования микробиологических, химических, органолептических показателей принята его рациональная доза 3,0 мас.% от компонентов рецептуры. Эффективность использования витаминного и минерального премиксов для обогащения ферментированного продукта определялась на основе МР 2.3.1.2432-08, данных «Центра Здорового питания» и интегральной оценки сбалансированности продуктов питания.

В готовом ферментированном продукте определены пищевая, биологическая и энергетическая ценность, степень удовлетворения среднесуточой потребности спортсмена в основных макро- и микронуриентах при употреблении ферментированного продукта.

Для частичного удовлетворения суточной потребности спортсмена в витаминах и минеральных веществах рекомендуется употреблять ферментированный продукт в объеме не менее 250 г в сутки.

Энергетическая ценность ферментированного продукта составляет118,7 ккал/494,9 кДж.

На основе исследования хранимоспособности и безопасности ферментированного продукта установлен срок его годности – 7 суток при температуре хранения (4±2) °С.

Достоинством специализированных продуктов питания для спортсменов является их высокая пищевая плотность, гомогенность, разнообразие форм (жидкие, сухие – гейнеры) для их хранения, транспортировки и быстрого применения. Для продления срока годности нового вида ферментированного продукта с пробиотической микрофлорой исследованы способы сушки: распылительной и сублимационной.

В результате высушивания распылительным способом получен мелкодисперсный порошок кремового цвета с массовой долей влаги (4,5±0,5) мас.%, сублимационным – сухой продукт в виде тонких плёнок различного размера, светло - кремового цвета с массовой долей влаги (5,5±0,5) мас.%, которые для употребления растворяли в воде при температуре (45±5) °С, при перемешивании в течение 5-10 мин.

UDC 637.146.2 : 641.56

DEVELOPMENT OF FERMENTED FOODS TECHNOLOGY FOR SPECIALIZED NUTRITION

Gavrilova N.B., Chernopolskaya N.L., Trofimov I.E.,

Omsk State Agricultural University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia
644008, Omsk, Institutskaya Square St., 1
e-mail: adm@omgau.org

One of the categories of specialized food products is for people who are involved in regular sport activities like physical training, fitness, amateur and professional sports.
Therefore, the research and development of technologies for production of specialized food products in Russia, using natural animal and herb products in digestible form, are of current interest. Scientists Omsk State Agricultural University it is developed fermented product for specialized nutrition with enhanced nutrition value.

Key words: fermented product, specialized food, pantogematogen, sports food, probiotic microflora

At the present time there is a variety of food products and diets for nutrition of specific groups: athletes, children of different ages, pregnant and lactating women, and various professional groups like workers of industrial enterprises, etc. They refer to specialized nutrition.

One of the categories of specialized food products is for people who are involved in regular sport activities like physical training, fitness, amateur and professional sports. It should be noted that specialized food products for athletes are available in the market in sufficient amount. Howerever, the amount of Russian-made products of this kind is insufficient.

Therefore, the research and development of technologies for production of specialized food products in Russia, using natural animal and herb products in digestible form, are of current interest.

The main object of the research work is to develop a technology for the production of fermented product for specialized nutrition with enhanced nutrition value.

The food products for specialized sport nutrition normally contain substances stimulating protein, carbohydrate, energy metabolism, and they are adaptogens that increase body's resistance to stresses and body's recovery capability after intense trainings and competitions. The «Pantogematogen Severny» product is of such kind, as well as a vitamin-and-mineral premix, supplementing qualitative and quantitative composition of vitamins (especially of E, C, B group) and minerals (natrium, potassium, phosphorus, calcium) contained in the milk base and other

ingredients, such as whey protein isolate and natural honey.

In order to determine the reasonable amount of the ingredient, it is necessary to estimate the extent of its influence on the dynamics of probiotic microflora development during the fermentation process and organoleptic indicators of the fermented product. After determining the amount of the ingredient, we worked out the chemical composition of the fermented milk product. The Pantogematogen was preliminarily dispergated while being stirred with a small amount of skimmed milk, then mixed with a milk base, honey and maltodextrin at 45-50° C, the mixture was homogenized, pasteurized and cooled to a temperature of starter culture inoculation and, then, fermented. The stage of introducing the dose of pantogematogen in the 2% mixture of components - Experiment 1 (1%) Experiment 2 (3%), Experiment 3 (5%), Experiment 4 (7%).

After comprehensive study of microbiological, chemical, sensory indicators, the balanced dose of 3.0 % of the composion was taken. The effectiveness of the use of vitamin-and-mineral premixes for the enrichment of fermented milk products is determined on the basis of MR 2.3.1.2432-08, data of the Center for Healthy Nutrition and integrated assessment of food balance.

The nutrition, biological and energy value, the sufficient-for-athlete daily intake of the basic macro- and micronutrients in the fermented milk products are defined in the finished product.

An athlete should drink not less than 250 grams of the fermented product per day in order to partially satisfy the daily needs in the vitamines and minerals.

The energy value of the fermented milk product is 118,7 kcal / 494.9 kJ.

The expiry date of the product is 7 days at a storage temperature (4 ± 2) ° C due to the storage stability and safety of a fermented milk product.

The advantages of specialized foods for athletes are their high nutritional density, homogeneity, a variety of forms (liquids, gainers) convenient for their storage, transportation and quick intake. We studied drying methods: spray-type and freeze-drying in order to prolong the shelf life of a new type fermented products with probiotic microflora.

As a result, with the spray-type drying method, we produced finely-dispersed powder of cream color with a mass fraction of moisture (4,5 ± 0,5) % by weight; and with freeze-drying method, we produced a dry product in the form of thin films of different size, of light-cream color with a mass fraction of moisture (5 5 ± 0,5) % by weight, which was dissolved in water at a temperature of (45 ± 5) ° C, while stirring for 5-10 min, for further intake.

УДК 637.514.92

ИСПОЛЬЗОВАНИЕПРОМЫСЛОВЫХ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ В ТЕХНОЛОГИЯХ ПИЩЕВЫХ ЭМУЛЬСИОННЫХ СИСТЕМ

Т.А. Косенко, Т.К. Каленик

ФГАОУ ВО «Дальневосточный Федеральный Университет» Школа биомедицины, Россия, г. Владивосток о. Русский, поселок Аякс - 10, кампус ДВФУ, корп. М25.
e-mail:kosenko.ta@dvfu.ru

Проведена ферментативная трансформация мышечной ткани кукумарии. Ферментативный гидролизат вносили в эмульсионную систему на основе куриной печени лечебно-профилактического назначения для повышения биологической ценности продукта. Содержание белка в полученном продукте составило 22,46 г.

Ключевые слова: нутриенты, биологическая ценность, ферментативный гидролиз, кукумария, белок, паштет.

Принятая в России государственная политика в области здорового питания до 2020 г. направлена на сохранение и укрепление здоровья различных групп населения. Поэтому существует необходимость создания комплексных обогатителей пищи, обладающих повышенной биологической ценностью, функциональными и лечебно-профилактическими свойствами [1].

В качестве объектов исследования были отобраны: Cucumaria japonica (октябрь 2015 г., ТУ 15-01 278), ферментативный гидролизат Cucumaria japonica (фермент - трипсин, активность 1:3500). В процессе изучения полученного продукта пользовались стандартными методиками исследования.

В результате ферментативного гидролиза увеличилось содержание незаменимых аминокислот: лейцин и треонин. Паштет из куриной печени с добавлением кукумарии удовлетворяет потребность человека в белке на 17,64 … 31,76 % для мужчин, на 23,73…35,60 % для женщин. Ферментативный гидролиз повысил биологическую ценность белковой эиульсионной системы. Содержание белка в паштете с добавлением ферментативного гидролизата мышечной ткани кукумарии составило 22,46 г/100 г.

Литература.
1. *Распоряжение Правительства РФ от 25.10.2010 N 1873-р. «Об основах государственной политики Российской Федерации в области здорового питания населения на период до 2020 года» // «Российская газета». N 249. 03.11.2010.*

UDC 637.514.92

MARINE APPLICATIONS TO CREATE HYDROBIONTS EMULSION SYSTEMS

T.A. Kosenko, T.K. Kalenik

FGAOU VO Far Eastern Federal University, School of Biomedicine, Russia, Vladivostok on. Russian, Ajax village - 10 campus FEFU, Bldg. M25.
e-mail:kosenko.ta@dvfu.ru

Spend the enzymatic transformation of sea cucumber muscle tissue. Enzymatic hydrolyzate introduced into the emulsion system based on chicken liver therapeutic and prophylactic purposes to improve the biological value of the product. The protein content of the product obtained was 22.46 g.

Key words: nutrients, biological value, enzymatic hydrolysis, sea cucumber, egg, pâté.

Adopted in Russian state policy in the field of healthy eating through 2020 is aimed at preserving and improving the health of different population groups. There is therefore a need to establish a comprehensive dresser food with increased biological value, functional and curative properties [1].

The objects of study were selected: Cucumaria japonica (October 2015, TU 15-01 278), enzymatic hydrolyzate Cucumaria japonica (enzyme - trypsin activity 1: 3500). In the process of studying the resulting product used standard methods of the study.

The enzymatic hydrolysis increased content of essential amino acids threonine and leucine. Chicken liver pate with the addition of sea cucumber satisfies the human need for protein to 17.64 ... 31.76% for men, at 23.73 ... 35.60% for women. Enzymatic hydrolysis increased biological value protein eiulsionnoy system. The protein content of the enzymatic addition pate with sea cucumber hydrolyzate muscle tissue was 22.46 g / 100 g.

References.
1. *Rasporyazhenie Pravitel'stva RF ot 25.10.2010 N. 1873-r. «Ob osnovah gosudarstvennoj politiki Rossijskoj Federacii v oblasti zdorovogo pitaniya naseleniya na period do 2020 goda» // «Rossijskaya gazeta». N. 249. 03.11.2010.*

СЕКЦИЯ

РОБОТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

SECTION

ROBOTIC TECHNOLOGY

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

УДК 616.77+616.78

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ РОБОТИЗИРОВАННЫХ МЕДИЦИНСКИХ СИСТЕМ В АКАДЕМИЧЕСКОМ СЕКТОРЕ НАУКИ

Мугин О.О., Сорокина А.Ю., Шарапов И.Б.

Федеральное агентство научных организаций, г. Москва, Россия
119334, г. Москва, Ленинский проспект, д. 32а
mugin@fano.gov.ru

Стремительное развитие робототехники в мире открывает новые возможности во многих областях, в том числе и в медицине. В докладе представлен краткий исторический обзор, а также анализ современных тенденций развития медицинских роботов как нового направления в медицинском приборостроении. Показаны последние и наиболее интересные разработки медицинских роботизированных систем в России и мире. Приведена уточненная классификация медицинских роботов и сделан прогноз развития медицинской робототехники в нашей стране на ближайшие годы.

Ключевые слова: робот, медицинский роботизированный комплекс, фундаментальные исследования.

В 60-е годы в СССР в Институте машиноведения им А.А. Благонравова РАН в лаборатории «Теории управления машинами» велась обширная научная работа в области робототехнических систем, в результате которой был создан протез предплечья с биоэлектрическим управлением – первая в мире разработка роботизированной системы для нужд медицины. Впоследствии исследования в области роботизированных систем в нашей стране были ограничены применением в области точного машиностроения.

В настоящее время в Российской Федерации используются роботизированные медицинские системы иностранного производства типа «Da Vinchi» и его аналоги. Российских разработок аналогичного уровня не создано. Однако, во исполнение Указа Президента Российской Федерации от 16 декабря 2015 года № 623 «О Национальном центре развития технологий и базовых элементов робототехники», после внесения изменений в перечень приоритетных направлений развития науки, технологий и техники в Российской Федерации и в перечень критических технологий Российской Федерации ситуация стала меняться. Началась разработка вертебрального хирургического комплекса в ЦКБ РАН под руководством Макирова С.К., ортопедического хирургического комплекса в РГНКЦ под руководством Ондаара В.С., универсального роботохирургического комплекса в ИКТИ РАН под руководством Шептунова С.А., а также офтальмологического роботохирургического комплекса и роботохирургического комплекса для пластической хирургии.

Фундаментальные исследования в области роботизированных медицинских систем приведут к возрождению научной школы медицинского приборостроения. Применение роботизированных систем в хирургии и восстановительной медицине позволят снизить сроки восстановления после оперативного вмешательства, а также решить актуальную проблему импортозамещения.

UDC 616.77+616.78

RESEARCH EXPERIENCE IN ROBOTIC MEDICAL SYSTEMS IN ACADEMIC SECTOR OF SCIENCE

Mugin O.O., Sorokina A.Yu., Scharapov I.B.

mugin@fano.gov.ru
Fededal Agency of Scientific Organizations, Moscow, Russia
32A, Leninsky prospect, 119334, Moscow, 119334, Russian Federation

The rapid development of robotics in the World opens up new opportunities in many fields, including medicine. The report provides a brief historical overview and analysis of recent trends in the development of medical robots as a new direction in medical instrumentation. The latest and most interesting developments of medical robotic systems in Russia are provided. Refined classification of medical robots and forecast of medical robots development in our country in the coming years are provided.

Key words: robot, robotic medical complex, fundamental research.

In 60-ies in the USSR in the Mechanical Engineering Institute A.A. Blagonravov name RAS in the»Machine control theory» laboratory extensive research work in the field of robotic systems were conducted. As the result the forearm prosthesis with bioelectric control was created, as first robotic system in the world for the needs of medicine. Later studies in the field of robotic systems in our country have been limited to the use in the field of precision engineering.

Currently, robotic medical systems of foreign production «Da Vinchi» type and analogs are using in the Russian Federation. In Russia similar projects are not developed. However, in the Decree of the President of the Russian Federation of December 16, 2015 № 623 «About the National Center for the development of technology and the basic elements of robotics» and amendments to the list of priority directions of development of science, technology and engineering in the Russian Federation and the list of critical technologies of Russian Federation the situation is changing.

The development of vertebral surgical complex in CCH RAS under the leadership of Makirov S.K., orthopedic surgical complex under the leadership of Ondaar V.S. in RGSC, universal surgical complex ICTI RAS under the guidance of Sheptunov S.A., ophthalmic surgical complex and complex for plastic surgery is started.

Basic research in the field of medical robotic systems will revive the scientific school of medical equipment. The use of robotic systems in the field of regenerative medicine and robotic surgery will reduce recovery times after surgery in the human body, as well as solve the actual problem of import substitution.

УДК 616-089-06

ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА РОБОТ-АССИСТИРОВАННОЙ РАДИКАЛЬНОЙ ПРОСТАТЭКТОМИИ

Васильев А.О., Говоров А.В., Сухих С.О., Котенко Д.В., Пушкарь Д.Ю.

Кафедра урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» имени А.И. Евдокимова Минздрава РФ, г. Москва, Россия. Адрес: 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1,
e-mail: alexvasilyev@me.com

Течение робот-ассистированной радикальной простатэктомии (РАРП) может быть связано с риском развития осложнений, от которых зависит течение послеоперационного периода. Частота осложнений является универсальным показателем критической оценки безопасности, успешности и стоимости хирургического лечения, а также обучения медицинского персонала.

Ключевые слова: робот-ассистированная радикальная простатэктомия, послеоперационный период, осложнения

Оценка характера и частоты послеоперационных осложнений РАРП позволяет выявить факторы риска, способствующие их развитию. Разработка основных методов профилактики осложнений, а также оценка влияния осложнений на функциональные результаты после РАРП в значительной степени позволит улучшить результаты хирургического лечения больных раком предстательной железы.

В ретроспективное исследование было включено 512 пациентов, перенесшие РАРП. Медиана наблюдения составила 2,9 (1-6) года. Проведено телефонное анкетирование пациентов, оценены результаты амбулаторных обследований, использованы специальные валидизированные опросники. В ходе исследования было определено, что частота осложнений раннего послеоперационного периода РАРП составляет 29,5%, большая часть из которых (90,2%) соответствует осложнениям Clavien I и II степени. В позднем послеоперационном периоде частота стриктуры везикоуретрального анастомоза, диагностированная в первые 6 мес была диагностирована менее чем у 1% пациентов; вентральные грыжи были зарегистрированы в сроки от 3 мес до 3-х лет (троакарная - 0,6%, инцизионная – 4,6%, паховая – 5,4%). Установлено, что тазовая лимфаденэктомия увеличивает общую частоту осложнений РАРП в 2 раза. Несостоятельность везикоуретрального анастомоза и частота гемотрансфузий зависят от размеров предстательной железы. Выполнение реконструкции шейки мочевого пузыря увеличивает риск стриктуры везикоуретрального анастомоза в 1,5 раза в сравнении с техникой, избегающей данного пособия.

Результаты проведенного исследования показали, что на этапе планирования РАРП пациентам следует с осторожностью назначать неоадъювантную гормональную терапию, поскольку ее применение достоверно приводит к увеличивающую риска несостоятельности везикоуретрального анастомоза. При диссекции шейки мочевого пузыря необходимо избегать технических приемов, требующих в последующем её реконструкцию. Ушивание послеоперационных ран необходимо рассматривать как отдельный этап операции, позволяющий повысить индивидуальную ответственность ассистента за развитие инцизионной и троакарной грыж.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МК-5594.2016.7.

UDK 616-089-06

RISK FACTORS FOR POSTOPERATIVE COMPLICATIONS OF ROBOT-ASSISTED RADICAL PROSTATECTOMY

Vasilyev A.O., Govorov A.V., Sukhikh S.O., Kotenko D.V., Pushkar D.Yu.

Department of Urology Federal state budgetary institution of higher education (Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov) Address: 127473, Moscow, ul. Delegatskaya, 20-1, e-mail: alexvasilyev@me.com

Current robot-assisted radical prostatectomy (RARP) may be associated with risk of developing complications that affect the postoperative period. The complication rate is a universal indicator of the critical safety assessment, success and cost of surgical treatment, as well as the training of medical personnel.

Key words: robot-assisted radical prostatectomy, postoperative period, complications

Assessment of the nature and frequency of postoperative complications RARP allows to identify risk factors that contribute to their development. Development of the main methods of preventing complications, as well as the evaluation of complications influence on functional outcomes after RARP and would greatly improve the results of surgical treatment of patients with prostate cancer.

The retrospective study included 512 patients who underwent RARP. Median follow-up was 2.9 (1-6) years. A telephone survey of patients, evaluated the results of outpatient examinations, used specific validated questionnaire. The study determined that the frequency of complications of early postoperative period RARP is 29.5%, the majority of which (90.2%) corresponds to complications Clavien I and II degree. In the late postoperative period stricture rate vesicourethral anastomosis, diagnosed in the first 6 months was diagnosed less than 1% of patients; ventral hernias were registered in the period from 3 months to 3 years (trocar - 0.6%, incisional - 4.6%, inguinal - 5.4%). It has been established that pelvic lymphadenectomy increases the overall incidence of complications RARP 2 times. Failure vesicourethral anastomosis of blood transfusions and the frequency depends on the size of the prostate. Upgrade of the bladder neck stricture increases the risk of anastomotic vesicourethral 1.5 times in comparison with the technique, avoiding in this manual.

Results of the study showed that at the stage of planning RARP patients should be used with caution in neoadjuvant hormone therapy because its application leads to significantly increased the risk of failure vesicourethral

anastomosis. When dissection of the bladder neck to avoid techniques that require it in a subsequent reconstruction. Closure of surgical wounds should be seen as a separate phase of the operation, allowing to increase personal assistant responsible for the development of incisional and trocar hernias.

The study was supported by the Russian President's Grant (MK-5594.2016.7.)

УДК 616-089.844

РОБОТ – АССИСТИРОВАННАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ТАЗОВОГО ДНА: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД

Сухих С.О., Васильев А.О., Колонтарев К.Б., Пушкарь Д.Ю.

Кафедра урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» имени А.И. Евдокимова Минздрава РФ, г. Москва, Россия. Адрес: 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1, e-mail: alexvasilyev@me.com

Пролапс тазовых органов - распространенное патологическое состояние, заболеваемость которого увеличивается среди женщин пожилого возраста. Пациенткам с передним и апикальным пролапсом гениталий больших размеров, больным с рецидивирующим пролапсом тазовых органов или пролапсом культи влагалища рекомендуется выполнение робот-ассистированной сакрокольпопексии.

Ключевые слова: роботическая хирургия, сакрокольпопексия, пролапс тазовых органов

Робот-ассистированная сакрокольпопексия имеет ряд преимуществ: минимальная интраоперационная кровопотеря, незначительный послеоперационный болевой синдром, а также короткие сроки пребывания в стационаре.

В клинике урологии МГМСУ с 2010 по 2016 г.г. было прооперировано 28 больных с пролапсом гениталий (POP-Q 3-4). Техника выполнения робот-ассистируемой сакрокольпопексии была модифицирована, использовалась система da Vinci S / Si (Intuitive Surgical, Inc., Sunnyvale, CA). Были проанализированы основные интра- и послеоперационные результаты. Произведен анализ мировой литературы (в библиотеках PubMed, Scopus) и сравнение данных.

Продолжительность операции в среднем составила - 120 мин. (110-150 мин.). Кровопотеря – 50 мл (35-100 мл). Уретральный катетер с возможностью орошения слизистой мочеиспускательного канала был удален всем пациенткам на 2-е сутки. После контроля самостоятельного мочеиспускания и наличия остатка мочи, больную выписывали из клиники под наблюдением. Периоперационный период составил 4 суток.

После внедрения во врачебную практику роботических технологий, робот-ассистированная хирургия тазового дна заняла определенное место в лечении пролапса гениталий [1]. Выбор специалиста зависит от многих факторов: желания пациента, опыта хирурга и возможностей самой клиники. Однако, наши данные и другие исследования показали отличные результаты: снижение кровопотери, уменьшение сроков госпитализации, а также снижение общих затрат, по сравнению с открытой операцией [2, 3].

Работа выполнена при поддержке РНФ, соглашение № 16-15-00233

Литература.
1. Wu J.M., Hundley A.F., Fulton R.G., et al. / Forecasting the prevalence of pelvic floor disorders in U.S. Women: 2010 to 2050 // Obstet Gynecol. 2009. №114 (6). P.1278-83.
2. Siddiqui N.Y., Geller E.J., Visco A.G. / Symptomatic and anatomic 1-year outcomes after robotic and abdominal sacrocolpopexy // Am J Obstet Gynecol. 2012. №206(5). P.435.
3. Hoyte L., Rabbanifard R., Mezzich J., et al. / Cost analysis of open versus robotic- assisted sacrocolpopexy // Female Pelvic Med Reconstr Surg. 2012. №18(6). P.335-339.

UDK 616-089.844

ROBOT – ASSISTED RECONSTRUCTION PELVIC FLOOR: CURRENT VIEWS

Sukhikh S.O., Vasilyev A.O., Kolontarev K.B., Pushkar D.Yu.

Department of Urology Federal state budgetary institution of higher education (Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov) Address: 127473, Moscow, ul. Delegatskaya, 20-1, e-mail: docsukhikh@gmail.com

Pelvic organ prolapse - a common pathological condition, the incidence of which is increasing among older women. Patients with anterior and apical genital prolapse large, patients with recurrent pelvic organ prolapse or prolapse of the vagina stump recommended to perform robot-assisted sacrocolpopexy.

Key words: robotic surgery, sacrocolpopexy, pelvic organ prolapse

Currently, surgeons prefer to perform robot-assisted sakrokolpopexy, which has a number of significant advantages: minimal intraoperative blood loss, little postoperative pain, and shorter hospital stay.

In the clinic of urology MSMSU from 2010 to 2016, was operated on 28 patients with genital prolapse (POP-Q 3-4). The technique of robot-assisted sacrocolpopexy was modified, the system was used da Vinci S / Si (Intuitive Surgical, Inc., Sunnyvale, CA). Were analysed the main intra - and postoperative results. The analysis of world literature (libraries PubMed, Scopus) and data comparison.

Duration of surgery averaged - 120 min. (110-150 min). Blood loss is 50 ml (35-100 ml). Urethral catheter with urethral irrigation all the patients were removed on the 2nd postoperative day. After control of urination and urine residue patient was discharged from the clinic under observation. The time spent in the hospital - 4 days.

After the introduction into medical practice of robotic technology, robot-assisted surgery of the pelvic floor has taken a definite place in the treatment of genital prolapse [1]. The choice depends on many factors: the patient's wishes, the surgeon's skills and the capabilities of the clinic. However, our data and other studies have shown excellent results: reduced blood loss, reduced length of hospitalization and lower overall costs compared with open surgery [2, 3].

This study was supported by Russian Science Foundation (under Grant 16-15-00233)

References:
1. Wu J.M., Hundley A.F., Fulton R.G., et al. / Forecasting the prevalence of pelvic floor disorders in U.S. Women: 2010 to 2050 // Obstet Gynecol. 2009. №114 (6). P.1278-83.
2. Siddiqui N.Y., Geller E.J., Visco A.G. / Symptomatic and anatomic 1-year outcomes after robotic and abdominal sacrocolpopexy // Am J Obstet Gynecol. 2012. №206(5). P.435.
3. Hoyte L., Rabbanifard R., Mezzich J., et al. / Cost analysis of open versus robotic- assisted sacrocolpopexy // Female Pelvic Med Reconstr Surg. 2012. №18(6). P.335-339.

УДК 62-529.4

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МЕДРТК, ЭКСПЛУАТИРУЕМЫХ В УСЛОВИЯХ, ОПАСНЫХ ДЛЯ ЖИЗНИ И ЗДОРОВЬЯ МЕДИЦИНСКОГО ПЕРСОНАЛА И ПАЦИЕНТОВ

Ермолов И.Л.

Институт проблем механики им. А.Ю.Ишлинского Российской академии наук
119526 Россия, г. Москва, проспект Вернадского, д. 101, корп.1
e-mail: ermolov@ipmnet.ru

Статья рассматривает перспективы развития медицинских робототехнических комплексов (МедРТК), предназнченных для решения медицико-ориентированных функциональных задач в условиях, опасных для жизни и здоровья медицинского персонала и пациентов.

Ключевые слова: медицинский робот, робототехнический комплекс.

На повестке дня стоит вопрос создания роботов, основным предназначением которых будет выполнение различных медицинских функций в условиях, опасных для жизни и здоровья медицинского персонала и пациентов.

В работе рассмотрены ряд медицинских функций, которые необходимо роботизировать. По мнению автора, это решение следующих задач:

- МедРТК для взятия проб и поиска источников загрязнения грунтов, вод, атмосферы;
- МедРТК для сбора взятия проб крови у больных животных;
- МедРТК для поиска раненых, пострадавших и больных, их идентификации, диагностики состояния и маркировки, и оказания первичной медицинской помощи

- МедРТК для спасения утопающих на воде;
- МедРТК для обеспечения временной защиты раненых и пострадавших от неблагоприятных условий среды;
- МедРТК доставки медицинозначимых грузов;
- МедРТК для ухода за потенциально опасными больными;
- МедРТК для работы в медицинских учреждениях для приготовления специальных (опасных) препаратов и их введения пациентам;
- МедРТК для работы в медицинских учреждениях с потенциально опасным оборудованием.

В условиях ограничений наличествующих ресурсов необходимо чётко расставить приоритеты по созданию таких МедРТК. Приоритеты должны формироваться исходя из следующих критериев:

- Степень актуальности роботизации функционального предназначения;
- Предполагаемая тиражируемость;
- Наличие научного, технического и технологического задела;
- Перспективы использования техники зарубежных производителей.

Доклад содержит анализ, основанный на данных критериях, того, на создании каких МедРТК необходимо сконцентрироваться, в первую очередь.

UDC 62-529.4

FUTURE OF MEDICAL ROBOTS WORKING IN ENVIRONMENT DANGEROUS FOR PERSONNEL AND PATIENTS

Ivan L. Ermolov

Institute for Problems in Mechanics of Russian Academy of Sciences
119526 Russia, Moscow, Vernadskogo ave., 101-1
E-mail: ermolov@ipmnet.ru

This paper discusses future of medical robotic systems (MedRS) to function in environment dangerous for personnel and patients.

Key words: medical robot, robotic system.

Nowadays it is emerging to create robots which will perform various medical functions in environment dangerous for personnel and patients.

This paper studies some of the functions which need to be automated through using robots. Author considers that the most emerging among them are the following:

- medical robots for testing air, soil and waters with a consequent search of pollution sources;
- medical robots to take blood tests from sick animals;
- medical robots for search of injured men, their identification, diagnosis, designation and first aid renderering;
- medical robots for saving drowning man;
- medical robots for protecting of casualties from severe environment;
- robots for transportation of medical loads;
- robots from medical care of potentially dangerous patients;
- robots for preparing dangerous drugs and its incorporation to patients;
- robots working in medical premises with potentially dangerous equipment.

In situation of restricted resources it is important to establish priority of creating such systems. Priorities should be formulated according to following criteria:

- urgency of tasks automation;
- number of copies to be produces;
- existing expertise;

This presentation contains analisys basing on these criteria. It states milestones of creating such medical robots.

МЕДИЦИНСКАЯ РОБОТОТЕХНИКА И ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛИРОВАНИЯ ОБРАЩЕНИЯ

Смирнов А.Ю.

Ассоциация организаций оборонно-промышленного комплекса производителей медицинских изделий и оборудования, генеральный директор, +7-495-543-83-39, ashealth@bk.ru.
Адрес для переписки: 117312, г.Москва, ул.Ферсмана, 5к1-42.

Медицинская робототехника, достаточно сложная область для регулирования обращения.

С одной стороны - это медицинские изделия, которые имеют собственную, достаточно сложную систему регулирования обращения, направленную на реализацию положений Федерального закона от 21 ноября 2011 года 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Причем, существуют национальные правила, например, регистрация в них медицинских изделий описывается постановлением Правительства Российской Федерации от 27 декабря 2012 г. N 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий». Есть правила других национальных рынков, отличающиеся между собой. Понимание этих правил очень важно, если мы говорим о создании экспортноориентированных медицинских роботов.

Также есть международные системы. Например, разработанные в рамках договора ЕАЭС, и соответствующих соглашений о регулировании обращения лекарственных средств и медицинских изделий. Правила регулирования в соответствие данным соглашениям вступают в силу с 2017 года. Причем если сейчас будет действовать переходный период, когда производитель может выбирать между национальной системой или международной, то с 2021 года все обращение медицинских изделий, в том числе медицинской робототехники будет полностью регулироваться правилами ЕАЭС.

С другой стороны медицинские роботы - это робототехнические устройства, о регулировании обращения которых отдельным законом идет сейчас активное обсуждение. В любом случае, если будет создаваться такой закон, необходимо будет главу в нем посвятить отдельно медицинской робототехнике.

Если роботизированный протез относится к первому классу риска, то имплантируемые робототехнические устройства относятся к группе медицинских изделий третьего класса риска. Это сразу накладывает на них дополнительные требования – более тщательную процедуру клинических испытаний, а так же внесение в группу имплантируемых медицинских изделий, на которые распространяется требование постановления Правительства Российской Федерации от 30 декабря 2015 года №1517 «О государственном регулировании цен на медицинские изделия, включенные в перечень медицинских изделий, имплантируемых в организм человека при оказании медицинской помощи в рамках программы государственных гарантий бесплатного оказания гражданам медицинской помощи».

Более того, остается открытым вопрос, какими требованиями будут регулироваться такие робототехнические медицинские изделия, как нанороботы, переносящие в организме человека к биомишени лекарственные средства. Скорее всего, наряду с требованиями к ним как медицинским изделиям, как наноустройствам, входящим в соприкосновение с организмом человека, будут применяться и требования фармакопеи.

С точки зрения технического регулирования робототехнические изделия сегодня описываются рядом стандартов, таких как, ГОСТ Р ИСО 8373-2014 «Роботы и робототехнические устройства. Термины и определения», ГОСТ Р 60.2.2.1-2016 «Роботы и робототехнические устройства. Требования безопасности для роботов по персональному уходу», или, например , ГОСТ Р 60.0.0.1-2016 «Роботы и робототехнические устройства. Общие положения» утвержден приказом Росстандарта от 11 октября 2016 года, который вводится в действие на территории Российской Федерации с 1 января 2018 года.

Крупное робототехническое оборудование, как имеющее относительно мощные источники питания, попадает под критерии технического регулирования в рамках ЕАЭС. И если в области национальных требований медицинские изделия выведены из сферы технического регулирования, то для ЕАЭС эта проблема остается.

Таким образов, в ближайшем будущем необходимо будет провести значительную работу по согласованию уже имеющихся и созданию новых согласованных нормативных правовых актов, регулирующих обращение робототехнических устройств, являющихся медицинскими изделиями.

MEDICAL ROBOTICS AND FEATURES CONTROL TREATMENT.

Smirnov A.Yu.

Association of the defense-industrial complex manufacturers of medical devices and equipment, + 7-495-543- 83-39, ashealth@bk.ru, 117312, Moscow, st.Fersmana, 5k1-42.

Medical robotics, quite a complex area to regulate circulation.

On the one hand - it is medical products, which have their own, rather complex handling control system, aimed at implementing the provisions of the Federal Law of November 21, 2011 323-FZ «On the basis of public health protection in the Russian Federation.» Moreover, there are national regulations, for example, registration in these medical devices is described by the Russian Federation Government dated December 27, 2012 N 1416 «On approval of rules of state registration of medical products». There are rules to other national markets, differ from each other. Understanding these rules is very important, if we are talking about the creation of export-oriented medical robot.

There is also the international system. For example, developed under the EAEC Treaty and related agreements on the regulation of drugs and medical devices. Control rights under these agreements come into force in 2017. And if now will operate a transitional period, when the manufacturer can choose between a national or international system, that from 2021, all circulation of medical products, including medical robotics will be fully regulated by the rules of the EAEC.

On the other hand medical robots - a robotic device, to regulate the circulation of which is a separate law is now active discussion. In any case, if such a law is created, it will be necessary to devote a chapter in its separate medical robotics.

If a robotic prosthesis belongs to the first class of risk, the implantable robotic devices belong to a group of medical devices of the third risk grade. This immediately puts them additional requirements - a more thorough process of clinical trials, as well as the introduction of a group of implantable medical devices covered by the requirements of the Decree of the Government of the Russian Federation of December 30, 2015 №1517 «On state regulation of prices for medical products, included in the a list of medical devices implanted in the human body in health care as part of the free medical care program of state guarantees to citizens».

Moreover, the question remains, what the requirements will be governed by such robotic medical devices like nanorobots that carry the human body to the biological target drugs. Most likely, along with the requirements to them as medical devices, nanodevices like entering into contact with the human body, will be applied and the pharmacopoeia requirements.

In terms of technical regulation robotic products today describes a variety of standards such as GOST R ISO 8373-2014 «Robots and robotic devices. Terms and definitions «, GOST R 60.2.2.1-2016» Robots and robotic devices. Safety requirements for robots for personal care «, or, for example, GOST R 60.0.0.1-2016» Robots and robotic devices. General provisions «approved by Order Rosstandart of 11 October 2016, which entered into force in the territory of the Russian Federation with the January 1, 2018 of the year.

Heavy equipment for robotics as having a relatively high-power supply falls under the criteria of technical regulation within the EAEC. And if in the national requirements of medical products derived from the sphere of technical regulation, the EAEC for this problem remains.

Thus, in the near future it will be necessary to carry out considerable work on the harmonization of the existing and creation of new harmonized regulations, governing the treatment of robotic devices, which are medical devices.

УДК 616.1/.8-089

НАШ ОПЫТ СОЗДАНИЯ МЕДИЦИНСКИХ РОБОТОТЕХНИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Саврасов Г.В.[1], Батанов А.Ф.[2], Башлай А.П., Беликов Н.В.[1], Хайдукова И.В.[1]

[1] Московский Государственный Технический Университет имени Н.Э. Баумана,
[2] СКТБ ПР
Москва, Россия
savrasov2000@mail.ru

Анонс: Разработаны многофункциональный манипулятор и внутрисосудистые микророботы, прошедшие доклинические испытания. В настоящий момент проводится отработка методики исследования эргономических параметров проведения операций с целью создания и адаптации робототехнических систем под решение конкретных медицинских задач.

Ключевые слова: робот-манипулятор, мобильный робот, эргономика, внутрисосудистый микроробот.

Толчком к зарождению в МГТУ им. Н.Э. Баумана направления «Медицинская робототехника» послужили работы, проводимые в 80-е годы прошлого столетия, по разработке и внедрению технологий ультразвуковой хирургии, в том числе внутрисосудистой. Применение робототехники при реконструкции кровеносных сосудов позволит исключить технические ошибки эндовазального вмешательства и повысить точность и надежность процесса воздействия вне зависимости от квалификации хирурга.

При разработке медицинской робототехники в МГТУ им. Н.Э. применяются принципы системного подхода, позволяющие рассматривать робот как сложную биотехническую систему (БТС). В настоящее время работы по созданию медицинской робототехники ведутся по двум направлениям:

- мобильные микророботы, способные в автоматическом и полуавтоматическом режимах перемещаться по трубчатым органам, осуществляя диагностику и воздействие на патологические ткани;
- роботы-манипуляторы для выполнения широкого круга операций в различных областях медицины, включая сердечно-сосудистую хирургию.

Важным этапом в создании роботизированной системы является определение эргономических параметров со стороны пациента. Для этого была разработана методика по определению основных видов движений рук врача-хирурга и инструмента во время операции. Для записи траекторий использовался метод видеонаблюдения за движением объекта на фоне координатной сетки. В качестве характерных точек инструмента выбирались как специально нанесенные метки, так и какие–либо особенности его формы. По полученным траекториям движения инструмента были определены следующие параметры манипулятора: Зона обслуживания, Рабочая зона, Угол сервиса. Помимо геометрических характеристик, были оценены скоростные параметры манипулятора.

Для изучения траектории движения руки хирурга в ходе малоинвазивных внутрисосудистых операций, вследствие невозможности создать в операционной условия для контрастной съёмки исключительно рук врача-хирурга, необходима установка контрастных мишеней. В качестве объектов-мишеней использовались метки, сделанные на руках врача-хирурга спиртовым раствором бриллиантового зелёного, закреплённым сверху спиртовым йодным раствором.

В процессе операции, вследствие передвижения медицинского персонала, иногда происходило перекрытие обзора одной или обеих камер. В связи с этим для записи операции было использовано 4 камеры для того, чтобы в каждый момент времени по крайней мере 2 из них записывали вид операционного поля.

В ходе обработки полученных данных рабочая зона была ограничена положением пястья врача-хирурга. Для уточнения положения руки в данных зонах необходимо выделить направление кисти, путём дополнительного анализа траектории точки, расположенной на запястье.

В ходе работ было создано несколько моделей внутрисосудистых микророботов, движение которых основано на перистальтическом принципе и имеющих различные варианты конструктивного решения отдельных звеньев робота, включая опорные элементы. Они прошли этап доклинических испытаний на животных. Также были разработаны 5-ти и 6-ти степенные роботы-манипуляторы, предназначенные для сосудистой хирургии. За последние годы создан многофункциональный робот манипулятор, обладающий 7-ю степенями подвижности, который может быть использован для выполнения широкого круга оперативных вмешательств. Робот-манипулятор прошел этап государственных технических испытаний и доклинических испытаний на животных и готов к адаптации под решение конкретных медицинских задач.

OUR EXPERIENCE IN DEVELOPMENT OF MEDICAL ROBOTIC SYSTEMS.

Savrasov G.V.[1], Batanov A.F.[2], Bashlay A.P., Belikov N.V.[1], Khaydukova I.V.[1]

[1]Bauman Moscow State Technical University,
[2]Special Project Engineering Office of applied robotics Moscow, Russia savrasov2000@mail.ru

In BMSTU robot manipulator with 7 degrees of freedom and intravascular micro-robots were developed and passed preclinical studies. At the present moment, we are developing the method of investigation of ergonomic parameters of surgical operations with the aim of creating and adapting the robotic systems for specifical medical problems.

Key words: robotic manipulator, mobile robot, ergonomics, intravascular micro-robot.

The development and implementation of ultrasonic surgical techniques, including intravascular surgery, in the 80-ies of the last century has led to the start of a new direction in BMSTU - Medical Robotics. The use of robotics

in the vascular reconstruction allows to avoid technical errors during intravascular operations and improves the accuracy and reliability of the process, regardless of the skill of the surgeon.

The development of medical robotics in BMSTU implies the principles of the system approach, describing the robot as a complex biotechnical system (BTS). Currently, the two directions of development of medical robotics that are in progress are:

- Mobile micro-robots capable of navigating through the tubular bodies in automatic and semi-automatic modes, carrying out diagnosis and treatment of the pathological tissue;

- Robotic manipulators for a wide range of operations in various areas of medicine, including cardiovascular surgery.

An important step in creation of robotic systems is definition of ergonomic parameters from the patient. A method to identify the main types of movements of surgeon hands and instruments during surgery was proposed for this purpose. Visual recording was used for the movement of an object with a grid on the background. Detected parameters were labeled points and specific characteristics of its shape. Using the obtained toolpath the following parameters of the manipulator were determined: the service area, the working area, the service angle. In addition to the geometric characteristics speed parameters of the manipulator were evaluated.

To study the trajectory of the surgeon's hand movements during minimally invasive endovascular operations contrast targets were used due to the inability to perform contrast video recording of the surgeon hands only in the operating room. Target marks on the hands of the surgeon were made with alcoholic solution of Brilliant Green fixed atop with alcoholic solution of iodine.

Sometimes during operation, due to movement of medical personnel target marks overlap occurred on one or both cameras. In this regard, 4 cameras were used to film the operation to ensure that at least two of them record the surgical field without obstacles.

During the data processing working area was limited to metacarpals of the surgeon. To determine the position of the hand in these areas the next stage is detecting the position of the wrist, by additional analysis of the target mark on the wrist.

During the work several models of intravascular micro-robots that have different types of design solutions of individual units, including support elements which movement is based on the peristaltic principle were created. They passed the stage of pre-clinical animals tests. 5 and 6 stage-robot manipulators designed for vascular surgery have also been developed. In recent years, multifunctional robot manipulator with 7 degrees of freedom that can be used to perform a wide range of surgical interventions was also designed. Robot arm passed the stage of the state technical tests and pre-clinical animal tests. The robot is ready for adaptation and treatment of specific health problems.

УДК 621.01

РОБОТЫ ПАРАЛЛЕЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Хейло С.В.[1], Разумеев К.Э. [1], Гаврюшин С.С.[2], Гарин О.А. [2], Глазунов. В.А.[3], Шарапов И.Б. [4]

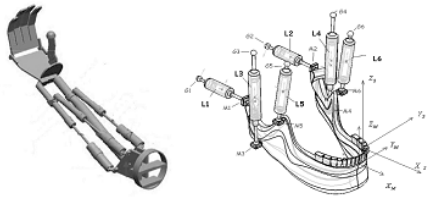
[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство), Москва, Россия
117997, г. Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр.1
e-mail: sheilo@yandex.ru
[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия
105005, Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5, стр. 1
e-mail: gss@bmstu.ru
[3]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт машиноведения им. А.А. Благонравова Российской академии наук
e-mail: vaglznv@mail.ru ;
[4]Федеральное агентство научных организаций, Москва, Россия
119334, г. Москва, Ленинский проспект, д. 32а
e-mail: sharapov@fano.gov.ru

Рассмотрены примеры использования роботов параллельной структуры в медицине и перспективы их использования.

Ключевые слова: механизм параллельной структуры, манипулятор, медицинский робот

Роботы параллельной структуры находят широкое применение в различных отраслях промышленно-

сти. Одной из областей применения таких роботов – биология и медицина [1]. Так с помощью механизмов параллельной структуры можно моделировать биологические конструктивные системы, в частности моделирование протеза руки (рис.1 а), работы челюстных мышц (рис.1 б) [2, 3].



а) б)

Рис.1 Модель биологических систем

а) протез руки, б) моделирование мышц челюсти

Известный робот Delta нашел применение для пространственных движений хирургического оборудования. На базе механизма Delta создан манипулятор, позволяющий работать в качестве аппарата искусственного дыхания с частотой 100 ударов в минуту и амплитудой 4-5 см (рис.2) [4]. В таком роботе реализована функция не перемещения, а силового и вибрационного действия.

Разрабатываются и исследуются роботы параллельной структуры, для применения в качестве манипулятора в составе аппарата для ультразвуковой диагностики артерий (рис.3).

Рис. 2. Механизм Delta в кардиологии

Рис.3. Робот для ультразвуковой диагностики

На базе Hexapod реализованы вспомогательное оборудование – кушетка для ориентации пациента при проведении рентгеновского обследования. Кроме того, подобные шестистепенные роботы широко применяются в качестве базовых механизмов хирургического инструмента при проведении операций на позвоночнике, в нейрохирургии (рис. 4) [5, 6]. Точность позиционирования хирургического инструмента составляет 20 мкм.

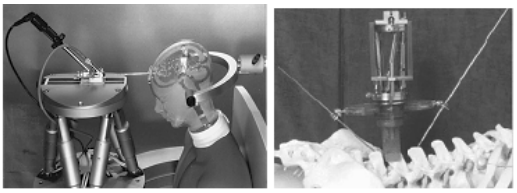


Рис.4. Примеры применения Hexapod

Необходимо отметить, что робототехнические комплексы находят все большее применение в разных областях медицины. Одним из важных направлений является создание оборудования для лапароскопического оперирования и экзоскелетов.

Литература.

1. J. R. Mendoza-Vázquez, et al., "Simulation of a Parallel Mechanical Elbow with 3 DOF," Journal of Applied Re- search and Technology, Vol. 7, No. 2, 2009, pp. 113-123

2. Pap J-S., Xu W.L., Bronlund J. A robotic human masticatory system: kinematics simulations Int. J. Intelligent Systems

Technologies and Applications, –2005. Vol. 1, N. 1/2,– p. 3–16.
3. Yangmin Li, Qingsong Xu. Design and Development of a Medical Parallel Robot for Cardiopulmonary Resuscitation , IEEE//ASME TRANSACTIONS ON MECHATRONICS. – 2007. Vol. 12, N. 3. – P. 265–273
4. Shoham M. and others . Bone-mounted miniature robot for surgical procedures: concept and clinical applications. IEEE Trans. On Robotics and Automation, – 2003. Vol. 19, №5–P.893–901.
5. Wapler M., Urban V. A Stewart Platform for Pre cision Surgery. // Transactions of the Institute of Measurement and Control, –2003. Vol.25, N. 4. – P. 329–334

MEDICAL PARALLE ROBOTS

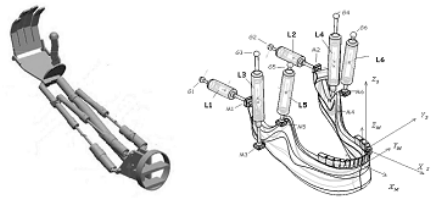
Kheylo, S. V.[1], Razumeev K. E.[1], Gavryushin S. S.[2], Garin, O. A.[2], Glazunov. V. A.[3], Sharapov I. B[4]

[1]Federal state budgetary educational institution of higher professional education Russian state University. A. N. Kosygina, Moscow, Russia
117997, Moscow, Sadovnicheskaya str., 33
e-mail: sheilo@yandex.ru
[2]Federal state budgetary educational institution of higher professional education Moscow state technical University. N. Uh. Bauman, Moscow, Russia
105005, Moscow, 2-ya Baumanskaya str., 5
e-mail: gss@bmstu.ru
[3]Federal state budgetary institution of science Institute of machines science named. A.A. Blagonravova of the Russian Academy of Sciences
e-mail: vaglznv@mail.ru ; sharapov@fano.gov.ru
[4]The Federal Agency for scientific organizations, Moscow, Russia 119334, Moscow, Leninsky prospect, 32A

Examples of the use of parallel structure robots in medicine and the prospects for their use.

Key words: mechanism of parallel structure, the manipulator, the medical robot

Parallel Robots have wide application in various industries. One of the areas of application of robots – biology and medicine [1]. So with the help of mechanisms of parallel structure can be modeled biological structural systems, in particular modeling of the prosthetic hand (Fig.1 a) [2], works the jaw muscles (Fig.1 b) [3].



a) b)

Fig.1 Model biological systems
a) a prosthetic hand, b) simulation of the jaw muscles

The well-known Delta robot is used for the spatial movements of surgical equipment. On the basis of the mechanism of the Delta created by the manipulator, allowing to work as a respirator with a frequency of 100 beats per minute and an amplitude of 4-5 cm (Fig.2) [4]. This robot has a function not move, and the power and vibrating action.

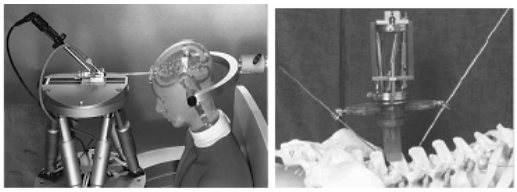
Parallel robots is used for ultrasonic diagnosis (Fig.3).

Fig. 2 the Delta Mechanism in cardiology

Fig.3 Robot for ultrasonic diagnosis

Hexapod is used for orientation to the patient during x-ray examination, for surgical instrument and spine

surgery (Fig. 4) [5, 6]. The positioning accuracy of surgical tools is 0,020 mm.



Examples of application of the Hexapod

It should be noted that robotic systems are used in different fields of medicine. One of the important directions of medical purpose is the creation and study of equipment for laparoscopic operation and exoskeletons.

References:
1. J. R. Mendoza-Vázquez, et al., "Simulation of a Parallel Mechanical Elbow with 3 DOF," Journal of Applied Re- search and Technology, Vol. 7, No. 2, 2009, pp. 113-123
2. Pap J-S., Xu W.L., Bronlund J. A robotic human masticatory system: kinematics simulations Int. J. Intelligent Systems Technologies and Applications, –2005. Vol. 1, N. 1/2,– p. 3–16.
3. Yangmin Li, Qingsong Xu. Design and Development of a Medical Parallel Robot for Cardiopulmonary Resuscitation , IEEE//ASME TRANSACTIONS ON MECHATRONICS. – 2007. Vol. 12, N. 3. – P. 265–273
4. Shoham M. and others . Bone-mounted miniature robot for surgical procedures: concept and clinical applications. IEEE Trans. On Robotics and Automation, – 2003. Vol. 19, №5–P.893–901.
5. Wapler M., Urban V. A Stewart Platform for Pre cision Surgery. // Transactions of the Institute of Measurement and Control, –2003. Vol.25, N. 4. – P. 329–334

УДК 536.2+ 617-7

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕПЛООБМЕНА В БИОТКАНИ ДЛЯ ПЛАНИРОВАНИЯ РОБОТОТЕХНИЧЕСКИХ КРИОХИРУРГИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ

Пушкарев А.В., Морозова Н.В., Цыганов Д.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)» (МГТУ им. Н.Э. Баумана), г. Москва. Адрес: 105005, г. Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5, стр. 1, e-mail: Pushkarev@bmstu.ru

Предлагается осуществлять моделирование теплообмена при воздействии нескольких криоинструментов на биоткань для выявления основных закономерностей процесса и в перспективе создания робототехнического криохирургического комплекса с возможностью автоматической локализации криозондов.

Ключевые слова: криохирургия, робототехническая операция, теплообмен, биоткань

В настоящее время осуществляются криохирургические вмешательства с использованием нескольких криоинструментов – многозондовые операции. Применение группы малоинвазивных криоинструментов обусловлено тем, что при использовании одного криоинструмента не достигается положительный эффект лечения – достижение температуры некроза во всей области [1]. Для корректного расположения криозондов в целевой области необходимо осуществлять планирование операции с помощью предварительного теплофизического расчета. Точность моделирования данного процесса зависит от степени достоверности значений исходных параметров, входящих в математическую модель. На данном этапе исследованы технические параметры - мощность охлаждения оборудования [2,3], начато исследование физических параметров – теплофизических свойств биотканей [4]. В последующем на основе многовариантного моделирования будут выработаны рекомендации, на основе которых в перспективе возможно будет создание робототехнического криохирургического комплекса с функцией автоматической локализации криозондов. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект 16-19-10567).

Литература.
1. А.В. Пушкарев, А.О. Васильев, С.А, Шептунов, Д.И. Цыганов Исследование факторов повреждения биотканей

для создания криохирургического оборудования // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2016. – No 4 (40). – С. 124–137
2. А.А. Жердев, А.В. Шакуров, А.В. Пушкарев, И.А. Бурков, Е.А. Антонов, А.О. Васильев, А.Г. Белозеров Исследование характеристик криозондов при различных режимах работы // Медицинская Техника, № 5, 2016 - С. 41-44
3. Пушкарев А.В., Цыганов Д.И., Шакуров А.В., Шафранов В.В. Экспериментальное исследование малогабаритного криодеструктора для детской хирургии // Детская хирургия. Том 20, № 5, 2016. - С. 259-263
4. Белозеров А.Г., Березовский Ю.М., Королев И.А., Пушкарев А.В./ Дифференциальная сканирующая калориметрия в исследованиях теплофизических характеристик биологических тканей в широком диапазоне температур //Международный научно-исследовательский журнал. № 12 (54), Часть 3, 2016. – С.14-20. doi: 10.18454/IRJ.2016.54.033

UDK: 536.2+ 617-7

MODELING OF HEAT TRANSFER IN BIOLOGICAL TISSUES FOR PLANNING ROBOTIC CRYOSURGERY

Pushkarev A.V., Morozova N.V., Tsiganov D.I.

Federal state budgetary institution of higher professional education (BAUMAN MOSCOW STATE TECHNICAL UNIVERSITY), Address: 105005, Moscow, ul. Baumanskaya 2-ya, 5/1, e-mail: Pushkarev@bmstu.ru

It is proposed to carry out modeling of heat transfer from the impact of several cryoinstruments to biological tissue to determine the basic laws of processes in the perspective of creating robotic cryosurgical complex with automatic localization of cryoprobes.

Key words: cryosurgery, robotic surgery, heat transfer, biological tissue

Currently carried out cryosurgical interventions using several cryoinstruments - multiprobe operation. The use group of minimally invasive cryoinstruments due to the fact that when using one cryoinstrument not achieved a positive effect of treatment - to achieve necrosis temperatures throughout the region [1]. For the correct location of the cryoprobes in the target area must be to carry out planning operations using a preliminary thermophysical calculation. Accuracy of modeling of this process depends on the reliability of the initial values of the parameters included in the mathematical model. At this stage, we investigated the technical parameters - power cooling equipment [2,3] launched a study of the physical parameters - thermal properties of biological tissues [4]. Subsequently, on the basis of multiple modeling will make recommendations on the basis of which in the long run may be the creation of robotic cryosurgical complex with automatic localization of cryoprobes. This study was supported by Russian Science Foundation (under Grant 16-19-10567).

References:
1. А.В. Пушкарев, А.О. Васильев, С.А, Шептунов, Д.И. Цыганов Исследование факторов повреждения биотканей для создания криохирургического оборудования // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2016. – No 4 (40). – С. 124–137
2. А.А. Жердев, А.В. Шакуров, А.В. Пушкарев, И.А. Бурков, Е.А. Антонов, А.О. Васильев, А.Г. Белозеров Исследование характеристик криозондов при различных режимах работы // Медицинская Техника, № 5, 2016 - С. 41-44
3. Пушкарев А.В., Цыганов Д.И., Шакуров А.В., Шафранов В.В. Экспериментальное исследование малогабаритного криодеструктора для детской хирургии // Детская хирургия. Том 20, № 5, 2016. - С. 259-263
4. Белозеров А.Г., Березовский Ю.М., Королев И.А., Пушкарев А.В./ Дифференциальная сканирующая калориметрия в исследованиях теплофизических характеристик биологических тканей в широком диапазоне температур //Международный научно-исследовательский журнал. № 12 (54), Часть 3, 2016. – С.14-20. doi: 10.18454/IRJ.2016.54.033

УДК 536.2+ 617-7

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕПЛОФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОТКАНЕЙ ДЛЯ РАЗВИТИЯ РОБОТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

Пономарев Д.Е., Пушкарев А.В., Цыганов Д.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)» (МГТУ им. Н.Э. Баумана), г. Москва. Адрес: 105005, г. Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5, стр. 1, e-mail: dp01@mail.ru

Для применения роботических технологий в области криомедицины необходимы точные сведения о теплофизических свойствах биологических тканей для точного расчёта температурных полей и времени замораживания.

Ключевые слова: криохирургия, робототехническая операция, теплообмен, теплофизические свойства биоткани

Одними из важных параметров для создания автоматических робототехнических комплексов для криохирургии являются значения теплофизических свойств (ТФС) биологических тканей, а именно, плотности, теплоёмкости и теплопроводности, так как они используются в качестве коэффициентов в уравнении теплопроводности, по которому рассчитывается теплофизическое воздействие на целевую область. Как известно, ТФС значительно меняются при понижении температуры, однако на сегодняшний день нет полной информации о значениях этих свойств для всего многообразия биологических тканей на широком диапазоне температур. По этой причине при моделировании криохирургического воздействия используют либо постоянные на отрицательном и положительном диапазонах температур значения ТФС, либо ТФС воды. Однако использование свойств льда приводит к занижению времени замораживания, а использование постоянных свойств к его завышению [1]. В рамках данного исследования проведены измерения ТФС как здоровой, так и злокачественной предстательной железы [2]. Уточнённое моделирование низкотемпературного воздействия может стать основой для разработки алгоритмов автоматического позиционирования криоинструментов в целевую область с применением роботических технологий. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект 16-19-10567).

Литература.
5. Choi J., Bischof J. C., Review of biomaterial thermal property measurements in the cryogenic regime and their use for prediction of equilibrium and non-equilibrium freezing applications in cryobiology // Cryobiology. – 2010. – Vol. 60(1), P. 52-70.
6. Белозеров А.Г., Березовский Ю.М., Королев И.А., Пушкарев А.В./ Дифференциальная сканирующая калориметрия в исследованиях теплофизических характеристик биологических тканей в широком диапазоне температур //Международный научно-исследовательский журнал. № 12 (54), Часть 3, 2016. – С.14-20. doi: 10.18454/IRJ.2016.54.033

.....

UDK: 536.2+ 617-7

PROSPECTS OF USING THERMOPHYSICAL PROPERTIES OF BIOLOGICAL TISSUES FOR THE DEVELOPMENT OF ROBOTIC TECHNOLOGY

Ponomarev D.E., Pushkarev A.V., Tsiganov D.I.

Federal state budgetary institution of higher professional education (BAUMAN MOSCOW STATE TECHNICAL UNIVERSITY), Address: 105005, Moscow, ul. Baumanskaya 2-ya, 5/1, e-mail: Pushkarev@bmstu.ru

Accurate information about the thermal properties of biological tissue for the calculation of temperature fields and freezing time is necessary for the application of robotic technology in cryomedicine

Key words: cryosurgery, robotic surgery, heat transfer, thermophysical properties of biological tissue

One of the important parameters to create automatic robotic systems for cryosurgery are values of thermophysical properties of biological tissue (density, thermal conductivity and thermal capacity) since they are used as coefficients in the heat transfer equation which is calculated for the thermophysical impact on the target area. It is known that thermal properties significantly vary with decreasing temperature, but currently there is no information on the values of these properties for a whole variety of biological tissues on a wide range of temperatures. For this reason, when modeling cryosurgical impact there are used either constant values of thermophysical properties on the positive and negative temperature ranges or water thermophysical properties. However, the use of ice properties results to an underestimation of freezing time, and the use of constant properties

results to overestimation [1]. In this study, there were conducted thermophysical properties measuring of both healthy and cancerous prostate [2]. The proximate modeling of the low-temperature impact could be the basis for the development of automatic positioning cryoinstruments algorithms in the target area with the use of robotic technology. The study was performed by a grant from the Russian Science Foundation (project 16-19-10567).

References:
5. Choi J., Bischof J. C., Review of biomaterial thermal property measurements in the cryogenic regime and their use for prediction of equilibrium and non-equilibrium freezing applications in cryobiology // Cryobiology. – 2010. – Vol. 60(1), P. 52-70.
6. Belozerov A.G., Berezovsky U.M., Korolev I. A., Pushkarev A.V. Differential Scanning Calorimetry in the study of thermal characteristics of biological tissues in a wide temperature range // International Research journal. № 12 (54), Part 3, 2016 – P. 14-20. doi: 10.18454 / IRJ.2016.54.033

УДК 681.5: 541.64:537.3

ЭЛЕКТРОУПРАВЛЯЕМЫЕ СИСТЕМЫ БИОМЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА (АКТУАТОРЫ И ИСКУССТВЕННЫЕ МУСКУЛЫ)

Дмитриев И.Ю., Розова Е.Ю., Нестеров П.В., Зоолшоев З.Ф., Ельяшевич Г.К.

Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
199004, Санкт-Петербург, В.О., Большой пр., д.31
e-mail: dmitriev@hq.macro.ru

Разработан способ изготовления электроуправляемых искусственных мускулов изгибного типа на основе совместных систем хитозан/полианилин. Показано, что образцы демонстрируют электромеханический отклик и определены его характеристики – степень и скорость деформации.

Ключевые слова: искусственные мускулы, электроактивные полимеры, биомедицинская робототехника, хитозан, полианилин

В настоящее время внимание многих разработчиков биомедицинских устройств нового поколения направлено на электроактивные полимерные материалы, обладающие выраженным электрохемомеханическим откликом – способностью обратимо изменять размеры и/или форму под действием электрического тока и pH среды [1]. Электроуправляемые системы на основе полимерных материалов обобщенно классифицируют как искусственные мускулы [2]. Они стабильны в водных средах в широком диапазоне pH и могут быть легко интегрированы в органический материал.

В данной работе предложена новая методика получения электроуправляемого композиционного полимерного материала на основе пленок природного полимера – хитозана, приповерхностные слои которых насыщены электропроводящим полимером – полианилином. Пленки готовили из 3%-ого раствора хитозана средней молекулярной массы в 2%-й уксусной кислоте, который отливали на стеклянную подложку. Подготовленную пленку помещали в полимеризационную смесь, содержащую анилин и пероксидисульфат аммония (окислитель), и выдерживали в течение 24 часов. В результате полимеризации на обеих сторонах хитозановой пленки формировался слой электропроводящего полианилина с толщиной порядка 1 мкм. Пленки хитозан/полианилин после высушивания характеризуются поверхностной электропроводностью 10-2 См/см.

Электромеханический отклик полученных образцов исследовали в среде электролита в кислой (5% водный раствор HCl) и нейтральной среде (2М водный раствор NaCl). Пленки толщиной около 0.5 мм в зажиме между электродами при подаче напряжения демонстрируют изгибную деформацию в направлении положительного электрода (анода). В кислой среде при напряжении 2.6 В изгиб развивается за 1.5 минуты и достигает 16 градусов. В нейтральном растворе развитие изгиба происходит за 30 сек, величина изгиба достигает 20 градусов. Скорость изгибного движения пленки от одного электрода к другому зависит от значения инициирующего электрического напряжения, которое находится в диапазоне 2 - 3 В. Перемена полярности вызывает изменение направления изгиба.

В работе показано, что электроуправляемые системы могут быть получены на основе как сшитой, так и несшитой пленки хитозана. В первом случае параметры электромеханического отклика практически не изменяются при многократных циклах воздействия электрического поля переменного направления. При использовании несшитой пленки хитозана образцы демонстрируют ограниченное число циклов изгибной деформации, после чего происходит их распад. Системы второго типа предложено использовать для

дозированного выпуска лекарственного препарата, предварительно распределенного в объеме пленки, благодаря возможности ее разложения под действием электрического импульса. Таким образом, в представленной работе получен новый электроуправляемый материал на основе природного биосовместимого полимера для разработки мини- и микроактюаторов, микроклапанов, а также систем микродозирования для различных биомедицинских применений.

Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку Российскому фонду фундаментальных исследований (грант №16-03-00265а).

Литература.
1. Carpi F. Electromechanically Active Polymers / F. Carpi. – Switzerland: Springer International Publishing, 2016. – 798 p.
2. Bar-Cohen, Y. Electroactive polymer (EAP) actuators as artificial muscles: reality, potential, and challenges / Y. Bar-Cohen. – 2nd Edition – Bellingham, WA: SPIE Press, 2004. – 765 p.

ELECTRO-RESPONSIBLE BIOMEDICAL SYSTEMS BASED ON CHITOSAN (ACTUATORS AND ARTIFICIAL MUSCLES)

Dmitriev I.Yu., Rosova E.Yu., Nesterov P.V., Zoolshoev Z.F., Elyashevich G.K.

Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Russia
Saint-Petersburg, 199004, Bolshoy pr., 31
e-mail: dmitriev@hq.macro.ru

The method to prepare the electro-responsible artificial muscles of bending type based on chitosan/polyaniline composite systems has been elaborated. It is shown that the samples exhibit an electromechanical response, and their characteristics (degree and rate of deformation) were determined.

Key words: artificial muscles, electroactive polymers, biomedical robotics, chitosan, polyaniline

At the present time the attention of many designers of new generation biomedical devices is focused on electroactive polymer materials which are characterized by a pronounced electro-chemo-mechanical response – ability to change the size and/or shape under electric current and at changes of pH medium [1]. The electro-responsible systems based on polymeric materials are generally classified as artificial muscles [2]. They are stable in aqueous media in a wide pH range and can be easily integrated into organic material.

In this paper, we propose a new method to prepare the electroactive polymer films based of natural polymer – chitosan - with the electroconductive polymer (polyaniline) layers in the surface. The films were prepared by casting of 3% solution of the average molecular mass chitosan in the 2% acetic acid on a glass substrate. The chitosan film was put into a polymerization mixture containing aniline and ammonium peroxydisulfate (oxidizer) for 24 hours. As a result the layers of conductive polyaniline (thickness of about 1 micron) were formed on both surfaces of the film. After drying the chitosan/polyaniline films are characterized by a surface conductivity of 10-2 Cm/cm.

The electromechanical response of the obtained samples was investigated in media of acid (5% aqueous solution of HCl) and neutral (2M aqueous solution of NaCl) electrolytes. Films (thickness about 0.5 mm) were fixed in the clamps between two graphite electrodes. Under voltage they exhibited a bending deformation in the direction to positive electrode (anode). In acidic medium the bending develops during 1.5 minutes and reaches 16 degrees at a voltage of 2.6 V. In neutral solution the bending develops during 30 sec and reaches 20 degrees. The rate of the film bending from one electrode to another depends on the value of an electric voltage, which was in the range of 2 - 3 V. The change of polarity leads to the changing of bending direction.

It is shown that electro-responsible polymer systems can be obtained using crosslinked and also non-crosslinked chitosan films. In the first case, the characteristics of electromechanical response are preserved stable at multiple cycles of the electric field switching. The samples based on the non-crosslinked chitosan films demonstrate a limited number of cycles of the bending deformation because of disintegration of the samples. The actuators of the second type were proposed to be used for the dosing delivery of volume distributed drug due to the film destruction under electric field influence. Thus, in the present work a new electrically-controlled material based on natural biocompatible polymer has been obtained. It can be perspective for the elaboration of mini-, microactuators, microvalves and also microdosing systems for various biomedical applications.

The work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 16-03-00265a).

References:
1. Carpi F. Electromechanically Active Polymers / F. Carpi. – Switzerland: Springer International Publishing, 2016. – 798 p.

2. Bar-Cohen, Y. Electroactive polymer (EAP) actuators as artificial muscles: reality, potential, and challenges / Y. Bar-Cohen. – 2nd Edition – Bellingham, WA: SPIE Press, 2004. – 765 p.

УДК 617-7

ПЕРСПЕКТИВА ПРИМЕНЕНИЯ РОБОТИЗИРОВАННОГО МЕДИЦИНСКОГО МАНИПУЛЯТОРА «РММ-2» ДЛЯ ВЕРТЕБРОЛОГИИ

Батанов А.Ф. [1], Алехин А.И. [2], Макиров С.К. [1], Саврасов Г.В. [2]

[1] *ООО «Специальное конструкторско-технологическое бюро прикладной робототехники» (ООО «СКТБ ПР»), Москва, Россия*
119049, г. Москва, Ленинский проспект, д.4, стр.1А
e-mail: sktb_pr@mail.ru
[2] *ФГБУЗ «Центральная клиническая больница Российской академии наук»*
ФГБУЗ «ЦКБ РАН»
117593, г. Москва, Литовский бульвар, дом 1А (метро «Ясенево»)
e-mail: science@ckbran.ru

Целью работы является совершенствование путем применения роботизированного медицинского манипулятора «РММ-2» технологии хирургии позвоночника, которая требует прецизионности и необходимости постоянного рентгенконтроля, вследствие чего возникает большая лучевая нагрузка на пациента и персонал.

Ключевые слова: роботизированный медицинский манипулятор, прецизионность, вертебрология, введение транспедикулярных винтов, установка имплантов

В отделении вертебрологии Центральной клинической больницы Российской Академии Наук (ЦКБ РАН) была проведена доклиническая апробация роботизированного медицинского манипулятора «РММ-2», созданного в ООО «СКТБ ПР, в одном из перспективных направлений медицины – вертебрологии.

В рамках поисковых научных исследований коллективом специалистов ЦКБ РАН и ООО «СКТБ ПР» были выполнены следующие работы:

- «РММ-2» использовался как дистанционно управляемое средство высокоточного ввода игл «Джамшиди» в позвонок через его ножку под рентген-контролем;
- «РММ-2» использовался как дистанционно управляемое средство для введения транспедикулярных винтов с использованием навигационной аппаратуры фирмы «Stryker» в сочетании с интраоперационным компьютерным томографом «BodyTom».
- «РММ-2» использовался как дистанционно управляемое средство для декомпрессии позвоночного канала в сочетании с фрезой.

Проведенные исследования показали перспективу использования манипулятора «РММ-2» в хирургии позвоночника и позволит решать следующие задачи по ассистенции и частичной замене труда хирурга при выполнении операций :

- минимизация ошибок и осложнений;
- обеспечение возможности высокоточного хирургического вмешательства
- повышение безопасности пациента во время операции за счет повышения точности и сокращения времени проведения хирургического вмешательства;
- повышение безопасности врачей при работе с вредными физическими факторами - рентгеновское излучение, магнитные поля, радиоизотопами и др.;
- увеличение числа врачей, способных выполнять сложные хирургические операции;
- повышение эффективности лечения.

В процессе поисковых научных исследований применения «РММ-2» в сочетании с предоперационным планированием и написание программ для установления имплантов получены высокие результаты, направленные на достижение практических целей и решения конкретных задач хирургии позвоночника.

UDC 617-7

POTENTIAL FOR USING ROBOTIZED MEDICAL MANIPULATOR «RMM-2» FOR VERTEBROLOGY

Batanov A.F. [1], Alechin A.I.[2], Makirov S.K. [2], Savrasov G.V[1].

[1] LLC «Special Design and technology department of applied robotics»
(LLC «SDTDAR»), Moscow, Russia
119049, Moscow, Leninsky pr, d.4, buld.1A
e-mail: sktb_pr@mail.ru
[2] FGBIHC «Central clinical hospital of the Russian Academy of Sciences»
FGBIHC «CCH RAS»
117593, Moscow, Lithuanian Blvd., Building 1A («Yasenevo» subway)
e-mail: science@ckbran.ru

The purpose of our work is to improve the technologies for spinal surgery, by applying the robotized medical manipulator "RMM-2". The spinal surgeries require precise and continuous X-ray throughout the surgical procedure, which subsequently exposes both the patient and the staff to high doses of radiation.
Key words: robotized medical manipulator (equipment), precision (accuracy), vertebrology, insertion of pedicle screws, implants.

The preclinical trial of the robotized medical manipulator "RMM-2", which was created by ООО «СКТБ ПР" was conducted in the vertebrology department of the Central clinical hospital of the Russian Academy of Science.

The research team, which was comprised of the representatives from the hospital and the ООО «СКТБ ПР» conducted the following activities:

- "RMM-2" was used as a remotely controlled tool for the insertion of the high voltage Jamshidi needles into the vertebrae through the pedicle under the –X-ray;
- "PMM-2" was used as a remotely controlled tool for the insertion of the pedicle screws in conjunction with the "Stryker" navigational equipment and computer tomography "BodyTom"
- "PMM-2" was used as a remotely controlled tool for the spinal cord decompression in conjunction with the drill

The conducted research has shown potential in the use of the manipulator "PMM-2" for the spinal surgery. It provides assistance to the doctors and partially substitutes their tasks while performing the surgeries:

-Minimising mistakes and complications
- providing high quality surgical intervention
- improving patient safety during the surgery through increasing the precision and decreasing the time of the surgical procedure
-improving surgeons' and medical staff's safety when working with harmful physical factors such as X-rays, magnetic fields, radioisotopes, etc.
- increasing the number of doctors who are able to perform complex surgical operations
- improving the quality and efficiency of treatment

In the process of this exploratory research into the use of the "RMM-2" in combination with the perioperative planning and implant positioning programming obtained high results and it require further perfecting to achieve the practical goals and specific tasks in the spinal cord surgeries.

УДК 577.38; 602.5

ВОЗМОЖНОСТЬ СОЗДАНИЯ ГИБРИДНЫХ БИОРОБОТОВ НА ОСНОВЕ ИНТЕГРАЦИИ МОТОРИКИ НАСЕКОМЫХ И ИСКУССТВЕННЫХ СЕНСОРНО-ИНФОРМАЦИОННЫХ МИКРОСИСТЕМ.

Князев А.Н.[1], Бункин А.Н.[2], Баулин Ю.А.[1], Луничкин А.М.[1]

[1] ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Пр. Тореза, дом 44, г. Санкт-Петербург, 194223
e-mail: ank50@mail.ru
[2] ФГБУН Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, ул. Вавилова, 38, г. Москва, 119991
e-mail: bunkin@fano.gov.ru

Целью работы является демонстрация того, что создание сверхминиатюрных дистанционно управляемых гибридных биороботов на основе интеграции моторики насекомых и искусственных сенсорно-информационных микросистем является вполне реальной задачей, для решения которой потребуется проведение серьезных фундаментальных и прикладных исследований в области физиологии насекомых, микро- и наноэлектроники.

Ключевые слова: микро-робототехника, гибридные биороботы

В настоящее время в мире стала активно спонсироваться и стремительно развиваться микро-робототехника. Области ее применения очень разнообразны – от продукции специального и двойного назначения, до промышленного производства в том числе и товаров массового потребления, например, для производства игрушек (Американская компания Backyards Brains). Известно два основных направления ее развития. Первое основано на достижениях бионики. Цель – создание искусственных миниатюрных роботов (2007 г., идея – электронные насекомые), обладающих уникальными свойствами биологических объектов. Второе направление развития микро-робототехники связано с созданием гибридных биороботов, в которых пробовали соединять искусственные миниатюрные сенсорно-информационные и естественные биологические системы. В качестве естественных систем использовали либо элементы живых организмов (культура нервных клеток насекомых, антенны [хемосенсоры], а также мозг и глаза бабочки), либо целый дееспособный живой организм (например, жук, бабочка, таракан, стрекоза и т.п.). В первом случае деятельность искусственной сенсорно-информационной системы управлялась «живым биофрагментом», а во втором – сенсорно-информационная микросистема модулировала направленное поведение целого нормального животного. Такие разработки интенсивно развиваются в США, Франции, Нидерландах, Израиле, Германии и других странах.

Создание и применение искусственных миниатюрных роботов и роботов на основе элементов живых организмов (например, культур нервных клеток), сталкиваются с рядом сложных проблем. Это, например, проблема, связанная с разработкой сверхминиатюрных источников энергии, и проблема перемещения мини-роботов в пространстве в разных средах – в воде, в воздухе, в твердых, «рыхлых и сыпучих» средах.

Обе эти проблемы (и многие другие) уже «эффективно решены» в процессе эволюции природных биосистем. Например, у насекомых. Использование живых насекомых в качестве миниатюрных дистанционно управляемых экономичных транспортных средств, способных доставить необходимую электронную аппаратуру (акустические, вибраторные, фото-, хемо-, электро-, тепловые датчики, датчики электромагнитных и иных возмущений среды и т.п.) в любой труднодоступный пункт назначения вполне реально.

Известно, что насекомые это самый многочисленный класс животных (более двух миллионов видов), которые освоили все среды обитания, кроме морских глубин, и адаптированы к широчайшему спектру биотических и абиотических факторов. Они используют разнообразные способы перемещения – ползание, бег, прыжок, полет, плавание. Насекомые способны перемещаться в воздухе по ветру и против ветра, по поверхности и в толще воды, на земле и под землей, под завалами, вызванными техногенными и природными катастрофами. Они могут нормально существовать при высоком уровне радиации, перемещаться по горизонтальным и вертикально ориентированным поверхностям – от гладких стеклянных, полированных, до шероховатых и «сыпучих», в древесине, в рыхлой лесной подстилке и т.п.

В мировых исследованиях, посвященных созданию биороботов, используют очень узкий набор видов насекомых: крупные виды тропических тараканов (Blaberus giganteus, Gromphadorhina portentosa), крупные жуки-златки, тропические бабочки-бражники и крупные бабочки-шелкопряды. Это объясняется двумя причинами. Во-первых, искусственные сенсорно-информационные системы пока относительно велики по сравнению с насекомыми, а источники питания слишком тяжелы. Это сильно затрудняет внедрение «беспроводных» дистанционных систем управления движением и поведением насекомых. Во-вторых, набор экспериментальных насекомых ограничен еще и потому, что используемые виды давно стали лабораторными животными. С одной стороны это большой плюс, так как их можно выращивать в искусственных условиях и заниматься исследованиями круглый год. Об этом говорит мировой и отечественный опыт работы инсектариев. А минусом является тот факт, что в природе они менее жизнеспособны и подобны лабораторным белым мышам и крысам. Однако, в отличие от млекопитающих, лабораторные насекомые сохраняют все основные формы поведения, характерные для диких животных. Это позволяет в экспериментальных условиях исследовать базовые механизмы поведения и возможности управления основными его формами. Именно это обстоятельство делает насекомых наиболее привлекательным объектом, пригодным для разработки гибридных биороботов.

В настоящее время работы в этой сфере проводят только на тропических видах насекомых. Использование их в условиях нашей дикой природы практически невозможно. Однако их можно эффективно использовать в любых широтах (в том числе и в условиях Севера), но только в антропогенных биоценозах – в городах с развитой системой подземных обогреваемых коммуникаций – в первую очередь систем

отопления, канализации, энергоснабжения, а гибридные биороботы в этом случае могут быть использованы для их оперативного обследования. О такой возможности говорят исследования группы московских энтомологов, которые показали, что городские коммуникации, в том числе и транпортные, например метрополитен, в настоящее время успешно освоены крупными видами тропических тараканов.

Литература.
1. Алешо Н. А. (2011). Распространение синантропных тараканов на территории городов России. Беспозвоночные животные в коллекциях зоопарков и инсектариев: материалы 4 Междунар. семинара. С. 36-42.;
2. Wilson D. M., Weis-Fogh, T. (1962). Patterned activity of co-ordinated motor units, studied in flying locusts // J. Exsp. Biol. 39, p. 643-667.;
3. Князев А. Н. (2000). Некоторые новые подходы к исследованию механизмов поведения насекомых. Тенденции развития физиологических наук. СПб: Наука. С. 162-165.;
4. Князев А. Н. (1983). Методика длительной регистрации электрической активности гигантских интернейронов брюшной нервной цепочки у свободно движущегося двупятнистого сверчка. Нейрон и межнейронная интеграция, Л. Наука. С. 196-199.
5. Князев А.Н. (2016). Роль физиологии беспозвоночных в решении фундаментальных проблем общей физиологии и медицины. СПб: СПбНЦ РАН, Изд-во «Арт-Экспресс». С. 155–158.

A POSSIBILITY TO DEVELOP HYBRID BIOROBOTS ON THE BASIS OF INTEGRATION OF INSECT MOTOR BEHAVIOR AND ARTIFICIAL SENSORY-INFORMATIONAL MICROSYSTEMS

Knyazev A.N.[1], Bunkin A.N.[2], Baulin Yu.A.[1], Lunichkin A.M.[1]

1 Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, pr. Toreza, 44, St. Petersburg, 194223
e-mail: ank50@mail.ru
2 Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova, 38, Moscow, 119991
e-mail: bunkin@fano.gov.ru

The aim of the work was to demonstrate that development of subminiature, distantly controlled hybrid biorobots on the basis of integration of insect motor behavior and artificial sensory-informational microsystems is quite a realistic problem and to solve it serious fundamental and applied investigations in the fields of insect physiology, micro- and nanoelectronics are necessary.

Key words: microrobotics, hybrid biorobots.

Nowadays microrobotics is actively sponsored and rapidly developing all over the world. Fields of its application are various – from manufacturing special and dual-purpose goods to industrial production, including consumer goods, for instance, toys (American company Backyards Brains). Two main directions of its development are known. The first one is based on the achievements of bionics. The goal - the creation of artificial miniature robots (2007, the idea - electronic insects), with unique properties of biological objects. The second direction of development of micro-robotics is related to the creation of hybrid bio-robots, where the investigators tried to connect he miniature artificial sensory-informational and natural biological systems. As natural systems either elements of living organisms were used (culture of insect nerve cells, antennae [chemosensors] as well as the brain and the eyes of butterfly) or a whole capable living organism (e.g., beetle, butterfly, cockroach, dragonfly, etc.). In the first case, the activity of artificial sensory-informational system was controlled by a "living biofragment", while in the second one - the sensory-informational microsystem modulated the directional behavior of a whole normal animal. This research is intensively developing in the United States, France, the Netherlands, Israel, Germany and other countries.

Creation and application of artificial miniature robots and robots based on the elements of living organisms (e.g., cultures of nerve cells), face a number of challenges. For example, it is a problem of development of subminiature power sources, and the problem of small robots moving in space in different environments - in water, air, solid, "friable and granular" environments.

Both of these problems (and many others) were "effectively solved" in the process of evolution of natural biological systems. For example, in insects. The use of live insects as miniature remote-controlled fuel-efficient vehicles, capable of delivering the necessary electronic equipment (acoustic, vibratory, photo-, chemo-, electric- and

heat sensors, sensors of electromagnetic and other environmental disturbances, etc.) to any hard-to-reach points is quite real.

It is known that insects are the most numerous class of animals (more than two million species), who mastered all habitats except the deep sea, and are adapted to the widest range of biotic and abiotic factors. They use a variety of ways to move – to crawl, run, jump, fly, and swim. Insects are able to move in the air by and against the wind, on the surface and within water, on surface and under the ground, under rubbles caused by man-made and natural disasters. They can normally exist with a high level of radiation, move on the horizontal and vertically oriented surfaces - from smooth polished glass to rough and "loose" ones, in the wood, in the loose litter, etc. Global studies on creation of bio-robots use a very narrow range of insect species: the larger species of tropical cockroaches (Blaberus giganteus, Gromphadorhina portentosa), large buprestid beetles, tropical sphinx moths and large silkmoths. There are two reasons for this. First, the artificial sensory-informational systems are still relatively large compared to insects and the power sources are too heavy. This greatly complicates the implementation of "wireless" remote systems of movement and insect behavior control. Second, the set of experimental insects is still limited because the species used have long ago become laboratory animals. On the one hand this is a big advantage, since they can be grown in artificial conditions and allow research all year round. This is evidenced by the global and domestic experience of working insectaries. A disadvantage is the fact that in nature they are less viable and are similar to laboratory white mice and rats. However, unlike mammals, the laboratory insects retain all major forms of behavior characteristic of wild animals. This makes possible to investigate basic mechanisms of behavior and ability to control its main forms under experimental conditions. This circumstance makes insects the most attractive object, suitable for development of hybrid bio-robots.

Currently, the work in this area is carried out only on tropical species of insects. Using them under conditions of our wildlife is almost impossible. However, they can be used effectively in any latitudes (including in the North), but only in anthropogenic biocoenosis - in cities with a developed system of underground heated communications – primarily, heating systems, sewage, electric supply, and hybrid biorobots in this case can be used for their operational survey. This possibility is demonstrated by the research group of Moscow entomologists who showed that large species of tropical cockroaches have now successfully adapted themselves to the city communications, including transport ones such as Metro.

References:
1. *Alesho N.A. (2011). The spread of synanthropic cockroaches on the territory of cities of Russian Federation. Invertebrate animals in collections of zoos and insectaries: Materials of the 4-th Intern. workshop. P. 36-42;*
2. *Wilson D. M., Weis-Fogh, T. (1962). Patterned activity of co-ordinated motor units, studied in flying locusts // J. Exsp. Biol. 39, p. 643-667;*
3. *Knyazev A.N (2000). Some of the new approaches to the study of insect behavior mechanisms. Trends in the development of physiological science. St. Petersburg: Nauka. P. 162-165;*
4. *Knyazev A.N. (1983). Method of continuous recording of the electrical activity of the giant interneurons of the ventral nerve cord in a freely moving two-spotted cricket. Neuron and interneuronal integration, Leningrad. Nauka. P. 196-199;*
5. *Knyazev A.N. (2016). The role of the physiology of invertebrates in solving fundamental problems of general physiology and medicine. St. Petersburg: SPbSC of the Russian Academy of Sciences, Publishing House "Art Express". P. 155-158.*

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

УДК 616-089.17

ИНДЕКС КАЧЕСТВА ЖИЗНИ ПОСЛЕ РАДИКАЛЬНОЙ ПРОСТАТЭКТОМИИ: СРАВНЕНИЕ РОБОТ-АССИСТИРОВАННОЙ И ОТКРЫТОЙ МЕТОДИК

Васильев А.О., Говоров А.В., Пушкарь Д.Ю.

Кафедра урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» имени А.И. Евдокимова Минздрава РФ, г. Москва, Россия. Адрес: 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1,
e-mail: alexvasilyev@me.com

Снижение качества жизни в послеоперационном периоде может привести к серьезным психоэмоциональным изменениям и значительно снизить самооценку больного. Роботическая операция

рассматривается как «золотой стандарт» оперативного лечения рака предстательной железы, поскольку позволяет минимизировать количество осложнений и сохранить качество жизни.

Ключевые слова: качество жизни, роботическая операция, осложнения.

На качество жизни (КЖ) пациентов, подвергнутых лечению по поводу рака предстательной железы, наибольшее влияние оказывают недержание мочи, эректильная дисфункция, стриктура уретры и дисфункция кишечника.

Нами проведена сравнительная оценка КЖ мужчин, перенесших радикальное оперативное лечение по поводу локализованного рака предстательной железы (РПЖ) клинической стадии T1c-2c за последние 2 года. В ретроспективное исследование были включены 60 пациентов, перенесшие открытую радикальную позадилонную простатэктомию (РПЭ) и 65 пациентов, перенесшие робот-ассистированную радикальную простатэктомию (РАРП). Средний возраст пациентов обеих групп составил 61 год. Интервал наблюдения составил от 6 месяцев до 1 года. Протокол наблюдения был одинаков для обеих групп: определение уровня общего ПСА, проведение урофлоуметрии, измерение объема остаточной мочи, анкетирование с помощью опросников IPSS, EORTC QLQ-C30 и МИЭФ-5.

В послеоперационном периоде сохраненная эректильная функция была выявлена у 75 пациентов (71,5%), из которых 41 в группе РАРП, а 34 – в группе РПЭ. Средний суммарный балл по шкале IPSS составил 4,5 и 7,5 балла ($p > 0,05$) соответственно. Максимальная скорость мочеиспускания – 18,7 и 17,2 мл/с, соответственно для первой и второй групп ($p < 0,05$). Общие показатели качества жизни и функциональных шкал опросника EORTC QLQ-C30 в течение первых 6 мес. после оперативного лечения представлены на рисунке 1. Недержание мочи, а также осложнения дальнего послеоперационного периода (грыжи, несостоятельность везикоуретрального анастомоза) диагностировались чаще у пациентов после РПЭ. Применение в послеоперационном периоде уретрального катетера, препятствующего формированию стриктур анастомоза, в перспективе поможет снизить частоту формирования данной патологии.

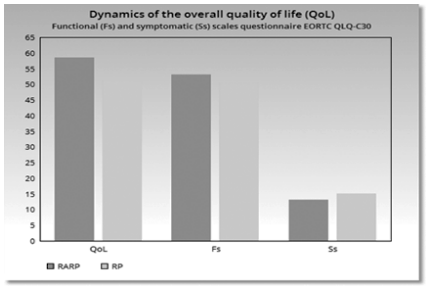


Рис. 1. Динамика общего показателя качества жизни

Процессы восстановления протекали быстрее и легче у пациентов в группе РАРП: короче периоперационный период, возвращение к повседневной жизни. После робот – ассистированной радикальной простатэктомии улучшается субъективная оценка КЖ, а также повышается уровень социальной адаптации пациентов.

Работа выполнена при поддержке РНФ, соглашение № 16-15-00233

UDK 616-089.17

QUALITY OF LIFE INDEX AFTER RADICAL PROSTATECTOMY: A COMPARISON OF ROBOT-ASSISTED AND OPEN TECHNIQUE

Vasilyev A.O., Govorov A.V., Sukhikh S.O., Kotenko D.V., Pushkar D.Yu.

Department of Urology Federal state budgetary institution of higher education (Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov) Address: 127473, Moscow, ul. Delegatskaya, 20-1, e-mail: alexvasilyev@me.com

Reduced quality of life in the postoperative period can lead to serious psycho-emotional changes and significantly reduce the patient's self-esteem. Robotic surgery is regarded as the «gold standard» surgical treatment of prostate cancer because it allows you to minimize the number of complications and keep the quality of life.

Key words: quality of life, robotic surgery, complications.

The quality of life (QOL) of patients undergoing treatment for prostate cancer, the most affected by urinary

incontinence, erectile dysfunction, urethral stricture, and bowel dysfunction.

We carried out a comparative assessment of quality of life of men who underwent radical surgical treatment for localized prostate cancer (PCa), clinical stage T1c-2c for the last 2 years. In retrospective study were included of 65 patients who underwent robot-assisted radical prostatectomy (RARP) and 60 patients who underwent open radical prostatectomy (RP). The average age of patients in both groups was 61 year. The interval follow-up of 6 months to 1 year. Minutes observation was the same for both groups: determination of the total PSA, conducting urofloumetry, residual urine volume measurement, surveys using questionnaires IPSS, EORTC QLQ-C30 and IIEF-5.

Postoperatively erectile function was found in 75 patients (71.5%), of which 41 in the group RARP, and 34 - in the RP group. The average total score on the scale of IPSS was 4.5 and 7.5 points (p> 0.05), respectively. Q max - 18.7 and 17.2 ml / sec, respectively, for the first and second groups (p <0.05). General quality of life, functional and symptomatic scales questionnaire EORTC QLQ-C30 for the first 6 months after surgical treatment are presented below (Fig. 1). Urinary incontinence, as well as complications of long postoperative period (hernia, insolvency vesicourethral anastomosis) were diagnosed more frequently in patients after radical prostatectomy.

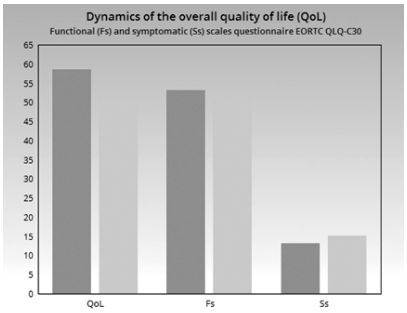


Fig. 1. Dynamics of the overall quality of life

It has been proven that in the postoperative recovery process is faster and easier for patients to RARP group: perioperative period was shorter, the return to everyday life took place earlier than in the group of patients who underwent RP. After RARP improves subjective assessment of quality of life and increases the level of social adaptation of patients.

This study was supported by Russian Science Foundation (under Grant 16-15-00233)

.....

УДК 616.65–089

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ХОЛОДОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОКРУЖАЮЩИЕ ТКАНИ КАК ОСНОВА ПРЕЦИЗИОННОСТИ В ПРОВЕДЕНИИ САЛЬВАЖНОЙ РОБОТ-АССИСТИРОВАННОЙ ПРОСТАТЭКТОМИИ ПОСЛЕ КРИОАБЛАЦИИ

Васильев А.О., Говоров А.В., А.В. Пушкарев, Цыганов Д.И., Пушкарь Д.Ю.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана (национальный исследовательский университет)» (МГТУ им. Н.Э. Баумана), г. Москва. Адрес: 105005, г. Москва, 2-я Бауманская ул., д. 5, стр. 1, e-mail: alexvasilyev@me.com

Изучение эффективности криодеструкции ex vivo, экспериментальное изучение формирования ледяного шара в желатиновой модели и подсчет критической температуры в заданных точках позволяет потенциально планировать ход роботических операций в случае рецидива рака предстательной железы.

Ключевые слова: криодеструкция, эксперимент, низкая температура, роботическая операция, рак предстательной железы.

Криоаблация предстательной железы представляет собой аблацию ткани путем локального воздействия очень низкой температуры и является минимально инвазивным, высокоэффективным методом лечения рака предстательной железы, который может применяться как первично, так и в случае рецидива опухоли после лучевой терапии. Значительное усовершенствование аппаратуры для криодеструкции,

использование криоигл меньшего диаметра, температурных датчиков и катетера для согревания слизистой оболочки уретры позволило минимизировать количество осложнений по сравнению с другими методами лечения и добиться высокой безрецидивной выживаемости.

Фокальная криоаблация предстательной железы позволяет селективно разрушать известный очаг опухоли с сохранением функции органа, однако, неполная аблация опухоли зачастую может приводить к ее рецидиву. Накопленный собственный опыт изучения низкотемпературного воздействия в зависимости от качественных и количественных показателей криовоздействия, в том числе проведенные экспериментальные методы in vitro (на желатиновой модели) и ex vivo (на трупной простате) позволили правильнее понимать процессы, происходящие в ткани, а также формирование ледяного шара и возможное повреждение окружающих тканей (рис.1). Понимание данных процессов легли в основу точного понимания хода сальважной робот-ассистированной простатэктомии в случае рецидива рака предстательной железы после фокальной криоаблации простаты и добиться радикальности лечения, путем уменьшения случаев положительного хирургического края.

Работа выполнена при поддержке РНФ, соглашение № 16-19-10567

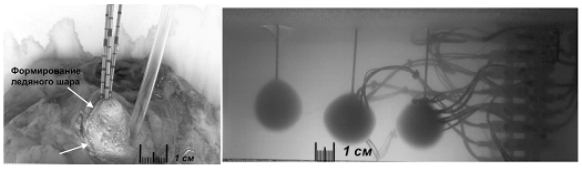


Рис.1. Формирование зоны замораживания

Литература.
7. А.В. Пушкарев, А.О. Васильев, С.А, Шептунов, Д.И. Цыганов Исследование факторов повреждения биотканей для создания криохирургического оборудования // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2016. – No 4 (40). – С. 124–137
8. Говоров А.В., Васильев А.О., Ковылина М.В., Прилепская Е.А., Ковнацкая Г.А., Пушкарь Д.Ю. Эффективность криовоздействия в зависимости от количественных и качественных режимов замораживания. Ж. Экспериментальная и клиническая урология 2015;1:24-28

UDK 616-089-06

EXPERIMENTAL STUDY OF CRYOTHERAPY ON THE SURROUNDING TISSUE – BASIS OF THE PRECISION IN PERFORMING SALVAGE ROBOT-ASSISTED PROSTATECTOMY AFTER CRYOABLATION

Vasilyev A.O., Govorov A.V., Pushkarev A.V., Tsiganov D.I., Pushkar D.Yu.

Federal state budgetary institution of higher professional education (BAUMAN MOSCOW STATE TECHNICAL UNIVERSITY), Address: 105005, Moscow, ul. Baumanskaya 2-ya, 5/1, e-mail: alexvasilyev@me.com

Studying the effectiveness of cryoablation ex vivo, experimental study of the formation of ice balls in the gelatin model and calculation of the critical temperature at given points potentially allows to plan the course of robotic operations in case of recurrence of prostate cancer.

Key words: cryosurgery, experiment, low temperature, robotic surgery, prostate cancer.

Cryoablation of the prostate is the ablation of tissue by local effects of very low temperatures and is minimally invasive, highly effective method of treatment for prostate cancer, which can be used as the primary, and in the case of tumor recurrence after radiotherapy.

A significant improvement of equipment for cryoablation, cryoneedle the use of smaller diameter, temperature sensors and the catheter to warm the urethral mucosa possible to minimize the number of complications compared with other treatments, and to achieve a high disease-free survival.

Focal cryoablation of the prostate allows you to selectively destroy tumor known hotbed of preserving organ function, however, is not complete ablation of the tumor can often lead to its recurrence. Accumulated their own experience of studying low-temperature impact, depending on the quality and quantity of cryogenic treatment,

including those conducted by experimental methods in vitro (in the gelatin model) and ex vivo (on cadaveric prostate) enabled correctly understand the processes occurring in the tissue, and the formation of the ice ball and possible damage to the surrounding tissue (Fig. 1). Understanding these processes form the basis of an accurate understanding of the progress salvage robot-assisted prostatectomy in case of recurrence of prostate cancer following focal cryoablation of the prostate and to achieve radical treatment, by reducing the cases of positive surgical margins.

This study was supported by Russian Science Foundation (under Grant 16-19-10567).

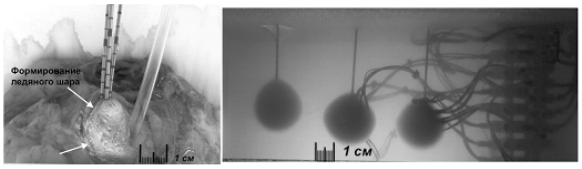


Fig.1. Formation of the freezing zone

References:
1. Pushkarev A.V., Vasilyev O.V., Sheptunov S.A., Tsiganov D.I. Research of factors on damage of biological tissues for design cryo-surgery equipment // Proceedings of the higher educational institutions. Volga region. Medical sciences. - 2016. - No 4 (40). - P. 124-137
2. A.V. Govorov, A.O.Vasiliev, M.V. Kovilina, E.A. Prilepskaya, G.A. Kovnatskaya, D.Yu. Pushkar. Efficacy of cryodestruction depending on the qualitative and quantitative settings of the freezing and thawing. Experimental and Clinical Urology 2015. - № 1- P. 24-28

УДК 616-089-06

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ОСЛОЖНЕНИЙ В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ РОБОТИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ

Васильев А.О., Говоров А.В., Пушкарь Д.Ю.

Кафедра урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» имени А.И. Евдокимова Минздрава РФ, г. Москва, Россия. Адрес: 127473, г. Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1,
e-mail: alexvasilyev@me.com

Поиск альтернативных методов профилактики и лечения осложнений со стороны органов мочевыделительной системы после роботических операций, обусловлен сохраняющимся высоким числом пациентов со стенозом везикоуретрального анастомоза и катетер-ассоциированной инфекцией.

Ключевые слова: альтернативные методы, роботические операции, стеноз везикоуретрального анастомоза, катетер-ассоциированная инфекция.

Проведена оценка первичных результатов внедрения в клиническую практику двух новых моделей уретрального катетера (рис. 1); с точки зрения целесообразности применения оценена эффективность использования новых моделей уретрального катетера для профилактики и лечения послеоперационных осложнений после робот-ассистированной радикальной простатэктомии (РАРП), а также в ходе лечения основных патологических состояний, сопровождающихся инфекционно-воспалительными осложнениями (в ходе дренирования мочевого пузыря уретральным катетером).

В исследование были включены 17 пациентов (основная группа), у которых по завершении РАРП мочевой пузырь был дренирован специально разработанным уретральным катетером, позволяющим проводить контролируемое наполнение дополнительного баллона, располагающегося в области сформированного везикоуретрального анастомоза или уретральным катетером, предусматривающим возможность орошения мочеиспускательного канала лекарственными препаратами. В контрольной группе (n=15) мочевой пузырь после операции был дренирован стандартным двух- или трехходовым катетером Фолея No 18–22 Ch.

Ни в одной из групп не было отмечено непереносимости новой модели уретрального катетера. Средний

период нахождения уретрального катетера в основной и контрольной группах, ровно как и частота развития дизурии, практически не различались. После удаления уретрального катетера у всех пациентов основной и контрольной групп восстановлено самостоятельное мочеиспускание. Полученные предварительные данные показали хорошую переносимость новых моделей уретрального катетера. Оценка отдаленной эффективности займет дополнительное время и потребует включения в исследование большего числа больных.

Работа выполнена при поддержке РНФ, соглашение № 16-15-00233

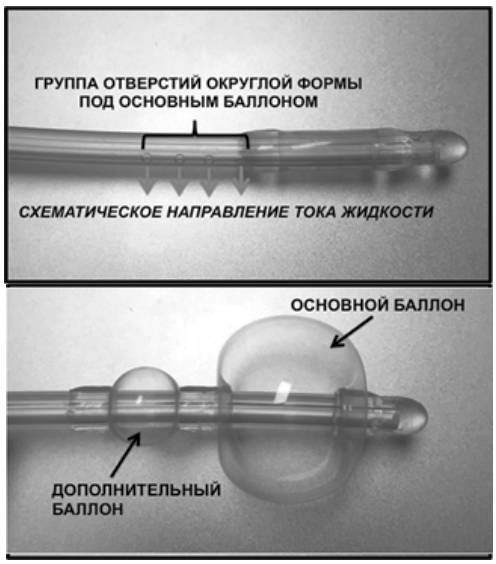


Рис. 1. Уретральный катетер

UDK 616-089-06

ALTERNATIVE APPROACHES TO PREVENTION AND TREATMENT OF COMPLICATION IN THE EARLY POSTOPERATIVE PERIOD ROBOTIC OPERATIONS

Vasilyev A.O., Govorov A.V., Pushkar D.Yu.

Department of Urology Federal state budgetary institution of higher education (Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov) Address: 127473, Moscow, ul. Delegatskaya, 20-1, e-mail: alexvasilyev@me.com

The search for alternative methods of prevention and treatment of complications of urinary organs after robotic operations, due to the continuing high number of patients with stenosis of the urethrovesical anastomosis (radical prostatectomy), and catheter-associated urinary tract infection.

Key words: alternative methods, robotic surgery, urethrovesical anastomosis, catheter-associated urinary tract infection.

The evaluation of the results of the primary introduction into clinical practice of two new models of the urethral catheter (Fig. 1); from the standpoint of the appropriateness of measured efficiency of new models urinary catheter for the prevention and treatment of postoperative complications of robot-assisted prostatectomy (RARP), and in the treatment of major pathological conditions involving infectious and inflammatory complications (when bladder drainage urethral catheter).

The study included 17 patients (study group), who at the end of RARP the bladder was installed specially designed urethral catheter with controlled filling the balloon is located in the area formed by the anastomosis or urinary catheter irrigation urethra drugs. In the control group (n=22) in the bladder has been established a standard two- way silicone Foley urinary catheter.

Hypersensitive of the new model of the urethral catheter none of the patients were observed. The average period when the urinary catheter in the main and control groups, exactly as the incidence of dysuria did not differ. After removal of the urethral catheter in all patients in the study and control groups restored self urination.

The preliminary data showed a good tolerability the new models of the urethral catheter. Evaluation of the effectiveness of distant occupy additional time and will require inclusion in the study a larger number of patients.

This study was supported by Russian Science Foundation (under Grant 16-15-00233)

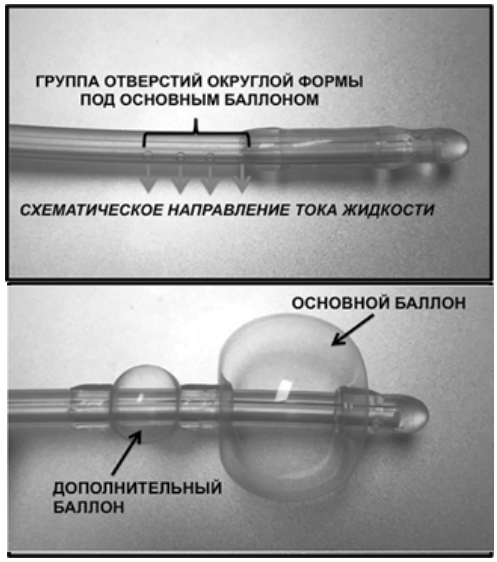


Fig. 1. Urethral catheter

УДК 681.5: 541.64:537.3

ИСКУССТВЕННЫЕ МЫШЦЫ НА ОСНОВЕ НАБУХАЮЩИХ ПОЛИМЕРОВ

Иванов В.П.[1], Дмитриев И.Ю.[2] Ельяшевич Г.К.[2]

[1] Санкт-Петербургский институт информатики и автоматизации Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
199178, Санкт-Петербург, В.О., 14-я линия, д.39
e-mail: vpivanov.spb.su@gmail.com
[2] Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
199004, Санкт-Петербург, В.О., Большой пр. , д.31
e-mail: dmitriev@hq.macro.ru

Разработан способ изготовления электроуправляемых искусственных мышц линейного типа на основе полимерных гидрогелей, полученных методом синтеза сшитой полиакриловой кислоты в присутствии поливинилового спирта. Изготовлен макет линейного мускула, определены физико-механические характеристики электроуправляемого гидрогелевого элемента.

Ключевые слова: биотехническая система, робототехника, исполнительные устройства, искусственная мышца, полимерные гидрогели

Развитие биотехнологий, различных систем автоматики и робототехники, в том числе в мини-, микро- и наноисполнении, требует разработки новых исполнительных устройств. В связи с этим вызывают интерес искусственные мышцы на основе набухающих полимеров (гидрогелей), совместимых с биотканями, которые являются достаточно близкими аналогами мышц биологических [1]. Для их активации можно использовать электрический ток, изменение pH-среды, ионное, световое и тепловое воздействие, а также комплексное применение вышеперечисленных факторов [2,3]. В настоящее время известны лишь отдельные варианты устройств, использующие электроуправляемые гидрогели данного типа [4]. Разработка искусственной мышцы на набухающих полимерных материалах включает в себя две взаимосвязанные задачи: а) получение материала с удовлетворительным уровнем механических свойств, б) конструирование модели искусственной мышцы на этом материале. В данной работе полимерные гидрогели для мышц были получены свободно радикальной сополимеризацией акриловой кислоты (25%-й водный раствор) с N,N'-метиленбисакриламидом (сшиватель) в 10%-ом водном растворе поливинилового спирта. В качестве

инициатора использовали систему пероксидисульфат аммония /соль Мора/сульфит натрия; соотношение сшиватель/ мономер составляло 1:300. Полученные гидрогели имели достаточный уровень эластичности и прочности для использования их в исполнительных устройствах [5]. Искусственную мышцу формировали на волокнах из гидрогеля диаметром 1-2 мм и длиной 20-100 мм. Для оценки возможности создания исполнительного устройства был построен экспериментальный макет. Исследования показали, что на макете с применением только одного волокна диаметром 2 мм можно получить усилие до 10 г при максимальном перемещении до 7 мм. На связках волокон было достигнуто перемещение в 20 мм при усилии 200-500 г. Было установлено, что скорость перемещения зависит от электропроводности гидрогеля, определяемой составом среды набухания волокна (электролита). На макете исполнительного устройства была достигнута стабильность материала, разработаны методы крепления электродов и подвода электрического тока. Таким образом, показано, что существует принципиальная возможность использования набухающих полимеров для разработки на их основе искусственных мышц линейного типа.

Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку Российскому фонду фундаментальных исследований (грант №16-03-00265а).

Литература.

1. *Bar-Cohen, Y. Electroactive polymer (EAP) actuators as artificial muscles: reality, potential, and challenges / Y. Bar-Cohen. – 2nd Edition – Bellingham, WA: SPIE Press, 2004. – 765 p.*
2. *Osada, Y. Polymer gels and networks / Y. Osada, A. R. Khokhlov. – NY: Marcel Dekker, 2002. – 384 p.*
3. *Elyashevich G.K., Smirnov M.A., Bobrova N.V., Dmitriev I.Yu., Bukošek V. Multicomponent electroactive and pH-sensitive smart composites based on polypyrrole, polyacrylic acid hydrogels, and polyethylene porous films. // Smart Nanocomposites. – 2012 – V. 3 – Iss.2 – P.123-136. Nova Science Publishers. ISSN: 1949-4823.*
4. *Patent US 008088453B1, 03.01.2012.*
5. *Дмитриев И.Ю., Иванов В.П., Боброва Н.В., Зоолшоев З.Ф., Курындин И.С., Ельяшевич Г.К., Иванов В.П. Гибридные гидрогели на основе сшитой полиакриловой кислоты и поливинилового спирта как электроуправляемые искусственные мускулы. // Журнал прикладной химии. – 2016 - Т. 89 - Вып. 11, С. 55.*

UDC 681.5: 541.64:537.3

ARTIFICIAL MUSCLES BASED ON SWELLING POLYMERS

Ivanov P. V.1, Dmitriev I. Yu2., Elyashevich G. K.2

[1] Saint-Petersburg Institute of Informatics and Automation, Russian Academy of Sciences, Russia Saint Petersburg, 199178, 14th line, 39
e-mail: vpivanov.spb.su@gmail.com
[2] Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Russia
Saint-Petersburg, 199004, Bolshoy pr., 31
e-mail: dmitriev@hq.macro.ru

New method to obtain the electrically controlled artificial muscles based on polymeric hydrogels is developed. The synthesis of crosslinked polyacrylic acid and polyvinyl alcohol was elaborated to prepare the tensile-strength and elastic hydrogels. The prototype of the actuator was constructed. The physical-mechanical characteristics of electrically controlled hydrogel were determined.

Keywords: biotechnical system, robotics, actuators, artificial muscles, polymeric hydrogels

The development of biotechnology, different automation systems, robotics, including mini-, micro- and nanorobots, requires the elaboration of new actuators. Therefore it is interesting to obtain the artificial muscles based on swelling polymers (hydrogels) which are compatible with biological tissues and may be considered as sufficiently close analogues of biological muscles [1]. They can be activated by electric current, changing of pH, ionic concentration, light and heat effects, and also complex usage of these factors [2, 3]. At present only some devices with electrically-controlled hydrogels as active elements are known [4]. The elaboration of artificial muscles based on the swelling polymer materials involves two interconnected tasks: a) preparation of mechanically strength hydrogel, b) constructing of the artificial muscle prototype. In this work polymeric hydrogels were obtained by free radical copolymerization of acrylic acid (25% aqueous solution) with N,N'-methylenebisacrylamide (crosslinker) in 10% aqueous solution of polyvinyl alcohol. As an initiator system peroxydisulfate ammonium /Mohr salt/ sodium sulfite was used. The ratio crosslinker/monomer was 1:300. The hydrogels are characterized by sufficient elasticity and strength to use them as actuators [5]. Artificial muscles of the hydrogel fibers with a diameter of 1-2 mm and a

length of 20-100 mm were formed. The experimental layout was constructed to estimate the possibility to prepare the actuators. It was shown that a single fiber structure with a diameter of 2 mm gives the force up to 10 g at the maximum displacement 7 mm. For the bundles of the fibers, the displacement 20 mm and the force of 200-500 g were achieved. It was found that the rate of displacement depends on the electrical conductivity of the hydrogel sample which is determined by the composition of the electrolyte. The stability of the material was reached and the methods of the electrodes fixation and supplying the electric current were elaborated at the layot. Thus, it was shown that the swelling hydrogels may be used to prepare the artificial muscles.

The work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 16-03-00265a).

References:

1. *Bar-Cohen, Y. Electroactive polymer (EAP) actuators as artificial muscles: reality, potential, and challenges / Y. Bar-Cohen. – 2nd Edition – Bellingham, WA: SPIE Press, 2004. – 765 p.*
2. *Osada, Y. Polymer gels and networks./Y. Osada, A. R. Khokhlov. – NY: Marcel Dekker, 2002. – 384 p.*
3. *Elyashevich G.K., Smirnov M.A., Bobrova N.V., Dmitriev I.Yu., Bukošek V. Multicomponent electroactive and pH-sensitive smart composites based on polypyrrole, polyacrylic acid hydrogels, and polyethylene porous films. // Smart Nanocomposites. – 2012 – V. 3 – Iss.2 – P.123-136. Nova Science Publishers.ISSN: 1 V.949-4823.*
4. *Patent US 008088453B1, 03.01.2012.*
5. *Dmitriev I.Yu., Ivanov V.P., Bobrova N.V., Zoolshoev Z.F., Kuryndin I.S., Elyashevich G.K. Hybride hydrogels based on crosslinked polyacrylic acid and polyvinyl alcohol as electrically controlled artificial muscles. // Russian Journal of Applied Chemistry. – 2016 – V. 89 – Iss.11 – P.55.*

СЕКЦИЯ

ПРОГРЕСС В ОБЛАСТИ БИОСЕНСОРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ, СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА, ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

SECTION

ADVANCES IN BIOSENSOR TECHNOLOGIES FOR MEDICINE, AGRICULTURE, ENVIRONMENTAL MONITORING ROBOTIC TECHNOLOGY

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ
ORAL REPORTS

БИОМИМИКРИЯ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ: МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫЕ ПОЛИМЕРЫ КАК СИНТЕТИЧЕСКИЕ ИМИТАТОРЫ АНТИТЕЛ

К. Хаупт

Университеты Сорбонны, Компьенский технологический университет
Институт ферментно-клеточного инжиниринга Национального научно-исследовательского центра, г. Компьен, Франция
Sorbonne Universités, Compiègne University of Technology
CNRS Institute for Enzyme and Cell Engineering, Compiègne, France

Биомимикрия – это общий термин, применяемый к любому методу, направленному на искусственное воспроизводство важнейших свойств одной или нескольких биологических систем. Такие методы создаются с целью использования естественных механизмов или материалов для прямого применения в различных областях техники и технологии. Одной из главных сфер применения биомимикрии является материаловедение и создание новых материалов. На молекулярном уровне примером являются молекулярно-импринтированные полимеры (МИП), при создании которых используется имитация явления молекулярного распознавания.

МИПы – это синтетические имитаторы антител, которые избирательно распознают целевые молекулы. Они представляют собой сильно сшитые полимеры, синтезируемые путём полимеризации мономеров, имеющих подходящие функциональные группы, в присутствии целевых молекул, играющих роль молекулярного шаблона. Присутствие шаблона индуцирует возникновение точек образования трёхмерной сети поперечных связей в сшитом полимере, которая является комплементарной шаблону по размеру, форме и химическим функциям. Таким образом, эти так называемые «пластиковые антитела» способны распознавать и связывать свои цели с аффинностью и избирательностью, аналогичным биологическим антителам.

Мы хотели бы представить новые подходы, позволяющие синтезировать МИП посредством радикальной полимеризации, контролируемой как пространственно, так и по химии. Это позволяет, в частности, получать белково-размерные растворимые наногели МИП с однородным распределением по размеру. Они

демонстрируют специфичность связывания со своими целями (небольшими органическими молекулами или белками) при наномолярной аффинности и хорошей избирательности. Поскольку МИПы совместимы со стандартными микро- и нано- методами производства, их также можно получать в любой физической форме, обеспечивая при этом сопрягаемость с другими материалами, и получать в результате нанокомпозиты. Будут обсуждены и такие вопросы, как использование таких функциональных наноматериалов для разделения по аффинности, для разработки технологий биосенсоров и биовизуализации, а также для других областей применения.

BIOMIMICRY AT THE MOLECULAR LEVEL: MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS AS SYNTHETIC ANTIBODY MIMICS

K. Haupt

Sorbonne Universités, Compiègne University of Technology
CNRS Institute for Enzyme and Cell Engineering, Compiègne, France

Biomimicry is the general term covering any approach aimed at reproducing artificially essential properties of one or more biological systems. This is done in order to exploit natural mechanisms or materials for direct applications in different technological domains. One of the main application areas of biomimicry is materials science. At the molecular level, molecularly imprinted polymers (MIPs) are an example, mimicking molecular recognition phenomena.

MIPs are synthetic antibody mimics that specifically recognize molecular targets. They are highly cross-linked polymers that are synthesized through the polymerization of monomers bearing suitable functional groups, in the presence of the target molecule acting as a molecular template. This templating induces three-dimensional binding sites in the cross-linked polymer network that are complementary to the template in terms of size, shape and chemical functionality. Thus, these so-called 'plastic antibodies' can recognize and bind their targets with an affinity and selectivity similar to biological antibodies.

We present new approaches allowing for the synthesis of MIP by chemiaclly and spatially controlled radical polymerization. This allows for example to obtain protein-size, soluble MIP nanogels with a homogeneous size distribution. They show specific binding of their targets, small organic molecules or proteins, with a nanomolar affinity and a good selectivity. Since MIPs are compatible with standard micro and nanofabrication techniques, they can also be obtained in any other physical form, and at the same time interfaced with other materials, resulting in nanocomposites. The use of these functional nanomaterials for affinity separation, biosensing, bioimaging and other applications will be discussed.

УДК 57.083.3

МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ ИММУНОСЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВНЕЛАБОРАТОРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Дзантиев Б.Б., Жердев А.В.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
119071, Москва, Ленинский проспект 33.
e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Рассматриваются разработки автономных иммунодиагностических систем; факторы, ограничивающие экспрессность, производительность и чувствительность анализа и пути их преодоления. Представлены результаты разработки и характеристики мультиплексных иммунохроматографических систем для медицинской диагностики и контроля пищевых токсикантов.

Ключевые слова: иммуносенсоры, иммунохроматография, внелабораторная диагностика, мультиплексный анализ, амплификация сигнала.

Применение в современной практике различных аналитических методов определяется как их чувствительностью и достоверностью, так и возможностями реализации высокопроизводительных

тестирований с минимизацией время- и трудозатрат. В этой связи при разработке биосенсорных систем принципиальное значение приобретает реализация новых подходов, которые при сохранении простоты и экспрессности традиционных внелабораторных экспресс-тестов существенно расширяют их возможности, снижая предел детекции и повышая информативность тестирования.

В докладе на примере собственных разработок представлены результаты по реализации высокочувствительной и мультипараметрической детекции биологически активных соединений с использованием сенсорных систем, основанных на принципе иммунохроматографии. Обсуждены требования к нанодисперсным маркерам, используемым в иммунохроматографии, критерии для предварительного сравнения новых кандидатных маркеров. Показаны возможности снижения чувствительности по сравнению с традиционной иммунохроматографией (предполагающей использование сферических наночастиц золота или окрашенных латексов) при переходе к наночастицам золота с сильно разветвленной поверхностью – «наноцветы» - либо к флуоресцентным нанодисперсным маркерам – квантовым точкам. Охарактеризовано влияние состава комплексов наночастиц с иммунореагентами на аналитические характеристики системы. Продемонстрированы преимущества непрямой иммобилизации антител на коллоидных частицах, формирования в ходе иммунохроматографии агрегатов из функционализированных наночастиц разных типов. Обсуждается вопрос о предельной чувствительности, достигаемой в иммунохроматографических сенсорах с оптической детекции, вкладе аффинности иммунного взаимодействия в ограничения предела детекции.

Рассматриваются различные подходы, обеспечивающие одновременное определение нескольких аналитов в пробе с использованием одной иммунохроматографической системы. Приведены примеры систем с мультизонной и мультимаркерной детекцией различных аналитов. Сопоставлены чувствительность анализа и точность результатов, получаемых с использованием моно- и мультипараметрических систем, обсуждается выбор решений для производительного получения средств мультипараметрической диагностики.

Эффективность предлагаемых подходов рассматривается на примерах разработанных систем для детекции пищевых токсикантов (микотоксины, антибиотики), кардиомаркеров, маркеров воспалительных процессов, вирусных и бактериальных фитопатогенов.

UDC 57.083.3

MULTIPARAMETRIC IMMUNOSENSORIC SYSTEMS FOR NONLABORATORY APPLICATIONS

Dzantiev B.B., Zherdev A.V.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Center of Biotechnology, Russian Acad. Sci., Moscow, Russia
119071 Moscow, Leninsky prospect 33
e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Development of autonomous immunodiagnostic systems is considered focusing on factors limiting their rapidity, efficiency and sensitivity and ways to overcome them. The results of the development and characterization of multiplex immunochromatographic systems for medical diagnostics and control of food toxicants are presented.

Key words: immunosensors, immunochromatography, nonlaboratory diagnostics, multiplex assays, signal amplification.

Application of various analytical methods in modern practice is defined by their sensitivity and reliability, as well as by their applicability for high-performance testing with minimal time- and labor consumption. In this context, the fundamental compound in the development of biosensoric systems is the implementation of new approaches while maintaining the simplicity and rapidity of traditional non-laboratory rapid tests and greatly expand their capacities, reducing the limit of detection and extending the information content of the testing.

The report presents (on the examples of own studies) the results of the developments of highly sensitive and multiparametric detection for biologically active compounds with the use of sensors based on the principle of immunochromatography. Requirements for nanodispersed markers used in immunochromatography are discussed, and criteria for preliminary comparison of new candidate markers are formulated. The possibilities to reduce the sensitivity compared to conventional immunochromatography (involving the use of spherical gold nanoparticles or colored latexes) by the transition to gold nanoparticles with highly branched surface – «nanoflowers» – or

to fluorescent nanodispersed markers – quantum dots are demonstrated. The influence of the composition of nanoparticles – immunoreactants complexes on analytical parameters of the systems is characterized.

The advantages of indirect immobilization of antibodies on colloidal particles are demonstrated, as well as the advantages of the formation of aggregates from functionalized nanoparticles of different types during immunochromatography. The question about the ultimate sensitivity attainable in the immunochromatographic sensors with optical detection is considered, including the contribution of the affinity of immune interaction in limitations for minimal detectable concentration.

Various approaches to ensure simultaneous determination of multiple analytes in a sample using a single immunochromatographic system are considered. Examples of systems with multizone and multilabel detection of various analytes are presented. Sensitivities and accuracies of the results obtained by the use of mono- and multiparametric systems are compared. The choice of solutions for productive manufacturing of sensors for multiparametric diagnostics is discussed.

The effectiveness of the proposed approaches is seen using the examples of the developed systems for the detection of food toxicants (mycotoxins, antibiotics), cardiac markers, markers of inflammation, viral and bacterial plant pathogens.

СОВРЕМЕННЫЙ МЕТОД МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ: ПРЕИМУЩЕСТВА ПЛОСКИХ МАТРИЦ

Палеолого М. , Росар Г., Бравин Ф. , Персич Л.

Компания с ограниченноий ответственностью Tecna srl,
Италия, 34149 Триесте, ул. Падричиано 99, Эреа Саийенс Парк, e-mail paleologo@tecnalab.com

За последние годы были разработаны несколько «широкоохватных» методов иммуноферментного анализа (ELISA), однако, для проверки пищевых продуктов и кормов во многих случаях всё равно требуется несколько наборов, при этом в отдельных случаях сохраняется риск получения ложных отрицательных результатов.

Ключевые слова: загрязнение пищевых продуктов, мультиплексный, иммунологический анализ, иммуноферментный анализ ELISA, матрицы.

Определение наличия химических загрязнителей в цепочках кормов для животных и цепочках производства продуктов питания представляет собой трудоёмкую задачу как для предприятий, так и для государственных органов, выполняющих функции надзора и регулирования. Во всём мире для решения этой задачи используются главным образом наборы для иммунологических анализов, поскольку их применение не требует высокой квалификации персонала и стоимость необходимого оборудования сравнительно невысока. Главным недостатком набора для иммунологического анализа является его высокая специфичность. Число целевых, то есть подлежащих определению, молекул очень велико, в связи с чем необходимо использовать много различных наборов. Многими авторами уже разработаны методики иммуноферментного анализа, которые позволяют обнаруживать несколько целевых веществ (аналитов) или групп молекул в одном лабораторном сосуде или приборе за счёт одновременного использования нескольких антител. Мы называем такие методы «мультиплексными иммунологическими анализами». Одним из способов маркировки как целевого вещества, так и антитела является использование флюоресцентных наночастиц. В этом способе используется своего рода трёхмерная структура, в которой все реагенты находятся в растворе или на поверхности наносфер (структура кластерной суспензии). Другой способ предполагает создание плоских структур на твёрдой поверхности (микроструктур или двумерных структур). В настоящей работе мы описываем новейшие плоские микроструктуры, используемые в анализе пищевых продуктов, и показываем, что эта «архитектура», по целому ряду причин, является более удобной для удовлетворения потребностей повседневной работы обычных лабораторий.

Ключевыми аспектами, учитываемыми для понимания новейших достижений в этой области, являются практические характеристики таких методов анализа (чувствительность, избирательность, надёжность), стоимость оборудования, необходимого для получения результатов, наличие возможностей автоматизации и стоимость расходных материалов. К настоящему времени опубликованы описания

нескольких структур для хемилюминисцентного иммуноанализа, из их числа мы более подробно рассмотрим биочип «Эвиденс» компании Рэндокс (Randox Evidence biochip) и Микроаррей Чип Ридер (Microarray Chip Reader), созданный в Мюнхенском техническом университете. Обе разработки используются главным образом для определения остаточных количеств ветеринарных препаратов. Кроме того, опубликованы описания структур для ELISA-подобных анализов, использующих денситометрические измерения результатов, применяемых для определения нескольких различных загрязнителей пищевых продуктов, таких как биотоксинов в морепродуктах, микотоксинов и остаточных количеств препаратов. Практические рабочие показатели этих методов, демонстрируемые авторами или производителями, во многих случаях являются удовлетворительными для применения соответствующих методов в надзорной деятельности регулирующих органов. Результаты, полученные с помощью структур для ELISA-подобных анализов, говорят о перспективности таких методик, но предстоит проделать большую работу для разработки платформы, обеспечивающей низкую стоимость расходных материалов, гибкость применения и возможности автоматизации.

Благодарность авторов

Настоящая работа выполнена за счёт средств гранта, предоставленного правительством области Фриули-Венеция-Джулия (Friuli Venezia Giulia).

STATE OF THE ART OF MULTIPLEX IMMUNOASSAY FOR THE SCREENING OF FOOD CHEMICAL CONTAMINANTS: FOCUS ON PLANAR ARRAYS

Paleologo M., Rosar G., Bravin, F., Persic L.

Tecna srl, Area Science Park, Padriciano 99, 34149 Trieste, Italy
e-mail: paleologo@tecnalab.com

Several “broad range” ELISA methods have been developed in the past years, but still the screening often requires the use of several kits and in a few cases there are risks of false negative results.

Key words: food contaminants, multiplex, immunoassay, ELISA, arrays.

Screening of chemical contaminants in the feed and food chains is quite a heavy duty for both industries and governmental institutions in charge for official controls. Immunoassay kits are largely used worldwide because do not require highly qualified personnel and the investment in equipment is also very limited. The main limitation is the high specificity of immunoassays. The number of target molecules is very high and in many cases the analyst should use many test kits. Many authors have already developed immunoassays that can detect in the same reaction vessel or device a number of analytes or groups of molecules, employing simultaneously several antibodies. We call this method a “multiplex immunoassay”. There are two main designs for multiplex immunoassays. One way is to label both the analyte and the antibody, making use of fluorescent nanoparticles. This is a kind of 3D array, where all reagents are in solution or coated on nanobeads (bead suspension array). The other way is to make planar arrays on a solid surface (micro-array or 2D array). In this work we will describe the state of the art of planar microarrays in the food testing, demonstrating that this “architecture”, for a number of reasons, seems to be more convenient for the needs of routine laboratories.

Key points that will be considered in order to understand the state of the art in this field will be the performances of the analytical methods (sensitivity, specificity, ruggedness), the cost of the equipment for reading the results, the availability of any automation option and the cost of disposable components. Several chemiluminescent immune-arrays have been published already: among them we will consider with more care the Randox Evidence biochip and the Microarray Chip Reader of Munich Technical University, both mainly applied to the detection of veterinary drug residues. A number of “ELISA-like” arrays with densitometric measurement of results have been already published as well for the detection of several different food contaminants, like marine biotoxins, mycotoxins, and drug residues. The analytical performances showed by authors or manufacturers were often satisfactory for regulatory controls. Results of multiplex “ELISA-like” arrays looks promising, but still there is a lot of work to be done in order to develop a platform with low cost of disposables, flexibility and automation.

Acknowledgments

This work was supported by a grant of Friuli Venezia Giulia government .

УДК 577.113.5, 54.061, 54.066

МИКРОЧИПЫ В 96-ЛУНОЧНЫХ ПЛАНШЕТАХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Преснова Г.В., Поболелова Ю.И., Филиппова А.А., Егоров А.М.

Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3, ГСП-1, МГУ, химический факультет
e-mail: myr@enz.chem.msu.ru

Разработан метод мультианализа на основе технологии олигонуклеотидных микрочипов в лунках 96-луночных планшетов для одновременной идентификации генетических детерминант резистентности, относящихся к наиболее распространенным генам бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемаз.

Ключевые слова: мультианализ, олигонуклеотидные микрочипы, антибиотикорезистентность, бета-лактамазы.

Быстрая идентификация возбудителей инфекционных заболеваний и определение профиля их антибиотикорезистентности является одной из наиболее важных задач в современном здравоохранении и имеет огромную социальную значимость. Перспективными в этом направлении являются методы молекулярно-генетического анализа с использованием ДНК-микрочипов, которые позволяют одновременно определить множество различных детерминант устойчивости к антибиотикам. Особое значение методы анализа на основе микрочипов приобретают при переходе на персонализированную медицину, при выполнении масштабных исследований распространенности инфекционных заболеваний.

Цель работы заключалась в разработке технологии олигонуклеотидных микрочипов в лунках 96-луночных планшетов для идентификации генетических детерминант резистентности, относящихся к наиболее распространенным генам бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемаз. В задачи работы входила оптимизация условий иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности полистирола и условий проведения гибридизационного анализа на микрочипах.

Нами разработан новый метод модификации полистирола для ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов. Разработана методика проведения гибридизационного анализа нуклеиновых кислот с использованием микрочипов из иммобилизованных олигонуклеотидных зондов, размещенных в виде матрицы в лунках 96-луночных планшетов. Метод гибридизационного анализа на микрочипах состоял из нескольких этапов, включающих выделение ДНК из клинического образца, амплификацию генов бета-лактамаз методом мультиплексной ПЦР с одновременным включением биотина в качестве метки и последующую гибридизацию меченого ПЦР-продукта с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на поверхности полистирола. Молекулы биотина в ДНК-дуплексах выявляли конъюгатом стрептавидин–пероксидаза хрена с последующей колориметрической детекцией фермента. Тестирование микрочипов было проведено с использованием контрольных штаммов микроорганизмов, продуцирующих гены известных бета-лактамаз десяти типов, охарактеризованных методами секвенирования и ПЦР в реальном времени. Метод гибридизационного анализа на олигонуклеотидных микрочипах далее был применен для исследования клинических штаммов грам отрицательных бактерий- продуцентов бета-лактамаз. Метод идентификации генов на микрочипах характеризовался хорошей точностью и производительностью. Оптимизация условий проведения анализа позволила добиться достижения аналитических характеристик метода, сравнимых с характеристиками традиционных материалов для микрочипов (стекло) в сочетании с флуоресцентной детекцией. Использование 96-луночных планшетов позволяет существенно упростить проведение гибридизационного анализа в лабораторных условиях за счет упрощения стадий инкубации и отмывки, а также увеличить его производительность. Это позволяет сократить время вспомогательных стадий анализа и повысить его экспрессность. Разработанный метод может быть использован в клинических микробиологических лабораториях для характеристики возбудителей инфекционных заболеваний, эффективного инфекционного контроля и предупреждения широкого распространения данного механизма резистентности.

Работа выполнялась при финансовой поддержке РНФ (Проект № 15-14-00014).

UDK 577.113.5, 54.061, 54.066

MICROARRAYS IN 96-WELL PLATES FOR THE DETERMINATION OF GENES OF BACTERIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Presnova G.V., Pobolelova Yu.I., Filippova A.A., Egorov A.M.

Chemistry department of M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Leninskie Gory 1/3, Moscow State University, Chemistry Department
Email: myr@enz.chem.msu.ru

The method of multiassay based on the technology of oligonucleotide microarrays in the wells of 96-well plates was developed for simultaneous identification of most common genes of beta-lactamases involving ESBLs and carbapenemases.

Key words: multiassay, oligonucleotide microarrays, antibiotic resistance, beta-lactamases

Rapid identification of infectious agents and determination of their profile of antibiotic resistance is one of the most important challenges in modern healthcare and has a huge social significance. The methods of molecular genetic analysis using DNA-microarrays, which allow simultaneous determination of many different determinants of antibiotic resistance are promising for this purpose. Special value of the microarrays acquires in the personalized medicine, performing extensive studying the prevalence of infectious diseases.

The aim of this work was to develop the oligonucleotide microarrays in the wells of 96-well plates to identify genetic determinants of resistance belonging to the most common genes of beta-lactamase extended spectrum (ESBL) and carbapenemases. The objectives of the work were the optimization of immobilization conditions for the oligonucleotides on the surface of the polystyrene and the conditions for hybridization analysis.

We have developed a new method of polysterene modification for the covalent immobilization of oligonucleotides. The method of hybridization analysis on microarray in the wells of 96-well plates consisted of several steps involving DNA extraction from clinical sample, the amplification of genes of beta-lactamases by multiplex PCR with simultaneous incorporation of biotin as a label and following hybridization of the labeled PCR product with oligonucleotide probes immobilized on the surface of the polystyrene. Biotin molecules in DNA duplexes were revealed by a conjugate of streptavidin–horseradish peroxidase followed by a colorimetric detection of the enzyme. The microarrays were tested using control strains of bacteria producing genes of ten beta-lactamase types, characterized by sequencing and real-time PCR. The method of hybridization analysis on oligonucleotide microchips was further validated with clinical strains of Gram negative bacteria - producers of beta-lactamases. The microarrays were characterized by good accuracy and performance. Optimization of the conditions of the analysis allowed to achieve the analytical characteristics of the method comparable with the characteristics of traditional materials for microchips (glass) in a combination with fluorescent detection. The use of 96-well plates can significantly simplify the hybridization analysis in the laboratory as well as improve its performance. The method developed can be used in clinical microbiological laboratories for the characterization of infectious agents, effective infection control and preventing widespread dissemination of the resistance.

The work was supported by the RSF (Project No. 15-14-00014).

УДК 54.07+57.088

МИКРОФЛЮИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Евстрапов А.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН), Санкт-Петербург, Россия
190103, Санкт-Петербург, Рижский пр., 26.
e-mail: an_evs@mail.ru

Рассматривается современное состояние разработок в области микрофлюидных технологий для биологических и медицинских исследований. Обсуждаются основные направления развития этих технологий. Анализируется состояние разработок в России и за рубежом.

Ключевые слова: микрофлюидный чип, лаборатория на чипе, орган на чипе, полимеразная цепная реакция, секвенирование, нуклеиновые кислоты, белки, клетка

Микрофлюидные технологии получили широкое распространение в биологических и медицинских исследованиях, поскольку позволяют: осуществлять прецизионные манипуляции в жидких средах с отдельными биологическими объектами (клетками или молекулами нуклеиновых кислот, белков); имитировать процессы, происходящие в живых организмах; проводить специфические взаимодействия в чрезвычайно малых реакционных объемах. Эти технологии реализуются на микрофлюидном чипе (МФЧ) – компактном устройстве с системой взаимосвязанных микро- или наноразмерных каналов и необходимыми элементами для обеспечения требуемых функций устройства.

МФЧ нашли применение при электрофоретическом разделении неорганических и органических веществ; иммунном анализе; анализе биомолекул, методами масс-спектрометрии; при исследовании биологических объектов (клеток, бактерий и вирусов) в нативном состоянии и т.д. Хотя исследования в микрофлюидике проводятся более 25 лет, но лишь отдельным компаниям удалось наладить выпуск коммерческих приборов [1]. Так, на основе методов «капельной» микрофлюидики выпускаются коммерческие системы для цифровой ПЦР (цПЦР) - QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad) [2] и RainDrop® Digital PCR System (Raindance Tech. Inc.) [3], эмульсионная ПЦР используется в секвенаторе Genome Sequencer FLX (Roche) [4].

Основные научные исследования за рубежом проводятся в Университетах, которые создают микрофлюидные стартапы, а фармацевтические компании и/или фирмы покупают их, если имеется перспективный продукт или технология для внедрения. Примерами успешного применения микрофлюидных технологий являются: капиллярный электрофорез на МФЧ, варианты цифровой микрофлюидики, микрочиповые методы секвенирования. Активную роль в коммерциализации новых технологий играют крупные фирмы, такие как: Agilent (Biotrove, lab901, Biocos), Beckman Coulter (Advalytix, Blue Ocean Biomedical), Life Technologies (Cytonix, Stoke Bio, Ion Torrent, Biotrove), Roche (454, Biomicrosystems, Medingo), PerkinElmer (Caliper, Evotec Technologies), Bio-Rad (Quantalife, Digital PCR Technology), Becton&Dickinson (Handlylab), GE Healthcare (Biacore) и др. (в скобках приведены технологии, приобретенные компаниями и реализованные в коммерческих продуктах). Эксперты полагают, что микрофлюидные платформы являются перспективной основой для создания приборов нового поколения для «персональной» медицины или диагностики на месте события («Point of Care»). Сравнительно новым направлением является разработка систем «орган-на-чипе» («Organ-on-a-Chip»), позволяющих имитировать работу органов человека [5]. Технологии изготовления «человеческих органов-на-чипе» («Human Organs-on-Chip») и тканевой инженерии («tissue-engineered human organ construct») в сочетании с методами культивирования клеток позволяют проводить уникальные исследования в области системной биологии. Физиологически реалистичные «живые» системы («micro-Human» и «milli-Human»), функционирующие от нескольких недель до месяцев используются для решения важных задач в Науках о жизни, для оценки эффективности применения препаратов при разработке потенциальных контрмер при биологических и химических угрозах [6] и т.д.

В новейших разработках систем секвенирования, цифровой ПЦР, систем для тестировании диагностических и терапевтических подходов в медицине, для оценки эффективности лечения, изучения безопасности косметических и других средств используются преимущественно микрофлюидные технологии.

Среди основных направлений развития микрофлюидных технологий для биологических и медицинских исследований следует выделить разработки: а) интегрированных систем (для проведения полного автоматизированного и контролируемого анализа/синтеза или отдельных стадий – «Lab-on-a-chip», «micro Total Analysis System»); б) «дешевых» микроустройств (полимерные микрочипы, «бумажные» микрочипы и т.д.) и специализированных приборов для экспресс- диагностики (системы «Point of Care»); в) устройств имитирующих «живые» системы для биологических, фармакологических, токсикологических исследований («Organ-on-a-chip» и др.); г) микрофлюидных систем, интегрируемых в лабораторные установки или в другие приборы, для решения исследовательских задач (системы «Lab-for-a-chip»).

Уделяется внимание отечественным исследованиям и разработкам в области микрофлюидных технологий.

Литература.
1. Chin C. D., Linder V. , Sia S. K. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices//Lab Chip. 2012.Vol. 12. № 21. P. 18-21.
2. QX200™ Droplet Digital™ PCR System

http://www.bio-rad.com/ru-ru/product/qx200-droplet-digital-pcr-system (дата обращения 07.12.2016)
3. Digital PCR Solution
http://raindancetech.com/digital-pcr-tech/raindrop-digital-pcr-system/ (дата обращения 07.12.2016)
4. GS FLX+ System
http://454.com/products/gs-flx-system/ (дата обращения 07.12.2016)
5. Bhatia S. N., Ingber D. E. Microfluidic organs-on-chips // Nature biotechnology. 2014. Vol. 32. P. 760-772.
6. Esch E. W., Bahinski A., Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery // Nature Reviews Drug Discovery. 2015. Vol. 14. P. 248–260.

UDK 54.07+57.088

MICROFLUIDIC TECHNOLOGIES IN BIOLOGICAL AND MEDICAL RESEARCH

Evstrapov A. A.

Institute for Analytical Instrumentation, Russian Academy of Sciences (IAP RAS), Saint-Petersburg, Russia
190103, St. Petersburg, Rizhskii Pr., 26.
e-mail: an_evs@mail.ru

The current state of development in the field of microfluidic technologies for biological and medical research are reviewed. The main directions of development of these technologies are discussed. The state of development in Russia and abroad are analysed.

Key words: microfluidic chip, lab-on-a-chip, organ-on-a-chip, polymerase chain reaction, sequencing, nucleic acids, proteins, cell

Microfluidic technologies (MFT) are widely used in biological and medical research, as they allow: to carry out precision manipulation in liquid media with individual biological objects (cells or molecules of nucleic acids, proteins); to simulate the processes occurring in living organisms; to carry out specific interactions in very small reaction volumes. These technologies are implemented on a microfluidic chip (MFC) - a compact device with a system of interconnected micro- or nano- sized channels and the necessary elements for its functioning.

MFT found application in the electrophoretic separation of inorganic and organic substances; immunoassay; analyzing biomolecules by mass spectrometry; at the study of biological objects (cells, bacteria and viruses) in the native state, etc. Microfluidics research are have been done for the past 25 years but only a few companies have achieved success in producing of commercial devices [1]. I.g., the production of commercial systems for digital PCR (tsPTsR) - QX200 ™ Droplet Digital ™ PCR System (Bio-Rad) [2] and RainDrop® Digital PCR System (Raindance Tech Inc.) [3] based of technique of «drop» microfluidics, emulsion PCR is used in the sequencer Genome Sequencer FLX (Roche) [4].

The main start up scientific researches are done in the universities. Pharmaceutical companies buy the products or technology if they are perspective. As an example of a successful usage of MFT one main mention: capillary electrophoresis on MFC, variants of digital microfluidics, technique of sequences on a microchip. Such well known companies as Agilent (Biotrove, lab901, Biocos), Beckman Coulter (Advalytix, Blue Ocean Biomedical), Life Technologies (Cytonix, Stoke Bio, Ion Torrent, Biotrove), Roche (454, Biomicrosystems, Medingo), PerkinElmer (Caliper, Evotec Technologies), Bio-Rad (Quantalife, Digital PCR Technology), Becton&Dickinson (Handlylab), GE Healthcare (Biacore) play an important role in commercialization of new technologies (In parentheses are the technology of acquired companies and implemented in commercial products). Experts consider the microfluidic platform as a promising basis for the new generation of the devices for «personalized» medicine or diagnosis at the «Point of Care». The development of systems of «Organ-on-a-Chip» is a relatively new trend. It makes it possible to imitate the functions of human organs [5]. Technology imitation «Human Organs-on-Chip» and «tissue-engineered human organ construct» in combination with the cell culture techniques provide unique researches in the systems biology. Phisiologically-true «alive» systems («micro-Human» and «milli-Human») may function for several weeks and even several months. They are used to solve vital problems of Life Science, to evaluate the efficacy of medicines synthesized as counter-measures to bio- and chemical threats, etc. [6]. Mainly MFT are applied to the latest systems of sequencing systems, digital PCR, systems for testing diagnostic and therapeutic approaches in medicine for evaluate the effectiveness of treatment, the study of the safety of cosmetics and other agents. The main trends in the development of MFT for biological purposes are as follows: a) integrity systems (to make a complete automated analysis and synthesis or certain it stages - «Lab-on-a-chip», «micro Total Analysis System»); b) «cheap» - micro-devices (polymeric microchips, «paper" microchips etc.) and some special express-diagnostic devices (Point of

Care); c) devices imitating « living» systems for biological, pharmacological, toxicological researches («Organ-on-a-chip" etc); d) MFS integrated into lab-devices to meet the needs of the researchers (system «Lab-for-a-chip»).

A number of examples of home microfluidic technologies are considered.

References:
1. Chin C. D., Linder V. , Sia S. K. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices//Lab Chip. 2012.Vol. 12. № 21. P. 18-21.
2. QX200™ Droplet Digital™ PCR System
http://www.bio-rad.com/ru-ru/product/qx200-droplet-digital-pcr-system (date of the application 07.12.2016)
3. Digital PCR Solution
http://raindancetech.com/digital-pcr-tech/raindrop-digital-pcr-system/ (date of the application 07.12.2016)
4. GS FLX+ System
http://454.com/products/gs-flx-system/ (date of the application 07.12.2016)
5. Bhatia S. N., Ingber D. E. Microfluidic organs-on-chips // Nature biotechnology. 2014. Vol. 32. P. 760-772.
6. Esch E. W., Bahinski A., Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery // Nature Reviews Drug Discovery. 2015. Vol. 14. P. 248–260.

УДК 577.1, 577.152.3, 621.793.74, 539.61

ОБНАРУЖЕНИЕ ЯДЕРНОГО АНТИГЕНА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С С ПОМОЩЬЮ ЧИПОВ К АТОМНО-СИЛОВОМУ МИКРОСКОПУ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ АПТАМЕРАМИ

Плешакова Т.О., Байзянова Я.М., Анашкина А.С., Шумов И.Д., Иванов Ю.Д., Арчаков А.И.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия
119121, Москва, ул. Погодинская, дом 10, стр.8
t.pleshakova@gmail.com

Разработан метод регистрации HCV core Ag с помощью чипов к АСМ с иммобилизованными аптамерами. Изготовлены АСМ-чипы с массивом из 24 зон, содержащие различные типы аптамеров. Показана возможность обнаружения HCV core Ag как в буферном растворе, так и в сыворотке крови.

Ключевые слова: АСМ, аптамеры, гепатит С, HCV core Ag

Для решения проблемы ранней диагностики работе предложен подход на основе метода атомно-силовой микроскопии (АСМ). Реализация предлагаемого подхода осуществляется с помощью специальных АСМ-чипов – атомарно ровных подложек с иммобилизованными молекулярными зондами, способных специфически связывать целевые биомаркеры. В процессе инкубации АСМ-чипов в растворе аналита происходит формирование комплексов зонд/целевой белок на поверхности, которые регистрируются методом АСМ. Преимущество предлагаемого подхода – высокая чувствительность регистрирующей системы АСМ. Принципиальная возможность метода АСМ заключается в визуализации отдельных белковых молекул и комплексов. Другим преимуществом является небольшой требуемый объем биологического материала (10 мкл).

В качестве молекулярных зондов в нашей работе использовались аптамеры против HCV core Ag, иммобилизованные в виде массива 24 сенсорных зон. Чувствительность предложенного подхода определена на примере обнаружения HCV core Ag в буферных растворах при концентрации от 10-9 до 10-14 М. Проведены эксперименты по детекции HCV core Ag в сыворотках крови, положительных и отрицательных на содержание маркеров вируса гепатита С. Показана принципиальная возможность обнаружения HCV core Ag с помощью АСМ-чипов с иммобилизованными аптамерами в образцах сыворотки крови.

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики на 2016-2018 годы (СП-4280.2016.4), и гранта РФФИ №15-04-08368 А.

REVELATION OF CORE ANTIGEN OF VIRAL HEPATITIS C USING CHIPS WITH IMMOBILIZED APTAMERS FOR THE ATOMIC FORCE MICROSCOPE

Pleshakova T.O., Bayzanova Ya.M., Anashkina A.S., Shumov I.D., Ivanov Yu.D., Archakov A.I.

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia 119121, Moscow, ul. Pogodinskaya 10 bld. 8
t.pleshakova@gmail.com

Highly sensitive method for registration of HCV core Ag with use of AFM chips with immobilized aptamers was developed. AFM chips containing an array of 24 areas with different types of aptamers were fabricated. The possibility of revelation of HCV core Ag in buffer solution and in the serum was shown.

Key words: AFM, aptamers, hepatitis C, HCV core Ag

To solve the problem of early diagnostics, in the present study an approach based on atomic force microscopy (AFM) was proposed. For the realization of the proposed approach, it is necessary to use specialized AFM chips – atomically smooth supports with immobilized molecular probes, which are able to specifically bind target biomarkers. During incubation of AFM chips in the analyte solution, the formation of probe/(target protein) complexes occurs on the surface; these complexes are subsequently registered by AFM. The advantage of the proposed approach consists in high sensitivity of the registration system of AFM. The principal possibility of the AFM method consists in the visualization of single protein molecules and their complexes. Another advantage is the small volume of biological material (10 uL) required for the analysis.

In our study, aptamers against HCV core Ag, immobilized on the AFM chip surface in the form of an array containing 24 sensor areas, were used. The sensitivity of the proposed approach was determined with the example of revelation of HCV core Ag in buffer solution in the concentration range from 10-9 M to 10-14 M. The experiments on the revelation of HCV core Ag in sera either positive or negative based on the content of hepatitis C virus markers were carried out. The principal possibility of revelation of HCV core Ag using AFM chips with immobilized aptamers was shown.

The study was performed in the framework of Russian Federation President scholarship for young scientists for 2016-2018 (project ID SP-4280.2016.4), and was supported by RFBR Grant No. 15-04-08368 A.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ СКРИНИНГОВОГО КОНТРОЛЯ НА СОДЕРЖАНИЕ МИКОТОКСИНОВ В ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУРАХ

Паскале М., Липполис В., Де Джироламо А., Латтанцио В.М.Т., Логриеко А.Ф.

Научно-исследовательскии институт производства продуктов питания Национального исследовательского совета Италии
Institute of Sciences of Food Production, National Research Council of Italy (ISPA-CNR) Италия, 70126 Бари, ул. Г. Амендола, 122/О, e-mail: michelangelo.pascale@ispa.cnr.it

Ход разработки и проверки надёжности экспресс-методов иммунологического анализа, основанных на поляризации флуоресценции и иммунохроматографии и предназначенных для определения основных микотоксинов, которые могут содержаться в зерновых культурах и продуктах на их основе, будет представлен совместно с описанием применения аптамеров как инновационных агентов биораспознавания микотоксинов.

Ключевые слова: аптамеры, флуоресцентный поляризационный иммуноанализ, иммунохроматография, микотоксины.

Микотоксины представляют собой токсичные продукты обмена веществ грибов, которые могут контаминировать различную сельскохозяйственную продукцию как при выращивании, так и в ходе хранения. Пищевые продукты и корма, заражённые этими природными загрязнителями, могут создавать серьёзную угрозу здоровью человека и животных вследствие их высокой токсичности.

Для надёжности контрольных мероприятий необходимо иметь быстрые и недорогие методы проверки на содержание микотоксинов, надёжность которых установлена в соответствии с гармонизированными официальными правилами. Оценка эффективности аналитических методов в соответствии с международ-

но признанными программами проверки надёжности обеспечивает соответствие требованиям нормативных документов и облегчает торговые операции, позволяя заинтересованным сторонам с уверенностью использовать тот метод анализа, который соответствует поставленной задаче. Разработка, проверка и практическое испытание методов иммуноанализа, предназначенных для быстрого определения микотоксинов, является одной из первоочередных задач Проекта МикоКей (the MycoKey project (http://www.mycokey.eu/)). Этот проект является междисциплинарным проектом ЕС, координируемым Научно-исследовательским институтом производства продуктов питания Национального исследовательского совета Италии (Institute of Sciences of Food Production, National Research Council of Italy (ISPA-CNR)). Цель проекта состоит в разработке эффективных решений, направленных на уменьшение случаев нахождения основных микотоксинов в важных для экономики пищевых и кормовых цепочках.

В презентации будет дан краткий обзор новых работ, выполненных в Институте по разработке и проверке надёжности экспресс-методов иммуноанализа, предназначенных для определения микотоксинов в зерновых культурах и продуктах на их основе. Основное внимание будет уделено внелабораторным методам анализа, позволяющим определять несколько токсинов. В частности, будут представлены показатели эффективности, преимущества и недостатки вновь разработанных методов флуоресцентного поляризационного иммуноанализа и иммунохроматографического анализа (т.е. устройств, основанных на продолльном движении потока, или тест-полосок) при определении основных микотоксинов, встречающихся в зерновых культурах и продуктах на их основе; а также использование ДНК-аптамеров в качестве альтернативных инновационных агентов биораспознавания, применяемых в биосенсорах для обнаружения микотоксинов.

Работы выполнены при поддержке проекта МикоКей (the MycoKey project), финансируемого Инновационно-исследовательской программой Европейского Союза «Горизонт 2020» (Horizon 2020) по Соглашению о предоставлении гранта № 678781

ADVANCES IN SCREENING METHODS FOR MYCOTOXIN DETECTION IN CEREALS

Pascale M., Lippolis V., De Girolamo A., Lattanzio V.M.T., Logrieco A.F.

Institute of Sciences of Food Production, National Research Council of Italy (ISPA-CNR)
via G. Amendola, 122/O, 70126 Bari, Italy
e-mail: michelangelo.pascale@ispa.cnr.it

The development and validation of rapid immunoassays based on fluorescence polarization and immunochromatography for the determination of the major mycotoxins occurring in cereals and cereal-based products will be presented together with the use of aptamers as novel biorecognition agents for mycotoxins.

Key words: aptamers, fluorescence polarization immunoassay, immunochromatography, mycotoxins.

Mycotoxins are toxic fungal metabolites that may contaminate several agricultural products, both in the field and during storage. Foodstuffs and feedstuffs contaminated by these natural contaminants may cause serious risks to human and animal health due to their toxic effects.

For reliable surveillance programs is mandatory the availability of rapid and cost-effective methods for mycotoxin monitoring that should be validated according to harmonized guidelines. Performance evaluation according to internationally recognized validation programs ensures compliance with regulations and facilitates trade, giving the stakeholders more confidence to choose the proper assay with respect to the application. Development, validation and one-site testing of immunoassays for rapid mycotoxin detection is one of the priority tasks of the MycoKey project (http://www.mycokey.eu/), an EU multidisciplinary project coordinated by the Institute of Sciences of Food Production, National Research Council of Italy (ISPA-CNR), aimed to develop smart solutions to reduce the major occurring mycotoxins in economically important food and feed chains.

A brief overview of recent activities carried out at ISPA-CNR on the development and validation of immunoassays for the rapid determination of mycotoxins in cereals and cereal-based products will be presented, with a focus on multi-mycotoxin assays for on-site application. In particular, performances, advantages and limitations of newly developed fluorescence polarization immunoassays and immunochromatographic assays (i.e. lateral flow devices or dipsticks) for the determination of the major mycotoxins occurring in cereals and cereal-based products, as well as the use of DNA aptamers as alternative novel biorecognition agents in biosensor applications for mycotoxins

detection, will be presented.

This work was supported by the MycoKey project which has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under Grant Agreement No 678781

УДК 543-4

ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ ДЛЯ ИММУНОСЕНСОРНЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА

Горячева И.Ю.

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия
410012, Саратов, ул.Астраханская, д. 83 , корп. 1
e-mail: Goryachevaiy@mail.ru

Рассмотрены фотолюминесцентные наночастицы для применения в качестве меток в иммуноанализе. Проведено критическое сравнение различных вариантов меток, особенностей синтеза. модификации, применения.

Ключевые слова: фотолюминесценция; сенсоры; тест-методы; имуноанализ.

Доклад посвящен применению люминесцентных наночастиц точек в качестве биометок в анализе. Рассмотрены свойства наночастиц, определяющие возможность их эффективного использования, методики синтеза, гидрофилизации и модификации, а так же варианты иммунохимических методов на основе фотолюминесцентных наночастиц. Наночастицы используются как класс люминесцентных меток для химического анализа (в первую очередь био- и иммунологического), молекулярной визуализации и биомедицинской диагностики.

В качестве примеров люминесцентных наночастиц рассмотрены наночастицы углерода и полупроводниковые квантовые точки. Люминесцирующие наночастицы углерода представляют собой графеновые наноструктуры, характеризующиеся достаточно большим разбросом по размерам и спектральным характеристикам. Использование подходящих источников углерода и оптимизированных методик синтеза позволяет получать стабильный водный коллоид наночастиц размером несколько нанометров, содержащих на поверхности группы для биоконъгирования.

Люминесцентные квантовые точки представляют собой наночастицы полупроводников нанометрового размера, для повышения интенсивности люминесценции покрытые оболочкой более широкозонного полупроводника. Небольшой размер, яркая люминесценция, фотостабильность и варьируемые спектральные характеристики испускания хорошо подходят для обнаружения одного или нескольких аналитов одновременно с высокой чувствительностью.

Приведены примеры использования люминесцентные квантовых точек в анализе, представлены перспективы для экспресс-тестов, а также для модификации классических методов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 16-13-10195).

PHOTOLUMINESCENT LABELS FOR IMMUNOSENSORS AND RELATED TECHNIQUES

Goryacheva I.Y.

Saratov State University, Saratov, Russia
410012, Saratov, Astrakhanskaya 83
e-mail: Goryachevaiy@mail.ru

Photoluminescence nanoparticles foe application as labels for immunoassay is discussed. The critical comparison of different labels, synthesis routs, modifications and applications is presented.
Key words: photoluminescence; sensors; rapid tests;immunoassay.

The report is devoted to the application of photoluminescent nanoparticles as labels for immunoassay.

Luminescent nanopartiucles' properties, synthesis, hydrophilization and modification with immunoreagents, as well as variants of immunochemical methods for detection of different analytes is discussed. Nanoparticles are applied as a new class of luminescent label for chemical assay (first of all bio assay and immunochemical assay), visualization and diagnostics.

As luminescent nanoparticles carbon dots and semiconductor quantum dots are discussed. Luminescent carbon dots are graphene nanostructures with high variation of spectral characteristics, size and properties. Application of suitable carbon sources and optimized synthesis routs allows researchers to obtain stable water colloid of carbon dots with units of nanometer size and active surface groups for bioconjugation

Luminescent quantum dots are semiconductor nanoparticles, covered with the shell of high band gap semiconductor. Small size, bright luminescence, photostability and variable emission spectral characteristics are applicable for detection of one or multiple analytes with high sensitivity. Initially used for the visualization of histological methods and experiments in vivo, in more recent studies, quantum dots began to apply for the immunoassay in the traditional format of a microtiter plate reader (luminescent solid phase immunoassay) and rapid tests.

Interest in this type of labels for analytical applications can be even greater, because the toxicity (major limitation in the use of quantum dots for in vivo experiments) is not so important for the analysis. Narrow symmetrical luminescence peaks make it possible to use quantum dots as labels for the simultaneous detection of multiple analytes. This feature is particularly important for analysis of more than one analyte in one test zone. The small size allows to combine multiple quantum dots into a single structure. Examples of using of luminescent quantum dots for analysis, prospects for rapid tests, as well as modifications of classical methods are presented.

The work was supported by Russia Science foundation (project 16-13-10195).

РАЗРАБОТКА И ПРОВЕРКА НАДЁЖНОСТИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОБНАРУЖЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ

У. Макбул[1], Д. Сасанья[2], И.Чугтай[1], М. Мумтаз[1], Ф. Раза[3], Ф. Атхар[3]

[1] Ядерный институт сельского хозяйства и биологии, Файзалабад, Пакистан
[2] Международное агентство по атомной энергии (МАГАТЭ), Вена, Австрия
[3] Пакистанский институт инжиниринга и прикладных наук (биологические науки), городок Ядерного института сельского хозяйства и биологии(

Важнейшую роль в обеспечении надёжности результатов анализа играют разработка и проверка надёжности аналитического метода. Достижения последних лет в этих областях показали необходимость применения различных статистических методик при планировании экспериментов и анализе их результатов с целью обеспечения воспроизводимости и повторяемости характеризуемого метода анализа. Это позволит сделать обоснованный вывод о том, что разработанный метод анализа способен давать надёжные и обоснованные данные, а полученные с его помощью результаты могут быть использованы органами государственного регулирования. Процедуры стандартизации с использованием растворов аналитов были заменены на подтверждающие проверки с использованием проб в сочетании со статистическими методами измерения погрешности результатов эксперимента. В настоящей работе авторы представляют обзор процедур контроля качества/обеспечения качества, применяемых для методов анализа на остаточные количества ветеринарных препаратов, в частности антибиотиков и гормонов, в различных до- и после-убойных матриксах, получаемых из животных или продуктов животного происхождения. Эта информация поможет сотрудникам лабораторий обеспечить высокое качество проводимых анализов и повысить уровень уверенности в своих силах при оценке профессиональных навыков в ходе межлабораторных сравнительных испытаний.

ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR VETERINARY DRUGS RESIDUES TESTINGS

U. Maqbool[1], J. Sasanya[2], I. Chughtai[1], M. Mumtaz[1], F. Raza[3], F. Athar[3]

[1]Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), Faisalabad, Pakistan.
[2]International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna Austria.
[3]Pakistan Institute of Engineering and Applied Sciences (Biological Sciences) NIAB Campus.

Method development and its validation are vital for analysts to produce reliable results. Recent advancements in the field require application of different statistical approaches in experimental designs and data analysis to ensure reproducibility and repeatability of analysis, so as to support a claim that an analytical method developed can generate robust and defensible data and the results can be used by regulatory authorities/jurisdictions. Solvent-based standardizations have been replaced with sample-based validations supported with statistical tools to measure uncertainty of experimental errors. In this article, authors present an overview of QC/QA procedures for veterinary drug residues analysis, specifically for antibiotics and hormones, in different ante-mortem/post-mortem matrices of animal and animal derived food. This information will help laboratory staff to ensure quality of their analyses and build their confidence for participation in proficiency testing (PT) through inter-lab comparisons.

УДК 543

ДОСТОИНСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА (ПФИА) КАК ТЕСТ-МЕТОДА НА ТОКСИКАНТЫ

Еремин С.А.

Химический факультет, Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия 119991, Москва, Ленинские Горы, 1
e-mail: eremin_sergei@hotmail.com

Рассмотрены последние достижения по разработке и применению Поляризационного Флуоресцентного ИммуноАнализа (ПФИА). для простого и быстрого определения токсикантов

Ключевые слова: токсиканты, Поляризационный Флуоресцентный ИммуноАнализ

Определение токсичных веществ является одной из актуальных задач во многих областях жизнедеятельности человека. Токсичные вещества должны определяться для целей медицины, пищевой промышленности и охраны окружающей среды. Причем в многочисленных образцах количество токсикантов и их концентрация могут варьироваться в очень широких диапазонах от практически нулевых до мг/мл (г/кг). В связи с этим остро необходимы высокопроизводительные аналитические методы. Такой массовый мониторинг и скрининг на многочисленные токсичные вещества должен проводиться быстро, просто, дешево и при этом желательно проводиться с количественным определением одного или нескольких веществ. Сейчас для определения токсикантов используются в основном хроматографические методы (ГЖХ и ВЭЖХ), но эти методы имеют ряд ограничений (длительность и дороговизна) и не могут быть использованы для массового скрининга. В настоящее время для скрининга все больше находят применение биохимические, и в частности иммунохимические методы, основанные на использовании антител как специфических распознающих биореагентов. Наряду с хорошо распространенным ИммуноФерментным Анализом (ИФА), все более широкое применение находит метод Поляризационного Флуоресцентного ИммуноАнализа (ПФИА). Метод ПФИА заключается в конкуренции определяемого токсичного вещества и вещества меченного флуоресцентной меткой (трейсера) за связывание с ограниченным количеством антител. Метод основан на измерении возрастании поляризации флуоресценции трейсера при его специфическом связывании с антителами в зависимости от концентрации токсиканта. Метод ПФИА довольно прост в постановке и заключается в добавлении аликвоты определяемого вещества (обычно 10-50 мкл) и трейсера к раствору антител, инкубации в течение нескольких минут и измерении поляризации флуоресценции. Общее время анализа не превышает нескольких минут. Еще одним из достоинств ПФИА является его высокая воспроизводимость и производительность, так как к минимуму сведены этапы проведения анализа и исключены ошибки при добавлении реагентов. Более того, метод ПФИА позволяет проводить количественные определения по градуировочному графику, который стабилен и нет необходимости каждый раз проводить калибровку, как в методе ИФА. Метод ПФИА может быть использован для определения в основном низкомолекулярных соединений и чувствительность метода ПФИА на 1-2 порядка ниже, чем в методе ИФА с использованием одних и тех же антител. Еще одним ограничением метода ПФИА является более высокая зависимость от

матрикса образца, чем в методе ИФА, в котором включены несколько стадий промывки и удаления маскирующих веществ. До последнего времени были малодоступны поляризационные флуориметры - приборы для проведения ПФИА. Однако сейчас все больше новых приборов производится, и их стоимость значительно снижена. Так портативные поляризационные флуориметры Сентри-200 стоят около 5000 долларов США, что на 1-2 порядка ниже, чем стоимость хроматографов. В докладе будут рассмотрены последние достижения по разработке новых методик ПФИА для определения токсичных веществ с использованием поликлональных и моноклональных антител. Более детально о определении токсикантов методом ПФИА можно найти в наших обзорах и недавних публикациях.

Благодарности:

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 15-53-46015 СТ_а «Разработка новых иммунных тест-методов для определения нескольких микотоксинов – афлатоксины, охратоксин А, дезоксиниваленол и фумонизин В1»

Литература.
Еремин С.А. Поляризационный флуороиммуноанализ физиологически-активных веществ. Микроэлементы в медицине, 6(3), 44-50 (2005).
David S. Smith and Sergei A. Eremin. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. Anal. Bioanal. Chem., 391(5), 1499-1507 (2008).
Lidia Oberleitner, Sergei A. Eremin, Andreas Lehmann, Leif-Alexander Garbe, Rudolf J. Schneider. Fluorescence Polarization Immunoassays for Carbamazepine – Comparison of Tracers and Formats. Anal. Methods, 7, 5854-5861 (2015).
Pinong Huang, Suqing Zhao, Sergei A. Eremin, Shengwu Zheng, Dan Lai, Yingshan Chen and Bin Guo. A fluorescence polarization immunoassay method for detection of the bisphenol A residue in environmental water samples based on a monoclonal antibody and 4'-(aminomethyl)fluorescein. Anal. Methods, 7(10), 4246-4251 (2015).
Beloglazova N.V., Eremin S.A. Rapid screening of aflatoxin B1 in beer by fluorescence polarization immunoassay. Talanta, 142, 170-175 (2015).
N.V. Beloglazova, P.S. Shmelin, S.A. Eremin. Sensitive immunochemical approaches for quantitative (FPIA) and qualitative (lateral flow tests) determination of gentamicin in milk. Talanta, 149, 217-224 (2016).
Ming Ma, Mo Chen, Lu Feng, Hongjie You, Rui Yang, Anna Boroduleva, Xiude Hua, Sergei A. Eremin, Minghua Wang. Fluorescence Polarization Immunoassay for Highly Efficient Detection of Imidaclothiz in Agricultural Samples. Food Anal. Meth., 9(9), 2471-2478 (2016).
Бородулева А.Ю., Еремин С.А. Определение 2,4-Дихлорфеноксиуксусной кислоты в зерне хлебных злаков методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Журн. Аналит. Химии, 71(9), 988-994 (2016).

ADVANTAGES AND LIMITATIONS FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY (FPIA) AS A TEST METHOD ON THE TOXICANTS

Eremin S.A.

Faculty of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
119991, Moscow, Lenin Hills, 1
e-mail: eremin_sergei@hotmail.com

Recent advances in the development and application of fluorescence polarization immunoassay (FPIA) for a simple and quick determination of toxicants

Key words: toxicants, fluorescence polarization immunoassay

Determination of toxic substances is one of the most pressing problems in many areas of human activity. Toxic substances should be defined for the purposes of medicine, food industry and environmental protection. Moreover, the amount of toxicants and their concentration in many samples may vary in a very wide range from almost zero to mg/mL (g/kg). In connection with this high analytical methods are desperately needed. Such a massive screening and monitoring of many toxic substances should be carried out quickly, easily, cheaply, and it is desirable to be carried out by quantifying the one or more substances. Now for determining toxicants used mainly chromatographic techniques (GLC and HPLC), but these methods have limitations (duration and high cost) and can not be used for mass screening. Currently, screening is increasingly find use biochemical, and in particular immunochemical methods based on the use of antibodies as a specific recognition bioreagents. Along with good common enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), more and more widely used method is fluorescence polarization immunoassay (FPIA). FPIA method is determined in

competition toxic substances and fluorescently labeled substance (tracer) for binding with a limited amount of antibody. The method is based on measuring the increase in fluorescence polarization of a tracer by its specific binding to the antibodies, depending on the pollutant concentration. FPIA method is quite simple and is directed to adding an aliquot of the analyte (typically 10-50 uL) and a solution of the tracer and antibody, incubating for several minutes, and measurement of the fluorescence polarization. Total analysis time does not exceed several minutes. Another of the advantages FPIA is its high reproducibility and productivity, as reduced to a minimum of steps and analysis errors may occur by the addition of reagents. Moreover, the FPIA method allows the quantitative determination of calibration curve, which is stable and there is no need to calibrate each time as in the ELISA method. FPIA method can be used to determine the mainly low molecular weight compounds and the sensitivity of FPIA in 1-2 orders of magnitude lower than the ELISA method using the same antibodies. Another limitation FPIA method is a high dependence on the matrix of the sample than in the ELISA method, which includes several steps of washing and removal of masking agents. Until recently, it has been in-accessible Polarized Fluorimeter - devices for FPIA. But now more and more new devices is made, and the cost is significantly reduced. So, portable Polarized Fluorimeter Sentry-200 cost about $ 5,000, which is 1-2 orders of magnitude lower than the cost of chromatographs. The report of recent advances in developing new FPIA techniques will be discussed for the determination of toxic substances using polyclonal and monoclonal antibodies. More details on the determination of toxicants FPIA method can be found in our reviews and recent publications.

Acknowledgements

The research was supported by Grant of Russian Foundation for Basic Research (15-53-46015) “Development of a new immunoassay test-methods for determination of several mycotoxins - aflatoxins, ochratoxin A, deoxynivalenol and Fumonisin B1”

References:

Eremin SA Fluorescence polarization immunoassay for physiologically active substances. Micronutrients in Medicine, 6(3), 44-50 (2005).

David S. Smith and Sergei A. Eremin. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. Anal. Bioanal. Chem., 391(5), 1499-1507 (2008).

Lidia Oberleitner, Sergei A. Eremin, Andreas Lehmann, Leif-Alexander Garbe, Rudolf J. Schneider. Fluorescence Polarization Immunoassays for Carbamazepine – Comparison of Tracers and Formats. Anal. Methods, 7, 5854-5861 (2015).

Pinong Huang, Suqing Zhao, Sergei A. Eremin, Shengwu Zheng, Dan Lai, Yingshan Chen and Bin Guo. A fluorescence polarization immunoassay method for detection of the bisphenol A residue in environmental water samples based on a monoclonal antibody and 4'-(aminomethyl)fluorescein. Anal. Methods, 7(10), 4246-4251 (2015).

Beloglazova N.V., Eremin S.A. Rapid screening of aflatoxin B1 in beer by fluorescence polarization immunoassay. Talanta, 142, 170-175 (2015).

N.V. Beloglazova, P.S. Shmelin, S.A. Eremin. Sensitive immunochemical approaches for quantitative (FPIA) and qualitative (lateral flow tests) determination of gentamicin in milk. Talanta, 149, 217-224 (2016).

Ming Ma, Mo Chen, Lu Feng, Hongjie You, Rui Yang, Anna Boroduleva, Xiude Hua, Sergei A. Eremin, Minghua Wang. Fluorescence Polarization Immunoassay for Highly Efficient Detection of Imidaclothiz in Agricultural Samples. Food Anal. Meth., 9(9), 2471-2478 (2016).

Boroduleva A. Yu., Eremin S. A. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in cereals by fluorescence polarization immunoassay. J. Anal. Chem., 71(9), 949-954 (2016). In Eng. DOI: 10.1134/S1061934816090045

УДК 543.068.8

СИНТЕЗ И ПРИМЕНЕНИЕ МИКРО- И НАНОСФЕР ПМО ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ

Бессонов О.И., Чернышова В.Н., Карасева Н.А., Фарафонова О.В., Ермолаева Т.Н.

ФГБОУ ВО «Липецкий государственный технический университет», Липецк, Россия
398055, Липецк, ул. Московская, д. 30, кафедра химии
e-mail: farafonova.ov@mail.ru

Разработаны пьезоэлектрические сенсоры на основе микро- и наночастиц полимеров с молекулярными отпечатками (ПМО) для определения следовых концентраций ractопамина, сальбутамола, пенициллина

G и ампициллина в пищевой продукции в формате псевдоиммуноанализа.

Ключевые слова: пьезокварцевый сенсор, полимеры с молекулярными отпечатками,

Обоснованы условия получения монодисперсных частиц с фиксированным числом молекулярных отпечатков ректопамина, сальбутамола, пенициллина G и ампициллина методами преципитации и микроэмульсионной полимеризации. Показано, что ультразвуковая обработка способствует уменьшению диаметра частиц и повышает их однородность. Оценена возможность использования нано- и микросфер ПМО для создания распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора для определения лекарственных препаратов. Предложено формирование распознающего слоя проводить методом «spin-coating» из растворов ПМО в тетрагидрофуране, содержащих цианоакриловый эфир. С применением метода пьезокварцевого микровзвешивания установлена степень импринтинга, удельная концентрация молекулярных отпечатков на поверхности электрода сенсора при первичном и повторном связывании. Оптимизированы составы регенерирующих растворов. Изучены условия применения наночастиц ПМО в пьезоэлектрических сенсорах для определения лекарственных препаратов в прямом и конкурентном форматах анализа. Сенсоры апробированы при анализе пищевой продукции и биологических жидкостей.

UDC 543.068.8

THE SYNTHESIS AND THE APPLICATION OF MICRO- AND NANOSPHERES OF MIPS FOR THE DETERMINATION OF DRUGS VIA PIEZOELECTRIC SENSORS

Bessonov O. I., Chernyshova V. N., Karaseva N. A., Farafonova O. V., Ermolaeva T. N.

Lipetsk State Technical University, Lipetsk, Russia
Department of chemistry, Moskovskaya 30, Lipetsk, 398055,
e-mail: farafonova.ov@mail.ru

Piezoelectric sensors on the basis of micro- and nanoparticles of polymers with molecular imprints (MIP) were developed for the determination of trace concentration of ractopamine, salbutamol, penicillin G and ampicillin in food products in a pseudo-immunoanalysis format.

Key words: piezoelectric sensor, polymers with molecular imprints,

The conditions of the synthesis of monodisperse particles with the fixed number of molecular imprints of ractopamine, salbutamol, penicillin G and ampicillin via the methods of precipitation and microemulsion polymerization were proved. It was shown that the ultrasonication makes it possible to decrease the diameter of particles and increase their uniformity. The possibility of the application of nano - and microspheres of MIPs for the formation of the recognizing layer of the piezoelectric sensor for the determination of drugs was estimated. The formation of the recognizing layer from the MIPs solutions in tetrahydrofuran and cyanoacrylate ether by the spin-coating method was offered. The degree of imprinting, the specific concentration of molecular imprints on the surface of the sensor's electrode at initial and repeated binding were established by the application of quartz crystal microbalance. The compositions of the regenerating solutions were optimized. The conditions of the application of MIP's nanoparticles in piezoelectric sensors for the determination of drugs in the direct and competitive formats of the analysis were studied. Sensors were tested in the analysis of food products and biological liquids.

УДК 543.068.8: 543.63

ПРИМЕНЕНИЕ МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ИММУНОСЕНСОРОВ

Фарафонова О.В., Шукшина Е.И., Ермолаева Т.Н.

ФГБОУ ВО «Липецкий государственный технический университет», Липецк, Россия
398055, Липецк, ул. Московская, д. 30, кафедра химии
e-mail: farafonova.ov@mail.ru

Разработаны высокочувствительные пьезоэлектрические иммуносенсоры для селективного определения антибиотиков (левофлоксацина, ципрофлоксацина) и ректопамина в пищевой продукции. Изучена возможность увеличения удельной поверхности сенсора за счет использования распознающего слоя на основе многостенных углеродных нанотрубок.

Ключевые слова: пьезоэлектрический иммуносенсор, распознающий слой, углеродные нанотрубки.

Показано, что применение многостенных углеродных нанотрубок для формирования распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора приводит к увеличению чувствительности определения ряда фармацевтических препаратов (левофлоксацина, ципрофлоксацина и ректопамина) за счет существенного увеличения удельной поверхности и концентрации активных сайтов связывания, что позволяет проводить определение низкомолекулярных соединений как в конкурентном, так и в прямом формате иммуноанализа, способствует расширению линейного диапазона определяемых содержаний и снижает предел обнаружения.

Диапазон определяемых содержаний в прямом формате иммуноанализа составляет для ректопамина (нг/мл) 0,1 - 25 и в конкурентном формате 0,2 – 23; 0.1 – 30; 5,0 – 130 для ректопамина, левофлоксацина и ципрофлоксацина соответственно.

UDC 543.068.8: 543.63

APPLICATION OF MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES IN ORDER TO INCREASE DETERMINATION SENSITIVITY OF PHARMACEUTICALS BY PIEZOELECTRIC IMMUNOSENSOR

Farafonova O.V., Shukshina E.I., Ermolaeva T.N.

«Lipetsk State Technical University», Lipetsk, Russia
398055, Lipetsk, st. Moscow, 30, Department of Chemistry
e-mail: farafonova.ov@mail.ru

Developed highly sensitive piezoelectric immunosensors for selective determination of antibiotics (levofloxacin, ciprofloxacin) and ractopamine in food products. Studied the possibility of increasing the sensor specific surface area by mean of a recognizing layer on the basis of multi-walled carbon nanotubes.

Key words: piezoelectric immunosensor, recognizing layer, carbon nanotubes.

It is shown that the use of multi-walled carbon nanotubes to form the piezoelectric sensor recognizing layer leads to increase determination sensitivity of a number of pharmaceutical drugs (levofloxacin, ciprofloxacin and ractopamine) due to a significant increase in specific surface area and the concentration of active binding sites, which allows determination of low molecular weight compounds in a competitive, and in direct immunoassay format. That enhances the linear range of substance content determination and reduces the detection limit.

The range of substance content determination in a direct immunoassay format for ractopamine (ng / ml) is 0.1 - 25 and in a competitive format 0.2 - 23; 0.1 - 30; 5.0 - 130 for ractopamine, levofloxacin and ciprofloxacin, respectively.

УДК 543.94

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЕ (БИО)СЕНСОРЫ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Карякин А.А., Карякина Е.Е.

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
119991, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3
e-mail: aak@analyt.chem.msu.ru

Показана важность конденсата выдыхаемого воздуха для неинвазивной медицинской диагностики в ключе гипоксии, а также гипо-/гипергликемии. Представлен неивазивный монитор состояния гипоксии на основе анализа пота при помощи лактатных биосенсоров со значительно повышенной (до 0.1 М) верхней границей определяемых содержаний.

Ключевые слова: неинвазивная диагностика; электрохимические биосенсоры; электроанализ; Берлинская лазурь; конденсат выдыхаемого воздуха.

Неинвазивная диагностика является наиболее перспективной областью клинической диагностики, поскольку она не допускает не только повреждения стенок кровеносных сосудов, но и нарушения целостности кожных покровов. Это делает процедуру анализа нетравматичной, а также исключает риск инфицирования. Несмотря на огромные усилия в этой области, даже в отношении диабета (детекция глюкозы в крови) проблемы неинвазивной диагностики нельзя считать решенными. Неприменимость физических (спектральных) методов для неинвазивной детекции ключевых метаболитов крови (например, глюкозы) диктует необходимость использования для этой цели химического анализа.

Фундаментальной проблемой применения химического анализа для целей неинвазивной диагностики является поиск экскреторных жидкостей, концентрация ключевых метаболитов в которых коррелировала бы с их содержанием в крови. В докладе будет обсуждена применимость для диагностики неинвазивно собираемых конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) и пота.

Нами уже было установлено, что повышение концентрации лактата в крови при гипоксии вызывает соответствующее увеличение содержания лактата в поте. Однако концентрация лактата в поте в 10 раз больше, чем в крови, что делает невозможным его прямой анализ при помощи существующих лактатных биосенсоров. Более того, пот содержит огромный набор пептидов, инактивирующих поверхность платины, на основе которой работают биосенсоры коммерческих лабораторных анализаторов.

Для исключения отравления катализатора при анализе неразбавленного пота нами традиционно был использован наилучший электрокатализатор восстановления пероксида водорода на основе берлинской лазури. Электрокатализатор также существенно улучшает аналитические характеристики биосенсоров, поскольку и по активности, и по селективности превосходит обычно используемую платину на три порядка.

Лактатный биосенсор со значительно повышенным верхней границей определяемых концентраций (до 0.1 М) для анализа неразбавленного пота был разработан на основе инженерии фермента лактат оксидазы при иммобилизации из водно-органических сред с высоким содержанием органического растворителя [1]. Для понижения константы образования фермент-субстратного комплекса активный центр фермента экранировался отрицательно заряженным полиэлектролитом. Таким образом, был создан неинвазивный монитор состояния гипоксии.

В докладе будет также обсуждена диагностическая ценность конденсата выдыхаемого воздуха в отношении создания неинвазивного глюкометра.

Литература.
1. Pribil, M.M.; Laptev, G.U.; Karyakina, E.E.; Karyakin, A.A. Noninvasive Hypoxia Monitor Based on Gene-Free Engineering of Lactate Oxidase for Analysis of Undiluted Sweat. Analytical Chemistry 86 (2014) 5215-5219.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Российскому Научному Фонду за финансовую поддержку, грант № 16-13-00010.

ADVANCED (BIO)SENSORS FOR NON-INVASIVE DIAGNOSTICS

Karyakin A.A., Karyakina E.E.

Chemistry faculty of M.V. Lomonosov Moscow State University
119991, Leninskie gory, 1, build. 3, Moscow, Russia.
e-mail: aak@analyt.chem.msu.ru

The diagnostic values of exhaled breath condensate concerning hypoxia and hypo-/hyperglycemia are discussed.

On the base of lactate oxidase biosensor with remarkably increased upper detection limit (up to 0.1 M) we developed non-invasive hypoxia monitor suitable for analysis of undiluted sweat.

Key words: non-invasive diagnostics; electrochemical biosensors; electroanalysis; Prussian Blue; exhaled breath condensate.

Non-invasive diagnostics is one of the most important fields of clinical analysis, because it presumes that not only blood vessels, but even skin surface cannot be broken, completely avoiding both infection and trauma of patients. Despite great efforts put in this field, even for diabetes (detection of glucose concentration in blood) the problems with non-invasive diagnostics is not solved. The lack of success in application of physical (spectroscopy) methods for non-invasive detection of key blood metabolites (glucose, for example) provides the use of chemical analysis.

Fundamental problem is a search for excretory liquids containing key metabolites in concentrations correlating with their blood concentrations. Here the diagnostic values of the non-invasively collected sweat and exhaled breath condensate (EBC) are discussed.

We have already demonstrated the diagnostic value of sweat relative hypoxia: relative sweat lactate level is increasing in case of hypoxia and correlates with the rise of lactate in blood. However, lactate content in sweat is approximately 10 times higher than in blood, making impossible the use of conventional lactate biosensors. Moreover, sweat contains a number of peptides, which are known to inactivate platinum surface, hence, analysis of undiluted sweat is impossible using conventional Pt-based first generation biosensors.

To avoid poisoning of the transducer surface we use Prussian Blue as the most advantageous electrocatalyst for hydrogen peroxide reduction. Since all crystalline layers of the Prussian Blue are involved in electrocatalysis, it is impossible to observe any effect of blocking an outer surface of the transducer. In addition, Prussian Blue is known to be (i) 1000 times more active in hydrogen peroxide reduction and oxidation providing the correspondingly three orders of magnitude improved sensitivity of the resulting sensors and biosensors, and (ii) 1000 times more selective allowing hydrogen peroxide detection by its reduction in the presence of oxygen. This completely avoids the problem of reductants known to produce parasitic signal on platinum electrodes.

Lactate biosensor with the remarkably increased upper detection limit suitable for analysis of undiluted sweat has been elaborated by engineering of the enzyme lactate oxidase upon its immobilization from water–isopropanol mixtures with the high (90%) content of organic solvent [1]. To decrease the enzyme binding constant the substrate binding sites in its active center has been shielded with negatively charged polyelectrolyte. The elaborated biosensor is characterized by the calibration graph shifted for 2 orders of magnitude toward high analyte concentrations. The biosensor displays stable response during 4 h of continuous operation. The achieved analytical performance characteristics allow the monitoring of lactate content in undiluted sweat collected directly from the skin surface.

The diagnostic values of exhaled breath condensate concerning hypoxia and hypo-/hyperglycemia are also discussed.

References:
1. M. M. Pribil, G. U. Laptev, E. E. Karyakina and A. A. Karyakin, Analytical Chemistry 86 (2014) 5215-5219.

Acknowledgments
Financial support through Russian Science Foundation grant # 16-13-00010 is greatly acknowledged.

УДК 621.015.1

РАЗРАБОТКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ АНАЛИЗА КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ФОРМ ЦИТОХРОМОВ P450 ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ МЕТАБОЛИЗМА И ПОИСКА ПРОФИЛЕЙ ИНГИБИТОРОВ И СУБСТРАТОВ В КАЧЕСТВЕ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Шумянцева В.В.[1], Булко Т.В.[1], Кузиков А.В.[1], Масамрех Р.А.[1], Усанов С.А.[2], Бернхардт Р.[3], Арчаков А.И.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), 119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10
[2]Институт биоорганической химии НАН, Минск, Республика Беларусь
[3]Институт биохимии Саарлендского университета, Германия, 66123 Саарбрюккен
e.mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Разработаны методы электроанализа клинически значимых изоформ цитохромов P450 для исследования субстрат/ингибиторного потенциала цитохромов P450, для исследования термодинамики, стехиометрии, эффективности электрокатализа, а также для изучения лекарственной интерференции.

Ключевые слова: цитохромы P450, ферментные электроды, биосенсоры, гемопротеины

Ключевая роль I фазы биотрансформации ксенобиотиков, в том числе и лекарственных препаратов, принадлежит гем-содержащим ферментам суперсемейства цитохрома P450 (CYP), входящих в состав монооксигеназной системы. Электроанализ каталитической активности цитохромов P450 позволил разработать систему скрининга потенциальных субстратов и/или ингибиторов этого класса гемопротеинов, а также биологически активных соединений, модулирующих каталитические функции белка. Электрокаталитическая активность цитохромов P450 млекопитающих 2B4, 1A2, 3A4, 51b1 11A1 (P450scc), 2C9, 2D6, 17A1, и бактериальных цитохромов P450 102A1 (BM3), 260A1, 109C1, 109C2, 109D1 была изучена с использованием различных типов модифицированных электродов. Анализ продуктов электрокаталитических реакций был проведен методом спектрального анализа и масс-спектрометрии. Лекарственная интерференция субстратов CYP3A4, CYP2C9 и CYP2D6 (диклофенак, эритромицин, тестостерон) и метаболических антиоксидантных препаратов мексидол, этоксидол, цитохром с, L-карнитин, липоевая кислота, таурин, антигипоксант милдронат была исследована с помощью электроанализа.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

THE DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR SYSTEMS OF CLINICALLY IMPORTANT CYTOCHROMES P450 FOR METABOLISM MODELLING AND SCREENING SUBSTRATE/INHIBITOR POTENCY AS NEW POTENTIAL DRUGS

Shumyantseva V.V.[1], Bulko T.V.[1], Kuzikov A.V.[1], Masamrech R.A.[1], Usanov S.A.[2], Bernhardt R.[3], Archakov A.I.[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Street, 10, Moscow 119121, Russia
[2]Institute of Bioorganic Chemistry of NAS, Minsk, Belarus
[3] Institute for Biochemistry, Saarland University, Saarbrucken 66123, Germany
e.mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Cytochrome P450-electrode systems have been adopted as label-free third generation sensors for investigations of substrate/inhibitor potential, thermodynamic parameters, stoichiometry, electro catalytic efficiency, drug metabolism profiling, coupling efficiency and drug/drug interaction

Key words: cytochromes P450, enzyme electrodes, biosensors, hemeproteins, drug/drug interaction

Cytochromes P450 (CYPs) are membrane-bound, heme-containing terminal oxidases that are crucial for the metabolic activation or inactivation of xenobiotics. Electrochemical cytochromes P450 (CYPs) systems were applied to studying the catalytic activity, drug metabolizm profiling, searching of substrate/inhibitor potential of newly synthesized chemicals, modulating of coupling efficiency, drug/drug interactions, the stoichiometry and the thermodynamics of the catalytic cycle. Electrocatalytic activity of mammalian cytochromes P450 2B4, 1A2, 3A4, 51b1 (sterol-14α-demethylase Mycobacterium tuberculosis CYP51b1), 11A1 (P450scc), 2C9, 2D6, 17A1, and bacterial 102A1 (BM3), 260A1, 109C1, 109C2 and CYP109D1 were studied using different types of modified electrodes. The CYP260A1 enzyme from the myxobacterium Sorangium cellulosum So ce56 demonstrated electrocatalytic properties towards oxygen and C-19 steroid (androstenedione), and CYP109D1 demonstrated electrocatalytic properties towards myristic acid and β-ionone. CYP109D1-depended electrocatalytic hydroxylation of the myristic acid was confirmed by mass-spectrometry after electrolysis at controlled working electrode potential. The drug/drug interactions for mammalian CYP3A4, CYP2C9 and CYP2D6 were studied for diclofenac, erythromycin, testosterone, metabolic antioxidant preparations such as ethoxidol (2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine malate), mexidol (2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate), cytochrome c, L-carnitine, lipoic acid, taurine, antihypoxant mildronate.

This investigation was performed within the framework of the Program for Basic Research of Russian State Academy of Sciences for 2013-2020.

УДК 544.653.2; 543.645.6

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ СЕНСОРНЫХ И БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ

Супрун Е.В., Жаркова М.С., Веселовский А.В., Радько С.П., Хмелёва С.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия
Россия 119121, Москва, ул. Погодинская, 10/8, lenasuprun@mail.ru

Белки и пептиды, состоящие только из аминокислотных остатков и не имеющие кофакторов, являются потенциально электрохимически активными молекулами. Их способность окисляться на поверхности твердых электродов за счет электроактивных групп аминокислотных остатков создаёт основу для разработки широкого спектра перспективных сенсорных и биосенсорных систем.

Ключевые слова: электрохимия, сенсор, белок, пептид, аминокислота.

Известно, что остатки только шести аминокислот могут участвовать в реакциях электрохимического окисления белковых и пептидных молекул на твердых электродах. Окисление аминокислотных остатков Тир, Трп и Цис происходит при потенциалах 0.6–0.7 В, в то время как окисление остатков Гис, Цис-Цис и Мет требует потенциалов, близких или превышающих 1 В (отн. Ag/AgCl). В случае белков, регистрируемый сигнал прямо пропорционален поверхностной плотности электроактивных остатков, а не их числу в полипептидной цепи. Основной вклад в сигнал электроокисления вносят аминокислотные остатки, чьи электроактивные группы, локализованные на поверхности молекулы, ориентированы по направлению к поверхности электрода. Прогнозирование электрохимической активности белков и пептидов возможно на основе анализа их пространственной структуры методами биоинформатики и компьютерного моделирования. Прямое электрохимическое окисление может быть использовано для получения информации об олигомеризации и денатурации белка, аминокислотных заменах и пост-трансляционных модификациях в белках и пептидах, образовании белковых комплексов и агрегатов, что открывает возможности для конструирования разнообразных сенсорных и биосенсорных систем различного назначения.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

DIRECT ELECTROCHEMICAL OXIDATION OF PROTEINS AND PEPTIDES AS BASIS FOR DEVELOPMENT OF SENSOR AND BIOSENSOR SYSTEMS

Suprun E.V., Zharkova M.S., Veselovsky A.V., Radko S.P., Khmeleva S.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V.

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia
Pogodinskaya Street, 10/8, Moscow, 119121 Russia
lenasuprun@mail.ru

Proteins and peptides consisting only of amino acid residues and has no cofactors are potentially electrochemically active molecules. Their ability to oxidize on the surface of solid electrodes due to the electroactive groups of amino acid residues forms the basis for the development of a wide range of advanced sensor and biosensor systems.

Key words: electrochemistry, sensor, protein, peptide, amino acid.

It is known that only six amino acid residues can take part in electrochemical oxidation reactions of protein and peptide molecules on solid electrodes. The oxidation of amino acid residues Tyr, Trp, and Cys occurs at potentials of 0.6–0.7 V while that of His, Cys-Cys, and Met residues requires potentials close to or exceeding 1 V (vs. Ag/AgCl). In the case of proteins, the measured signal is directly proportional to the surface density of electroactive residues but not to their number in polypeptide chain. Amino acid residues whose electroactive groups localized on the molecular surface are oriented toward the electrode surface contribute the most to the electrooxidation signal. The electrochemical activity of proteins and peptides can be predicted based on the analysis of their 3D structure by methods of bioinformatics and computer modelling. The direct electrochemical oxidation may be employed to gain the information about protein oligomerization and denaturation, amino

acid substitutions and post-translational modifications in proteins and peptides, the formation of protein complexes and aggregates, thus opening opportunities for constructing a variety of sensor and biosensor systems for diverse applications.

This work was financially supported by the Program for Basic Research of Russian State Academy of Sciences for 2013–2020.

615.074:614.7

СЕЛЕКЦИЯ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО И ГРУППОВОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Буркин М.А., Гальвидис И.А.

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия
105064, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
e-mail: burma68@yandex.ru

Разработаны методы определения ряда антибактериальных соединений (макролиды, гликопептиды, фторхинолоны) способные с помощью одних антител как избирательно распознавать отдельные аналиты, так и выявлять несколько представителей группы соединений.

Ключевые слова: иммуноанализ; селективность; групповая специфичность;

Разнообразие лекарственных и других биоактивных соединений, используемых в медицине, сельском хозяйстве, биотехнологии, поступающих из внешней среды или с пищей, в силу своей физиологической активности могут быть небезопасны для здоровья человека и должны контролироваться. Для осуществления лекарственного и экологического мониторинга, допинг-контроля и судебно-медицинской экспертизы, контроля безопасности продуктов питания, ветеринарного и санитарного контроля, а также в научных исследованиях крайне востребованы методы, позволяющие быстро и просто выявлять многочисленные субстанции в самых разнообразных объектах исследования. На протяжении нескольких десятилетий применение антител позволило создавать чувствительные, специфичные методы, пригодные для масштабных скрининговых исследований в упомянутых областях деятельности. С учетом современных тенденций все большее распространение получают методы, позволяющие в одном тесте регистрировать сразу несколько аналитов, а также варианты иммуноанализа с групповой специфичностью, предназначенные для выявления в объекте любого из группы соединений с близкой химической структурой. Тем не менее, в ряде случаев необходимость использования селективного анализа для отличия анализируемого соединения от структурно родственных соединений может диктоваться его особой активностью, токсичностью или особенностями использования. Таким образом, практически значимыми являются как селективные тесты, так и обладающие групповой специфичностью. Однако, создание таких тестов требует индивидуального подхода для получения и селекции антител, которые обладают разной эпитопной специфичностью. Для селекции антител к индивидуальным и/или общим структурным фрагментам молекул (эпитопам) лекарственных соединений мы выработали подход, позволяющий избирательно задействовать в реакции с антигеном только антитела необходимой эпитопной специфичности. Благодаря презентации/экранированию значимых эпитопов при синтезе конъюгированных антигенных конструкций на основе лекарственных соединений с антибактериальной активностью (макролидов, гликопептидов, фторхинолонов), оказалось возможным использовать одни и те же антитела, как для избирательного определения, так и группового иммуноанализа [1-4]. Преимущества и ограничения данного подхода обсуждаются в докладе.

Литература.

1. Burkin M. Enzyme-linked immunosorbent assays of fluoroquinolones with selective and group specificities // Food Agric. Immunol. 2008. Vol. 19, № 2. P. 131-140.
2. Burkin M.A., Galvidis I.A. Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody-based immunoassay // Food Chem. 2012. V. 132. № 2. P. 1080-1086.
3. Burkin M.A., Galvidis I.A. Hapten modification approach for switching immunoassay specificity from selective to generic // J. Immunol. Methods. 2013. V. 57. P. 60-67.
4. Burkin M. A., Galvidis I. A. Simultaneous and differential determination of drugs and metabolites using the same antibody: difloxacin and sarafloxacin case // Anal. Methods. 2016. Vol. 8. P. 5843-5850.

ANTIBODY SELECTION APROACH FOR SELECTIVE AND GROUP DETERMINATION OF THERAPEUTIC AGENTS

Burkin M.A., Galvidis I.A.

I.Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia
Malyj Kazionnyj per. 5a, Moscow, 105064, Russia;
e-mail: burma68@yandex.ru

The methods for determination of a number of antibacterial compounds (macrolides, glycopeptides, fluoroquinolones) were developed. Using the single antibody they were capable to recognize a certain compound selectively, as well to detect multiple analytes from the group.

Key words: immunoassay; selectivity; group specificity;

A great variety of therapeutic agents and other bioactive compounds used in medicine, agriculture, biotechnology, coming from the environment or in food may be dangerous for human health because of its physiological activity, so they should be monitored. The methods capable of fast and simple detection of multiple substances in various test subjects are in high demand for the therapeutic drug and environmental monitoring, doping control and forensics, food safety control, veterinary and sanitary control, as well as in research. For several decades, the use of antibodies allowed to create sensitive, specific methods suitable for high throughput screening in mentioned areas. The current trends is that the more common methods become those that capable to register multiple analytes in one test, as well group-specific immunoassays designed to detect anyone from the group of compounds with similar chemical structures in the object. Nevertheless, in some cases the selective analysis is required to distinguish analyte from structurally related compounds; it may be dictated by its particular activity, higher toxicity or features of application. So, selective tests as well as tests performing group specificity are practically significant. However, when developing such assays an individual approach is required to generate and select antibodies with different epitope specificity. For the selection of antibodies to the individual and/or common structural fragments of molecules (epitopes) we have developed an approach of selective involvement of the required epitope specific antibody in reaction to the antigen. By means of presentation and/or shielding of target epitopes when conjugating the antigenic structures based on antibacterials (macrolides, glycopeptides, fluoroquinolones), it was demonstrated the possibility of utilization of the same antibody for selective determination and group immunoassay [1-4]. The advantages and limitations of this approach are discussed in the report.

References:
1. Burkin M. Enzyme-linked immunosorbent assays of fluoroquinolones with selective and group specificities // Food Agric. Immunol. 2008. Vol. 19, № 2. P. 131-140.
2. Burkin M.A., Galvidis I.A. Simultaneous separate and group determination of tylosin and tilmicosin in foodstuffs using single antibody-based immunoassay // Food Chem. 2012. V. 132. № 2. P. 1080-1086.
3. Burkin M.A., Galvidis I.A. Hapten modification approach for switching immunoassay specificity from selective to generic // J. Immunol. Methods. 2013. V. 57. P. 60-67.
4. Burkin M. A., Galvidis I. A. Simultaneous and differential determination of drugs and metabolites using the same antibody: difloxacin and sarafloxacin case // Anal. Methods. 2016. Vol. 8. P. 5843-5850.

СТЕНДОВЫЕ ДОКЛАДЫ
POSTER SESSION

УДК 543.068.8

МОДИФИКАЦИЯ ВНУТРЕННЕЙ ПОВЕРХНОСТИ ФОТОННО-КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ВОЛНОВОДОВ НАНОСТРУКТУРАМИ ЗОЛОТА

Пиденко П.С., Савенко О.А., Скапцов А.А., Скибина Ю.С., Горячева И.Ю., Русанова Т.Ю.

Саратовский государственны университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83
e-mail: olga-savenko95@mail.ru

Образцы фотонно-кристаллического волокна с полой сердцевиной модифицированы плазмонно-резонансными наноструктурами золота с целью применения в качестве элементов биосенсоров. Изучены спектральные характеристики полученных образцов.

Ключевые слова: фотонно-кристаллические волноводы с полой сердцевиной, ФКВ с ПС, модификация поверхности, биосенсор, наностержни золота, золотые наноструктуры, (3-глицидилоксипропил) триметоксисилан

Микроструктурные оптические волокна (МСВ) обладают рядом уникальных оптических свойств, что делает их перспективной платформой для создания различных сенсоров.

Одним из видов МСВ являются фотонно-кристаллические волноводы с полой сердцевиной (ФКВ с ПС). Такие структуры обладают характерным спектром пропускания, который содержит в себе разрешенные и запрещенные зоны энергии фотонов. Полая сердцевина позволяет анализировать микролитровые обьемы аналита. Однако низкая сорбционная способность стекла – материала, который используется для создания ФКВ с ПС – ограничивает возможности их применения в качестве сенсорной платформы. В данной работе для улучшения связывания биомолекул на внутренней поверхности ФКВ с ПС использовали силанизирующий агент, содержащий эпоксигруппы, – 3-(глицидилоксипропил) триметоксисилан (GLYMO).

Одной из важнейших характеристик, обуславливающих оптические свойства ФКВ с ПС, является показатель преломления внутренней поверхности. Данный параметр чувствителен к незначительным изменениям структуры внутренней поверхности центрального дефекта ФКВ с ПС. Изменение данного показателя приводит к изменению спектра пропускания ФКВ с ПС. Таким образом, по изменению спектров пропускания можно судить о степени силанизации внутренней поверхности с помощью GLYMO.

Благодаря имеющимся свойствам ФКВ с ПС являются перспективными материалами для применения в SPR- и ГКР-анализе. Проведение анализа на внутренней поверхности волокна возможно при ее модификации. С этой целью силанизированную поверхность допировали металлическими наноструктурами с плазмонным резонансом.

Наноструктуры благородных металлов усиливают электромагнитное поле за счет резонансного возбуждения, что приводит к увеличению сигнала гигантского комбинационного рассеяния. В данной работе использовали золотые наностержни, которые имеют два пика резонансного поглощения (продольный и поперечный).

Изучение спектральных характеристик модифицированных ФКВ с ПС проводили на спектрометре AvaSpec 248, изучение оптических характеристик наноструктур золота – на приборе Ocean Optics QE Pro Spectrometer. Изменение структуры полой сердцевины ФКВ приводит к смещению полос в спектре пропускания. При этом величина сдвига является мерой эффективности модификации на каждом ее этапе. Исследование образцов методом сканирующей электронной микроскопии показало отсутствие нарушений и изменений морфологической структуры ФКВ и наличие наноструктур золота в модифицирующем слое.

Полученные спектральные данные свидетельствуют об успешности модификации внутренней поверхности с помощью силанизирующего агента допированного наноструктурами золота. Модифицированное волокно можно использовать в качестве элементов биосенсоров.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект 14-13-00229.

.....

Microstructure optical fibers (MOF) have a number of unique optical properties that make them one of the promising platforms for the creation of various sensors.

Photonic crystal fiber with a hollow core (HCPCF) is one type of MOF. These structures have a characteristic transmission spectrum, which consists of permitted and prohibited parameters of photon energies. The hollow core makes it possible to analyze microliter volumes of analyte. However the low sorption ability of a HCPCF glass structure is limiting factor for its application as a biosensor platform. In this work, the inner surface of the HCPCF was modified by agent containing epoxy group, 3-(glycidyloxypropyl) trimethoxysilane (GLYMO), to improve the binding of biomolecules.

One of the most important characteristics of the HCPCF allowing control of their optical properties is the refractive index of the inner surface. This parameter is sensitive to minor changes in the structure of the inner surface of the central core of HCPCF. The change of this index leads to changes in the transmission spectrum of the HCPCF. Therefore changes in transmittance spectrum could be used to evaluate the success of silanization of HCPCF inner surface by GLYMO.

Owing to their properties PCFHC are promising materials for application in the SPR- and SERS analysis. Analysis on inner surface of PCFs is accessible using appropriate modification. For this aim the silanized surface was doped

with metallic plasmon-resonance nanostructures.

Noble metal nanoparticles increase electromagnetic field due to the resonant excitation that leads to increase of Raman scattering signal. In this work gold nanorods (GNRs) were used. GNRs are characterized by longitudinal and transverse resonant absorption peaks making them interesting for modification application.

Spectral analysis of modified HCPCF was carried out by AvaSpec 248 spectrometer. Optical properties of gold nanostructures were studied by Ocean Optics Pro QE spectrometer. Changes of hollow core structure of PCF lead to a shift in the transmission spectrum. Shift value is a measure of the modification efficiency at each stage. Scanning electron microscopy (SEM) analysis shows no violations and morphological changes in the structure of the HCPCF. As well SEM-analysis shows a presence of gold nanostructures in modifying layer.

The resulting spectral data indicate successful surface modification of the inner surface by gold nanostructures. The modified fiber can be used as components of biosensors.

This work was supported by the Russian Science Foundation, the project 14-13-00229.

УДК 535.71

СПЕЦИФИЧЕСКИЙ LUX-БИОСЕНСОР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИОНОВ ХРОМА

Финошин А.Д.[1], Гнучих Е.Ю.[2], Завильгельский Г.Б.[2]., Котова В. Ю.[2]., Петрова М.А.[3]

[1] Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий, Москва, Россия 119571, Москва, Проспект Вернадского, д. 86
[2] ФГБУ Гос НИИгенетика, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1
[3] ИМГ РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2
e-mail: alexcolton@yandex.ru

На основе штамма E. coli сконструирован специфический lux-биосенсор для детекции ионов хрома. Бактерии содержат рекомбинантную плазмиду, в которой транскрипция репортерных генов luxCDABE происходит с промотора, индуцируемого ионами хрома. Проделано измерение основных характеристик полученного биосенсора (пороговая чувствительность, амплитуда и время ответа) и проведена его оптимизация.

Ключевые слова: биосенсор, люцифераза, биолюминесценция, индуцируемый промотор, chrB, Acinetobacter lwoffii

В настоящее время широкое использование хрома в промышленности привело к загрязнению его соединениями почв и воды (Branco et al., 2013). Определение наличия низких концентраций хромата необходимо для выявления загрязненных мест, а также контроля результатов мер по очистке от соединений хрома. В отличие от химического анализа, применение бактериальных биосенсоров позволяет просто, дешево и с высокой чувствительностью определять наличие биодоступных поллютантов. Именно поэтому создание клеточных биосенсоров, чувствительных к ионам Cr(VI), является очень важной и перспективной задачей (Branco et al., 2013). Однако к настоящему времени создано только три биосенсора, чувствительных к ионам трех- и шестивалентного хрома (Peitzsch et al., 1998; Ivask et al., 2002; Branco et al., 2013), тогда как к таким тяжелым металлам-поллютантам их известно намного больше. В настоящей работе был сконструирован специфический lux-биосенсор для детекции ионов Cr(VI) и Cr(III).

В данной работе была использована векторная плазмида pDEW201 (Vand Dyk & Rosson, 1998), содержащая гены-репортеры luxCDABE из генома бактерий Photorhabdus luminescens. В качестве регуляторного участка в pDEW201 был клонирован фрагмент оперона устойчивости к хрому: промотор оперона устойчивости к хрому и ген chrB кодирующий ген регулятор, чувствительный к ионам хрома. Предварительно провели сравнительные исследования трех вариантов оперонов устойчивости к хрому, обнаруженных на плазмидах штаммов Acinetobacter lwoffi, выделенных из вечной мерзлоты, и отобрали оперон штамма ED9-5a с наилучшей индукцией ионами хрома. Поэтому при создании биосенсора в плазмиду pDEW201 клонировали фрагмент оперона устойчивости к хрому именно этого штамма.

Рекомбинантная плазмида, обозначенная pLux1ChrB была клонирована в клетках Escherichia coli MC1061. Полученные клоны индуцировали ионами шестивалентного хрома и измеряли интенсивность люминесценции с помощью люминометра. Проведена оптимизация полученного lux-биосенсора: время индукции (длительность измерения люминисценции в люминометре), концентрация ионов хрома, состав питательной среды.

Литература.
Branco R., Cristóvão A, Morais P. Highly sensitive, highly specific whole-cell bioreporters for the detection of chromate in environmental samples//PLoS One. 2013. Vol. 1. № 8. P. e54005.
Ivaska A., Virtab M., Kahrua A. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil//Soil Biology and Biochemistry. 2002. Vol 34. № 10. P. 1439–1447.
Peitzsch, N., Eberz, G., Nies, D.H. Alcaligenes eutrophus as a bacterial chromate sensor//Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol 2. № 64. P.453–458.
Van Dyk T., Rosson R. Photorhabdus luminescens luxCDABE promoter probe vectors. // Methods Molecul. Biology. 1998. Vol. 102. P. 85-95.

SPECIFIC LUX-BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF CHROMIUM IONS

Finoshin A.D.[1], Gnuchih E.Yu.), Kotova V. Yu.[2], Zavilgelsky G. B.[2], Petrova M.A.[3]

[1]Moscow University of Technology, Institute of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia
119571, Moscow, Vernadsky avenue, 86
[2]State Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Pervyi Dorozhnii pr. 1, 117545, Moscow, Russia
[3]Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Kurchatov sq. 2, 123182, Moscow, Russia
e-mail: alexcolton@yandex.ru

Specific lux-biosensor for detection of chromium ions was constructed with the use of the E. coli cells. Bacteria contain the recombinant plasmid in which the transcription of the reporter genes luxCDABE occurs from a promoter inducible by chromium ions. A measurement of the main characteristics (threshold sensitivity, amplitude and time of the response) of the biosensor and its optimization were conducted.

Key words: biosensor, luciferase, bioluminescence, an inducible promoter, chrB, Acinetobacter lwoffii

The extensive chromate utilization in industries has resulted in a large number of contaminated sites worldwide (Branco et al., 2013). Detection of the presence of low concentrations of chromate is indispensable to identify contaminated locations and to control the progress of remediation efforts. Unlike chemical analysis the use of bacterial biosensors allows simple, cheap and sensitive determinations of the bioavailable pollutants. That is why the creation of cellular biosensors sensitive to ions of Cr (VI), is a very important and promising objective (Branco et al., 2013). However, to date only three biosensors sensitive to Cr(VI) and Cr(III) ions were created (Peitzsch et al., 1998; Ivask et al., 2002; Branco et al., 2013), while the bioreporters for the other heavy metals pollutants is known much more. In this paper the lux-specific biosensor for detecting ions of Cr (VI) and Cr (III) was constructed.

In this work a vector plasmid pDEW201 (Vand Dyk & Rosson, 1998) containing the reporter genes luxCDABE from the Photorhabdus luminescens genome was used. As a regulatory region, fragment from the chromium resistance operon (resistance operon promoter and gene-operator chrB sensitive to the presence of chromium ions) was cloned into the pDEW201. Preliminary comparative studies of the three chr-operons found on plasmids into the Acinetobacter lwoffi strains isolated from permafrost were conducted and an operon demonstrated the best induction by chromium ions from the strain ED9-5a was detected. Therefore, when creating a biosensor pLux1 cloned into a plasmid fragment resistance operon of the strain is chromium. To create a biosensor fragment of the chr- operon from strain ED9-5a was used for cloning into plasmid pDEW201.

A recombinant plasmid, designated pLux1ChrB, was cloned into Escherichia coli MC1061 cells. The resulting clones were induced with hexavalent chromium ions and luminescence intensity was measured with a luminometer. Optimization of the resulting lux-biosensor was conducted: induction time (duration of measuring luminescence in a luminometer), the concentration of chromium ions, composition of the culture medium.

References:
Branco R., Cristóvão A, Morais P. Highly sensitive, highly specific whole-cell bioreporters for the detection of chromate in environmental samples // PLoS One. 2013. Vol. 1. № 8. P. e54005.
Ivaska A., Virtab M., Kahrua A. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil // Soil Biology and Biochemistry. 2002, Vol 34. № 10. P. 1439–1447.
Peitzsch, N., Eberz, G., Nies, D.H. Alcaligenes eutrophus as a bacterial chromate sensor // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol 2. № 64. P. 453–458.
Van Dyk T., Rosson R. Photorhabdus luminescens luxCDABE promoter probe vectors. // Methods Molecul. Biology. 1998. Vol. 102. P. 85-95.

ПУБЛИКАЦИИ
PUBLICATIONS

УДК 543.553

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ ДАТЧИК КЛАРКА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ O_2-ИЗМЕРЕНИЙ.

Бородин В.Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, г. Пущино, Россия
142290, г. Пущино, Московская область, ул. Институтская 2
e-mail: borodin_ibbp@mail.ru

Представлено методическое пособие по использованию датчиков Кларка для кислородных измерений. В пособии теория и практика данного метода O_2-измерений изложены на примере датчика Кларка классического типа. Пособие может представлять интерес для тех, кто использует электроды Кларка в работе и для студентов, изучающих методы O_2-измерений.

Ключевые слова: полярография, амперометрия, электрод Кларка, датчик Кларка, полярографический кислородный датчик Кларка, кислородные измерения, методическое пособие, учебное пособие

В свете исключительной важности кислорода (O_2) для производственной деятельности человека и для жизнедеятельности подавляющего большинства живых существ на Земле выглядит вполне обоснованным то внимание, которое уделяется разработке новых и улучшению и освоению имеющихся методов O_2-измерений. Из всех методов O_2-измерений, наибольшее распространение в науке и в производстве, в том числе в биотехнологии, получил амперометрический метод с применением O_2-датчиков мембранного типа (O_2-электроды Кларка). В связи с этим, возникает потребность в печатных работах излагающих теорию и практику данного метода как можно более кратко и доходчиво, но, при этом, достаточно для его полноценного использования. Такая потребность возникает еще и в связи с тем, что из-за простоты пользования электродов Кларка, важность знаний об основах метода часто упускается из вида или недооценивается, что не позволяет использовать все возможности данных O_2-датчиков и является причиной возникновения систематической ошибки в O_2-измерениях. Чтобы удовлетворить указанную потребность, было написано методическое пособие начального уровня по использованию O_2-электродов Кларка [1]. В этом пособии теория и практика метода O_2-измерений основанном на электродах Кларка изложены на примере электродов Кларка классического типа. Материал об электродах Кларка в пособии сопровожден кратким изложением сущности классической полярографии, из которой произошла O_2-амперометрия и без знания которой устройство, работа и особенности использования электродов Кларка не могут быть поняты в полной мере. Пособие содержит много ссылок на работы посвященные O_2-электродам Кларка, и на работы, содержащие сведения о растворимости O_2 в различных средах. Пособие может представлять интерес для тех, кто использует O_2-электроды Кларка в работе, и для студентов, изучающих методы O_2-измерений.

Литература.
1. Бородин В.Б. 2016. Полярография. Применение электродов Кларка для O_2-измерений. / Ин-т фундаментальных пробл. биол. РАН. - Пущино, Моск. обл. – 55 с. : ил. – Библиогр.: 100 назв. – Рус. – Деп. в ВИНИТИ 18.11.2016, № 154-В2016.

УДК 543.553

THE CLARK POLAROGRAPHIC SENSOR AND ITS APPLICATION FOR O_2-MEASUREMENTS.

Borodin V.B.

Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Russian Federation 142290, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya 2 e-mail: borodin_ibbp@mail.ru

A manual for the polarographic method of oxygen analysis based on the use of membrane-covered Clark-type O_2-electrode is presented. The theory and practice of the method are presented in the manual on the basis of the classic Clark-type electrodes. The manual can be useful to both researchers working with the Clark-type O_2-electrodes and the students studying the methods of O_2 analysis.

Key words: polarography, amperometry, Clark-type electrode, Clark-type sensor, Clark polarographic oxygen sensor, oxygen analysis, methodical manual, tutorial

In the light of the extraordinary importance of oxygen (O_2) for human industrial activities and life on Earth, it is reasonable that a considerable attention is paid to the development, improvement and use of methods for O_2 analysis. Among all methods of O_2 analysis, the most widely used one in science and industry, including biotechnology, is an amperometric method based on the use of a membrane-covered Clark-type O_2-electrodes. In connection with this, there is a need for publications describing this method briefly, clearly, and at the same time quite sufficiently for its proper practical use. These publications are essential also because the importance of the knowledge of basic principles of this method is often overlooked or underestimated due to easy handling of Clark-type electrodes, making it impossible to use all advantages of the method and causing a systematic error in O_2 analysis. To serve this need the introductory manual on the use of Clark-type O_2-electrodes has been written [1]. In this manual, the method is exemplified by the classical Clark-type electrodes. A material related to Clark-type electrodes is attended in the manual by a short overview of the main principles of classical polarography, which is basal for O_2-amperometry and which, therefore, should be known for a full understanding of the design and function of Clark-type electrodes. The manual contains many References: to works devoting to the Clark-type O_2-electrodes and to works containing the data on O_2 solubility in various media. The manual can be of interest to both researchers working with the Clark-type O_2-electrodes and the students studying the methods of O_2 analysis.

References:
1. Borodin V.B. 2016. Polarografia. Primenenie elektrodov Klarka dlia O2-izmereniy. / In-t fundamentalnih probl. biol. RAN. - Pushchino, Mosk. obl. – 55 s. : il. – Bibliogr.: 100 nazv. – Rus. – Dep. v VINITI 18.11.2016, № 154-B2016.

СЕКЦИЯ

КОНКУРС МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

SECTION

YOUNG RESEARCHER'S CONTEST

УДК: 544.723.23, 57.021 , ББК:

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОАЛМАЗОВ

А.Ю.Александровская[1], Т.В.Жарникова[2], А.В.Сафонов[3], Т.Б.Галушко[3], А.В.Инденбом[3], А.А.Исакова[3], Б.В.Спицын[3]

[1]ФГБУН Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Россия, 199071, Москва, Ленинский проспект, 31/4, anastasia.alexandrovskaya@gmail.com, +7(495) 955-46-01
[2]ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия, 355035, Ставрополь, Советская, 13-15
[3]ФГБУН Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Россия, 199071, Москва, Ленинский проспект, 31/4

В работе проведено исследование антибактериальных свойств детонационных наноалмазов и показано сильное влияние обработки их поверхности на эти свойства.

Ключевые слова: детонационный наноалмаз, антибактериальные свойства, биоцидность

Поиск и создание новых материалов, обладающих антибактериальными свойствами, является актуальной задачей. В первую очередь, это обусловлено тем, что некоторые штаммы бактерий могут развивать резистентность по отношению к ранее эффективным средствам, в том числе, к антибиотикам и препаратам на основе тяжелых металлов. Нами проведено исследование антибактериальных свойств детонационных наноалмазов (ДНА) с аминированной и хлорированной поверхностью по отношению к грамотрицательным (Pseudomonasputida) и грамположительным (Francisella (F) tularensis) бактериям.В работе были использованы наноалмазы УДА-ГО-ВК (фирма Синта, Республика Беларусь). Наноалмазы с окисленной хлорированной поверхностью ДНАхл были получены нагреванием УДА-ГО-ВК в парогазовой смеси CCl4/Ar с содержанием 3 мол.% CCl4 при температуре 450°C в течение 2 ч. Детонационные наноалмазы с аминированной поверхностью ДНАамин были получены из ДНАхл нагреванием в аммиаке высокой чистоты при давлении 1 атм в течение 0.5 ч при температуре 400°C. Оценка количества мертвых клеток Pseudomonasputida после их взаимодействия с ДНА производилась спектрофотометрически по методике, описанной в [1]. Концентрацию ДНА варьировали в диапазоне от 100 до 1500 мг/л. Было обнаружено, что ДНА с хлорированной и аминированной поверхностью обладают более выраженным биоцидным действием по сравнению с контрольными немодифицированными образцами УДА-ГО-ВК. Показано, что аминированные наноалмазы являются в два раза более эффективными по отношению к грамотрицательным бактериям P.putida в сравнении с хлорированными образцами.

Методом электронной микроскопии было показано, что в течение первых двух часов взаимодействия с бактериями наноалмазы адсорбируются на их поверхности, приводя к повреждению клеточных стенок и нарушению механизмов деления

Бактерицидное действие наноалмазов на микробы туляремии F. tularensisисследовалось иначе. В 1 мл микробной взвеси с концентрацией 109 м.кл./мл добавляли навеску ДНА и после двух часов инкубации производили посев в чашки Петри на питательный FT-агар. Через 7 дней заметный рост бактерий не наблюдался только в случае ДНА с хлорированной поверхностью.

Полученные результаты открывают перспективу практического применения наноалмазов детонационного синтеза для создания новых средств бактериальной защиты.

Литература.

Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: 1978. 394 С

ANTIBACTERIAL EFFECT OF MODIFIED NANODIAMONDS

A.Alexandrovskaya[1], T.Zharnikova[2], A.Safonov[3], T.Galushko[3], A.Indenbom[3], A.Isakova[3], B.Spitsyn[3]

[1]Russian academy of sciences A.N. Frumkin Institute of Physical chemistry and Electrochemistry RAS (IPCE RAS), Russia, 199071, Moscow, Leninsky prospect, 31/4
[2]Stavropol Antiplague Scientific Research Institute of Rospotrebnadzor, Russia, 355035, Stavropol, Sovetskaya, 13-15
[3]Russian academy of sciences A.N. Frumkin Institute of Physical chemistry and Electrochemistry RAS, Russia, 199071, Moscow, Leninsky prospect, 31/4

Antibacterial properties of detonation nanodiamonds was investigated and a strong influence of their surface treatment on these properties was shown.

Key words: detonation nanodiamonds, antibacterial properties, biocidal activity

Search and creation of new materials with antibacterial properties, is a relevant task. Primarily, this is due to the fact that some strains of bacteria can acquire resistance over previously effective agents, including antibiotic drugs and drugs based on heavy metals. We have studied the antibacterial properties of detonation nanodiamonds (DND) with chlorinated and aminated surface against gram negative (Pseudomonas putida) and gram positive (Fransisella (F) tularensis) bacteria. We were used nanodiamonds UD-HP-WS (NanoDiamonds High Purification Water Suspension, Sinta, Republic of Belarus) in this work. Nanodiamonds with oxidized chlorinated surface DNAchl were obtained by heating UD-HP-WS nanodiamonds at 450 °C for 2 hours in the gas mixture of CCl4/Ar containing 3 mol.% CCl4. The detonation nanodiamonds with aminated surface DNAamin were obtained from DNAchl by heating in high-purity ammonia at 1 atm pressure and 400 °C for 0.5 hours. The estimate of the number of dead cells of Pseudomonas putida after their interaction with DNA was performed spectrophotometrically according to the method described in [1]. The concentration of DNA was varied in the range from 100 to 1500 mg/L. It was found that DNA with chlorinated and aminated surface have a more pronounced biocidal effect compared to the control samples of unmodified UD-HP-WS nanodiamonds. It is shown that aminated nanodiamonds are more than twice as effective against gram negative bacteria P.putida compared to chlorinated samples.

Electron microscopy showed that during the first two hours of interaction nanodiamonds are adsorbed on the surface of bacterial cells, resulting in damage of the cell membranes and disruption of the mechanisms of fission.

The bactericidal effect of nanodiamonds on tularemia F. tularensis germs was studied differently. 1 ml of a microbial suspension with a concentration of 109 m cells/mlwere added to a portion of DNA and after two hours of incubation, seeded in Petri dishes on nutrient FT- agar. After 7 days visible growth of bacteria was observed only in the case of DNA with the chlorinated surface.

The obtained results offer the prospect of practical application of nanodiamonds of detonation synthesis to create new means of bacterial protection

References:
Labinskaya A. S. Microbiology with technique of microbiological researches. M.: 1978, 394 P. (in Russian)

.....

УДК: 58.085 , ББК: 28.087

ДИАГНОСТИКА ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ДЕРЕВЬЕВ PINUS SYLVESTRIS L. НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР IN VITRO В МОДЕЛИРУЕМЫХ СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ

Е.Ю.Аминева, Т.М.Табацкая, О.С.Машкина

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, Российская Федерация, 394087, Воронеж, Ломоносова, 105, elena.pardaeva@mail.ru, 89507616470

Показана возможность моделирования стрессовой нагрузки через условия культивирования in vitro. «Засоление» 1% раствором NaCl питательной среды, имитируя условия засухи, способствует ранней диагностике засухоустойчивости исходных деревьев сосны обыкновенной с помощью каллусных культур in vitro.

Ключевые слова: Pinus sylvestris L.; каллус; засуха; засухоустойчивость

В последние десятилетия на фоне происходящего глобального изменения климата участилось количество засух [1]. В связи с этим наблюдается гибель деревьев. Однако, отдельные генотипы, несмотря на стрессовые условия (засуху) сохраняют жизнеспособность. Цель настоящей работы – с помощью метода культуры ткани invitroвыявить засухоустойчивые генотипы взрослых деревьев сосны обыкновенной.

В работе использовали 5 генотипов деревьев сосны обыкновенной (№12, 83, 94, 96, 98) из насаждения в с. Ступино Воронежской области, отобранных Н.Ф. Кузнецовой. Каллусные культуры выращивали на агаризованной питательной среде с половинными содержанием макросолей по Мурасиге и Скугу [2]. В качестве углевода использовали сахарозу (3%). Формирование каллусной ткани индуцировали добавлением в питательную среду гормонов: 6-БАП (0,5 мг/л); НУК (2 мг/л); 2,4-Д (1 мг/л). Оценку каллусогенезов проводили по 4 параметрам: скорость инициации (СК, сутки) и частота каллусогенезов (ЧК,%), интенсивность каллусообразования (ИК, балл), жизнеспособность каллусной ткани (ЖК, сутки).

Рекультивированные каллусные культуры 2-3 пассажа помещали на питательную среду с добавлением NaCl (осмотика, способного имитировать условия засухи) в концентрации 1%. Показано, что реакция каллусных культур на селективной питательной среде неоднозначна. Например, для д.12, 96, 98 отмечалось отсутствие роста каллусной ткани, к 10-15 суткам наблюдалась 100% гибель, культуры приобретали темно-коричневый цвет. Для каллусных культур д.83 и 94 изменений на селективной питательной среде не отмечалось, уровень жизнеспособности оставался прежним: 21,3±0,3 суток и 23,7±0,9суток соответственно. Также для д.83 и 94 сохранялся и 3балльный уровень интенсивности роста каллусной ткани.

Установлено, что добавление NaCl в питательные среды повышает эффективность дифференциации каллусных культур, т.к. ускоряет и усиливает проявление их реакции.

Таким образом, показано, что реакции каллусных культур in vitro разных генотипов сосны обыкновенной в ответ на условия культивирования отличаются. Каллусы одних генотипов на питательной среде с добавлением NaCl (1%) сохраняют показатели (СК, ЧК, ИК, ЖК) на прежнем уровне, свидетельствуя о засухоустойчивости исходных деревьев, каллусы других культур полностью прекращают свой рост на селективной питательной среде.

Литература.
1. Переведенцев Ю.П., Гоголь Ф.В., Наумов К.М., Шаталинский К.М. Глобальные и региональные изменения климата на рубеже XX и XXI столетий // Вестник ВГУ. Серия: География. Геоэкология. 2007. № 2. С. 5–12. 2. Murashige T.A., Skoog T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaceo tissue cultures // Phisiologia Plantarum, 1962. – V. 15. – P. 473-497.

DIAGNOSIS OF DROUGHT RESISTANCE OF PINUS SYLVESTRIS L. TREES ON THE BASIS OF IN VITRO CALLUS CULTURES REACTION IN MODELED STRESS CONDITIONS

E.Amineva, T.Tabatskaya, O.Mashkina

All-Russian Research institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Russian Federation, 394087, Voronezh, Lomonosov street, 105

Shown the possibility of modeling stress load across the culture conditions in vitro. «Salinity» 1% NaCl of nutrient medium, simulating of drought conditions, contributes to the early diagnosis of the source of drought resistance Scots pine trees with the help of callus cultures in vitro.

Key words: Pinus sylvestris L .; callus; drought; drought resistance

In recent decades, against the background of global climate change, become frequent the number of droughts [1].In this regard, observed destruction of trees. However, certain genotypes, although stress conditions remain viable.The aim of this work – with the help of in vitro tissue culture method to identify drought resistant genotypes of adult trees of Scots pine.

We used 5 genotypes of Scots pine trees (№12, 83, 94, 96, 98) of the planting in the v. Stupino Voronezh region selected by N.F.Kuznetsova. Callus culture was grown on an agar culture medium with half the content makrosalt on Murashige and Skoog medium [2]. As carbohydrate used sucrose (3%). The formation of callus tissue was induced by addition of hormones into the culture medium: BAP (0.5 mg/l); NAA (2 mg/l); 2,4-D (1 mg/l). Assessment of

callusogenesis conducted according to 4 parameters: the speed of initiation of primary callus cultures (SC) and frequency (FC) of callusogenesis, intensity (IC) of callusogenesis, callus cultures vitality (VC).

Remediated callus culture of passage 2-3 were placed on culture medium with the addition of NaCl (osmotic substance that can simulate drought conditions, at a concentration of 1%). It was shown that on the selective callus culture medium mixed reaction. For example, trees №12, 96, 98, noted the absence of callus tissue growth, to 10-15 days was observed in their 100% mortality (callus cultures acquire a dark brown color). For callus cultures of 83 and 94 trees changes on the selective medium is not noted, the level of viability remained the same: 21,3 ± 0,3 days and 23,7 ± 0,9 days, respectively. Also for 83 and 94 trees remained 3 points degree of growth rate callus tissue.

It is found that, the addition of NaCl in the culture media increases the efficiency of differentiation of callus cultures, since it accelerates and enhances the expression of their reactions.

Thus, it was shown that the reaction of callus cultures in vitro of different genotypes pine in response to the culture conditions are different. Calluses of some genotypes on medium with adding NaCl (1%) remain indices (SC, VC, FC, IC) at the same level, indicating about drought resistant trees, other crops calluses completely stop their growth on a selective medium.

References:
1. Perevedentsev YP, FV Gogol, Naumov, KM, KM Shatalin Global and regional climate change at the turn of XX and XXI centuries // Vestnik VSU. Series: Geography. Geoecology. 2007. № 2. S. 5-12. 2. Murashige T.A., Skoog T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaceo tissue cultures // Phisiologia Plantarum, 1962. – V. 15. – P. 473-497.

УДК: 543.559, ББК: 24.46

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИМИТАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АФФИННОСТИ НА ОСНОВЕ БОРОНАТ-ЗАМЕЩЕННОГО ПРОВОДЯЩЕГО ПОЛИАНИЛИНА

Е.А.Андреев, М.А.Комкова, А.А.Карякин

МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1,
aak@analyt.chem.msu.ru, +74959394605

В работе представлен сенсорный материал на основе поли(аминофенилборной кислоты), использующий специфическое взаимодействие борной кислоты с полиолами (сахарами и оксикислотами). При помощи микросенсора, модифицированных полимером, проведено детектирование плесневых грибов в жидкости, минимальное определяемое содержание составило 700 КОЕ/мл.

Ключевые слова: детектирование микроорганизмов, проводящий полианилин, микросенсор, фенилборная кислота

Преконцентрирование микроорганизмов на поверхности чувствительного слоя сенсоров при детектировании бактерий и плесневых грибов является необходимой процедурой для достижения необходимых пределов обнаружения. Для преконцентрирования применяют: заряженные поверхности (полилизин, полихитозан), биораспознающие элементы (антитела, аптамеры, лектины), а также подходы биомиметики. Последний подход является наиболее перспективным в сенсорных приложениях, поскольку сочетает высокую стабильность и селективность.

Фенилборная кислота широко применяется в сенсорных системах для детектирования компонентов клеточных стенок – сахаров и оксикислот. Существенный недостаток импедиметрических и кондуктометрических (био)сенсоров на основе фенилборной кислоты - полезный и фоновый сигналы направлены на уменьшение проводимости и, тем самым, неразличимы.

В настоящей работе продемонстрирован сенсорный материал – проводящий боронат-замещенный полианилин. Связывание компонентов клеточных стенок с группой борной кислоты в полимере не требует дополнительных реагентов и временных затрат на пробоподготовку. Используется новый принцип детекции, основанный на увеличении проводимости полимера в присутствии микроорганизмов [1]. Такой принцип позволяет различать специфический и фоновый сигнал, поскольку в последнем случае проводимость всегда уменьшается.

Сенсорный материал был успешно применен для детектирования плесневых грибов Penicillium chrysogenum. Модифицированные разработанным полимером взаимопроникающие микроэлектроды продемонстрировали увеличение проводимости в присутствии плесневых грибов. Минимальное определяемое содержание составило 700 КОЕ/мл.

Литература.
1. Electroanalysis, 27, 2015, 2055–2062
Финансирование: Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду за финансовую поддержку (грант № 16-13-00010).

MICROORGANISMS DETECTION BASED ON BIOMIMETICS OF BORONATE-SUBSTITUTED CONDUCTING POLYANILINE

E.Andreev, M.Komkova, A.Karyakin

M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991, Moscow, Leninskie gory, 1

Novel sensing material on the base of poly(amoniphenylboronic acid) is developed. It utilizes biomimetics approach consisting in affinity interactions of phenylboronics acid with polyols (sugars and hydroxyacids) which are the main components of the microorganisms cell wall. Polymer-modified interdigitated microelectrodes were successfully applied for detection of mold; lower limit of detection was 700 CFU/ml.

Key words: detection of microorganisms, conducting polyaniline, microsensor, phenylboronic acid

Detection of bacteria and mold with various sensors requires preconcentration of microorganisms on sensor surface in order to achieve the desired detection limits. Preconcentration can be provided via: charging surfaces (polylisine, polychytosan), biorecognition elements (antibodies, aptamers, lectins etc.) and biomimetics of bioaffinity interactions. The latter is of particular interest due to combination of selectivity and operational stability.

Phenylboronic acids are widely used for detection of cell wall components – sugars and hydroxyacids. However, majority of existing conductometric and impedimetric systems generate both specific and non-specific signals as the increase of resistance and therefore they are doubtful about practical importance.

In this work we demonstrate novel sensing material – conducting boronate-substituted polyaniline. Sensing principle is reagentless and is based on resistance decrease in the presence of microorganisms that allows discriminating between specific and non-specific interactions since the latter always results in resistance increase [1].

Developed sensing material was successfully applied for Penicillium chrysogenum detection. Polymer-modified interdigitated microelectrodes demonstrated the increase of conductivity in the presence of the mold. Lower limit of detection was 700 CFU/ml.

References:
1. Electroanalysis, 27, 2015, 2055–2062
Grant: Russian Science Foundation financial support (grant no. 16-13-00010) is greatly acknowledged.

УДК: 577.352.27, ББК:

ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА КАРНОЗИНА: ПОЛУЧЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ

Н.А.Антонова[1], Г.М.Сорокоумова[1], Т.Н.Фёдорова[2], С.Л.Стволинский[2], Д.А.Абаимов[2], В.И.Попенко[3]

[1]ФГБОУ ВО Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий), кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Россия, 119571 , Москва, Проспект Вернадского, 86, valkoista49@gmail.com, 89261555814
[2]ФГБНУ «Научный центр неврологии», лаборатория клинической и экспериментальной нейрохимии, Россия, 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80, tnf51@bk.ru, 84954902409
[3]ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Россия, 119991 , Москва, Вавилова, 32, popenko@eimb.ru, 89057602642

Получены липосомы различного липидного состава, содержащие карнозин. Показано, что наибольшее включение карнозина достигнуто при липидном составе дипальмитоилфосфатидилхолин/холестерин (7:3).

Ключевые слова: карнозин, липосомы, дипальмитоилфосфатидилхолин, карнозиназа.

В последние годы возрос интерес исследователей к карнозину – дипептиду природного происхождения. Карнозин является сильным антиоксидантом [1] и, в основном, применяется как биологически активная добавка, и только при катаракте используется лекарственная форма – глазные капли [2-3]. В организме карнозин быстро расщепляется ферментом карнозиназой, следовательно, его надо применять в больших дозах. Одним из подходов, позволяющих защитить лекарственный препарат от деградации, является создание липосомальной формы действующего вещества [3].

Задачами настоящей работы были подбор условий получения липосом, обладающих большей эффективностью включения карнозина, и изучение их морфологии, размеров, кинетики высвобождения липосомального карнозина, действия на него карнозиназы и его антиоксидантных свойств.

Липосомы получали методом экструзии с пассивной и активной загрузкой карнозином. В качестве липидов использовали дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) и его смеси с холестерином (ХС) и стеариламином (СА). Эффективность включения определяли методом ЯМР спектроскопии, описанным ранее [4]. Было показано, что использование метода активной загрузки с помощью создания градиента pH сульфатом аммония позволяет получить липосомы с максимально возможной эффективностью включения, равной 41,7%, при использовании в качестве липидов смесь ДПФХ/ХС (7:3).

Методом динамического светорассеяния и электронной микроскопии были определены размер и морфология липосом. Было показано, что липосомы из ДПФХ/ХС (7:3) с карнозином представляют собой сферические наночастицы со средним размером 133 нм, липосомы из ДПФХ/ХС/СА (7:3:2) обладали размером 187 нм. С использованием ячейки Франца показало, что карнозин высвобождается из липосом с липидным составом ДПФХ/ХС (7:3) и ДПФХ/ХС/СА (7:3:2) в течение 24 часов. Исследование действия карнозиназы на липосомальный карнозин выявило, что наибольшее количество карнозина (около 20%) сохранялось в неизменном виде при использовании липосом с липидным составом ДПФХ/ХС/СА (7:3:2). Также была оценена антиоксидантная активность липосомального карнозина на модели Fe2+-индуцированного окисления суммарной фракции липопротеинов низкой и очень низкой плотности, выделенной из крови здоровых доноров, методом хемилюминесценции в системе хлористого кальция с гепарином. Липосомальный карнозин характеризовался более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с карнозином в растворе.

Таким образом, в ходе работы были подобраны условия получения липосом, имеющих максимальную эффективность включения карнозина. Показано, что полученные липосомы представляют собой гомогенные по размеру сферические наночастицы, высвобождение карнозина из которых происходит постепенно и которые защищают его от воздействия карнозиназы. Было показано, что липосомы с липидным составом ДПФХ:ХС (7:3) обладают более высоким антиоксидантным действием.

Литература.
1. Болдырев А.А. Биологическое значение и возможности применения в медицине. –М: Издательство МГУ. 1998 – 326 с. 2. Ярыгина Е. Г., Прокопьева В. Д., Бохан Н. А. Окислительный стресс и его коррекция карнозином // Успехи Современного Естествознания. – №4. – 2015. – С. 106 – 113. 3. Cararo J. H., Streck E. L., Schuck P. F., Ferreira G. da C. Carnosine and Related Peptides: Therapeutic Potential in Age-Related Disorders // Aging and Disease. – 2015. – V. 6. – №5. – P. 369-379. 4. Maherani B., Arab-Tehrany E., Kheirolomoom A., Cleymand F., Linder M. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant L-carnosine // Food chemistry. – 2012 – V. 134. – P. 632-640.

Финансирование: Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ. Регистрационный номер НШ-7946.2016.11.

THE LIPOSOMAL FORM OF CARNOSINE: OBTAINING AND PROPERTIES

N.Antonova[1], G.Sorokoumova[1], T.Fedorova[2], S.Stvolinsky[2], D.Abaimov[2], V.Popenko[3]

[1]Moscow Technological University (MITHT), Russia, 119571 , Moscow, Vernadsky Avenue, 86
[2]Research Center of Neurology, Russia, 125367, Moscow, Volokolamskoye highway, 80
[3]Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Russia, 119991 , Moscow, Vavilova, 32

Carnosine-containing liposomes of different lipid composition were obtained. It was shown that the highest carnosine encapsulation efficiency was achieved with the lipid composition of dipalmitoylphosphatidylcholine:ch olesterol (7:3).

Key words: carnosine, liposomes, dipalmitoylphosphatidylcholine, carnosinase.

Over the last few years, natural dipeptide carnosine has attracted increased interest among researchers. Carnosine is a potent antioxidant [1] and is mainly used as a dietary supplement. Only in cataract treatment it is applied as the dosage form of eye drops [1-2]. In the body carnosine is quickly cleaved by carnosinase, therefore, it has to be applied at high doses. One of the approaches to protecting the drug from degradation is creating a liposomal form of the active substance [3].

The aims of this study were selecting the conditions for obtaining liposomes with the highest carnosine encapsulation efficiency, and comparing their morphology, size, carnosine release kinetics, vulnerability to carnosinase, and antioxidant properties.

The liposomes were obtained using extrusion with either passive or active carnosine loading. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and its mixtures with stearylamine (SA) and cholesterol (CS) were used as lipids. Encapsulation efficiency was determined using NMR-spectroscopy technique described earlier [4]. It was shown that using active loading via creating pH gradient with ammonium sulphate allowed to obtain liposomes with the highest possible encapsulation efficiency of 41,7% using DPPC:CS (7:3) mixture as lipids.

The liposomes' morphology and size were determined using dynamic light scattering and electronic microscopy techniques. It was shown that DPPC:CS (7:3) liposomes with carnosine were spherical nanoparticles with the average size of 133 nm while DPPC:CS:SA (7:3:2) liposomes were of 187 nm in size. Using the Frantz cell it was shown that carnosine is released from DPPC:CS (7:3) and DPPC:CS:SA (7:3:2) liposomes within 24 hours. The study of carnosinase effect on liposomal carnosine revealed that the largest amount of carnosine (about 20%) remained intact upon using DPPC:CS:SA (7:3:2) liposomes. Also using chemiluminescence in the calcium chloride – heparin system in the model of Fe2+-inducted oxidation of the total fraction of low-density and very low-density lipoprotein obtained from healthy donor blood the antioxidant activity of liposomal carnosine was assessed. Liposomal carnosine was characterized by higher antioxidant activity in comparison to free carnosine.

Thus, in this study the conditions for obtaining liposomes with the highest possible carnosine encapsulation efficiency were selected. It was shown that obtained liposomes were homogeneous spherical nanoparticles that release carnosine gradually and protect it from carnosinase. It was shown that DPPC:CS (7:3) liposomes demonstrated a higher antioxidant effect.

References:
1. Boldyrev A. A. Carnosine: Biologicheskoye znachenie i primenenie v medicine. M: Publisher MSU. 1998. 326 p. (in Russ.). 2. Yarigina E. G., Prokop'eva V. D., Bohan N. A. Oxidative stress and its correction by carnosine //Advances in current natural sciences . – №4. – 2015. – P. 106 – 113 (in Russ.). 3. Cararo J. H., Streck E. L., Schuck P. F., Ferreira G. da C. Carnosine and Related Peptides: Therapeutic Potential in Age-Related Disorders // Aging and Disease. – 2015. –V. 6. – №5. – P. 369-379. 4. Maherani B., Arab-Tehrany E., Kheirolomoom A., Cleymand F., Linder M. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant L-carnosine // Food chemistry. – 2012 – V. 134. – P. 632-640.

Grant: The study was supported by the Grant of the President of Russian Federation for the Leading Scientific Schools of Russia, reg. number НШ-7946.2016.11.

УДК: 602.4:547.455.623:007.573.6, ББК: 24.46/48

СИСТЕМА БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ ПЕЧАТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ И ФЕРМЕНТАМИ, ДЛЯ КОНТРОЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

А.В.Алексеевич, С.С.Каманин

Тульский государственный университет, Россия, 300012, Тула, проспект Ленина, 92, v.a.arlyapov@gmail.com, +79207420122

Получена и апробирована система биосенсоров на основе печатных электродов, модифицированных углеродными нанотрубками и ферментами, которая может использоваться для одновременного определения содержания глюкозы, молочной кислоты и крахмала в смеси с минимальной пробоподготовкой.

Ключевые слова: биосенсор, печатный электрод, углеродные нанотрубки.

Разработка доступных методов определения содержания различных веществ в смеси является одним из перспективных направлений развития аналитических методов анализа. При этом амперометрические

биосенсоры на основе модифицированных печатных электродов представляют собой удобную и экономичную платформу для создания аналитического устройства с необходимыми характеристиками. Биотехнологическое сырье представляет собой смесь большого количества соединений, относящихся к различным классам, что затрудняет мониторинг состояния подобной сложной системы. Тем не менее, содержание в бродильной массе крахмала, глюкозы и лактата в каждый момент времени является показателем качества и полноты протекания процесса брожения. Для дифференциальной оценки содержания вышеуказанных компонентов на различных этапах процесса брожения была разработана система из трех ферментных биосенсоров, чувствительными элементами которых являются графитовые печатные электроды (ООО «Русенс», Россия), модифицированные углеродными нанотрубками (длина 1 – 10 мкм, средний диаметр 1,5 нм, ООО «Углерод Чг», Россия) и ферментами (глюкозооксидазой, лактатоксидазой, и смесью γ-амилазы и глюкозооксидазы).

Использование одностенных углеродных нанотрубок для прямой передачи электронов, образующихся в ходе биохимических реакций на электрод позволяет обойтись без определения концентрации одного из субстратов или продуктов ферментативной реакции и без использования медиаторов электронного транспорта. В данном случае, прямой электронный транспорт возможен при окислительно-восстановительном потенциале простетической группы используемых ферментов. Наличие прямого переноса электронов в данных системах на основе иммобилизованных ферментов и УНТ доказано методом циклической вальтамперометрии.

Для данной системы диапазон определяемых концентраций крахмала составил 0,6-21 мг/л, глюкозы – 0,8-3,4 мМ, лактата – 5-80 мМ; коэффициенты чувствительности для биосенсоров составили соответственно 30±1 нА•л/мг крахмала, 1600±100 нА/мМ глюкозы и 30±1 нА/мМ лактата. Полученные характеристики существенно превосходят характеристики большинства описанных аналогов.

Проведена апробация системы биосенсоров на образцах кваса, вина и бродильной массы. Референтными методами являлись капиллярный электрофорез (лактат, глюкоза) и спектрофотометрия с предварительным гидролизом (крахмал). Сравнение результатов анализа с использованием системы биосенсоров и референтным методом показало, что полученные значения различаются незначимо.

Таким образом, полученная система ферментных биосенсоров обладает высокими аналитическими и метрологическими характеристиками, и может применяться для определения содержания лактата, глюкозы и крахмала в бродильных средах. Использование биосенсоров на основе электродов, модифицированных углеродными наноматериалами позволит снизить стоимость анализаторов и существенно повысит их точность и надежность.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, договор № 14.Z56.16.5425-МК и гранта РФФИ и Правительства Тульской области № 16-48-710959 р_а.

SYSTEM OF BIOSENSORS BASED ON SCREEN-PRINTED ELECTRODES MODIFIED WITH CARBON NANOTUBES AND ENZYMES TO CONTROL BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES

V.Arlyapov, S.Kamanin

Tula State University, Russia, 300012, Tula, prospekt Lenina, 92

System of biosensors based on screen-printed electrodes modified with carbon nanotubes and different enzymes was obtained and tested. The system could be used for the simultaneous determination of glucose, lactate and starch in a mixture with minimal sample preparation.

Key words: biosensor, screen-printed electrode, carbon nanotubes.

Development of inexpensive determination methods of multiple substances in the mixture is one of the most promising directions of analytical methods development. Amperometric biosensors based on modified screen-printed electrodes are convenient and cost effective platform to create an assay device with the required characteristics. Biotechnological feed is a mixture of a large number of compounds of different classes, making it difficult to control the status of such a complex system. However, the content of starch, glucose, and lactate in the fermentation medium in time is an indicator of quality of the fermentation process. For differential evaluation of the content of glucose, lactate and starch during various stages of fermentation, the system of three enzyme

biosensors has been developed, each of them includes sensing element of screen-printed graphite electrode (LLC «Rusens», Russia), modified with carbon nanotubes (length 1 - 10 microns, average diameter 1.5 nm, LLC «Carbon Chg», Russia) and enzymes (glucose oxidase, lactate oxidase, and a mixture of γ-amylase and glucose oxidase).

Using of single-walled carbon nanotubes for the direct electron transfer between enzyme and electrode eliminates the need for determining concentration of substrate or product of enzymatic reaction, and using of electron transfer mediators. In our case, the direct electron transport is possible with the redox potential of the enzyme prosthetic group applied.

For our biosensor system detection range of starch was 0,6-21 mg·l-1, glucose - 0,8-3,4 mM, lactate - 5-80 mM; sensitivity coefficients for biosensors were respectively 30±1 nA•dm3•mg-1 of starch, 1600±100 nA•mM-1 of glucose and 30±1 nA•mM-1 of lactate. These characteristics significantly superior characteristics of most of these analogs.

The approbation of developed biosensor system on kvass, wine and fermentation mass samples was carried out. Capillary electrophoresis (lactate, glucose determining) and spectrophotometry with prior hydrolysis (starch determining) were selected as reference methods. Comparison of analysis results provided with using the biosensor system and the reference method showed that the values differ insignificantly.

Thus, the resulting system of enzyme biosensor has high analytical and metrological characteristics, and can be used for the determination of lactate, glucose and starch in the fermentation media. Applying of biosensors based on electrodes modified by carbon nanomaterials will lower the cost of analytical equipment and significantly increase its accuracy and reliability.

Grant: The work was supported by a grant of President of Russian Federation for state support of young Russian scientists - PhD, contract № 14.Z56.16.5425-MK and the RFBR and Government of Tula region grant 16-48-710959 r_a.

УДК 577.29.

МОДИФИКАЦИЯ ГЕНА SPCAS9 ДЛЯ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ CRISRP/CAS9 СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Армянинова Д. К., Карпов Д. С.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН), Москва, Россия
119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.
Российский университет дружбы народов, Москва, Россия
117198, Москва, ул. Миклухо - Маклая, д. 10 к.2.
e-mail: aleom@yandex.ru

Революционная система редактирования генома – CRISPR/Cas9 – имеет серьезные недостатки. С целью преодоления этих недостатков получены мутантные формы Cas9 и разработан простой метод оценки ключевых свойств Cas9.

Ключевые слова: CRISPR, Cas9, редактирование генома

В революционной технологии редактирования генома используется прокариотическая система адаптивного «иммунного» ответа против чужеродной ДНК – CRISPR/Cas9 система II типа из Streptococcus pyogens (Меланьина Л.А. и др., 2016). Редактирование генома происходит с участием комплекса РНК-зависимой ДНК-эндонуклеазы Cas9 и химерной направляющей РНК, имеющей участок, комплементарный целевому участку в геноме. Третий важный компонент системы – PAM – это короткая (длиной 3-5 нт) последовательность, которая специфично распознается эндонуклеазой Cas9. Комплекс Cas9/sgRNA осуществляет поиск целевого участка, и, если слева от него находится PAM, то после конформационных изменений Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в ДНК (Sontheimer and Barrangou, 2015).

CRISPR/Cas9 система успешно использована в изменении геномов практически всех модельных организмов прокариот, низших и высших эукариот. Кроме того, CRISPR/Cas9 система успешно использована в терапевтических целях для уничтожения провируса СПИДа интегрированного в геном клеточных линий человека (Kaminski et al., 2016), а также удаления эписомных форм вирусов гепатита (Kennedy et al., 2015) и герпесвирусов (Ferdy R. van Diemen et al., 2016). Разработаны и применены на человеке клеточные технологии для борьбы с раковыми заболеваниями на основе клеток иммунной системы, редактированных системой CRISPR/Cas9 (Cyranoski D., 2016).

Однако, в экспериментах по редактированию мутантного аллеля гена β-глобина, вызывающего бета-талассемию, в трехядерных эмбрионах человека, выявлена одна из слабостей CRISPR/Cas9 системы

– ее низкая специфичность (Liang et al., 2015). Установлено также, что CRISPR/Cas9 может быть неспецифична как к геномной мишени, так и к PAM. Другой серьезный недостаток системы, ограничивающий ее применение в терапевтических целях, – чувствительность к структуре хроматина (Chen et al., 2016). Именно поэтому работа над оптимизацией CRISPR/Cas9 системы является актуальной. Мутирование Cas9 – одна из эффективных стратегий улучшения свойств CRISPR/Cas9 системы. Так, замены D147Y и P411T в rec домене Cas9, повышают эффективность гидролиза ДНК (Bao et al., 2015). Замены K848A, K1003A и R1060A в нуклеазном домене Cas9 повышают общую специфичность фермента (Slaymaker et al., 2016). Также известна замена D1135E в PAM-узнающем домене Cas9, которая повышает специфичность эндонуклеазы к PAM с последовательностью 5'-NGG-3' (Kleinstiver et al., 2015).

Однако до сих пор не создан мутантный Cas9, содержащий все три группы мутаций, которые вместе могут значительно улучшить его специфичность и эффективность гидролиза ДНК в составе хроматина эукариот. Цель данной работы – создать более совершенные версии Cas9 путем объединения мутаций улучшающих его функции.

Мы разработали метод быстрого клонирования мутантных генов Cas9 при помощи рекомбинационного клонирования в дрожжах Saccharomyces cerevisiae. Этим методом мы получили дрожжевые экспрессионные плазмиды, кодирующие формы eSpCas9(1.1) с заменами K848A, K1003A и R1060A, eSpCas9(1.2) с заменами K848A, K1003A, R1060A и D1135E, и eSpCas9(1.3) с заменами K848A, K1003A, R1060A, D1135E, D147Y и P411T (Рис. 1).

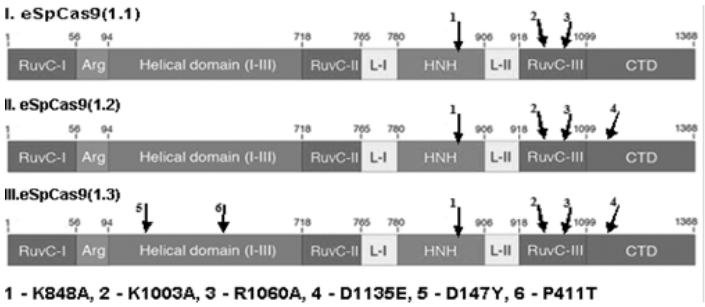


Рисунок 1. Схема положений аминокислотных замен в мутантных формах Cas9.

Более того, разработан метод оценки специфичности мутантных форм Cas9, с использованием дрожжевого штамма PJ69-4A, используемого в двух-гибридной системе. В этом штамме за счет неспецифичного редактирования генома, по-видимому, происходит активация в норме репрессированного гена ADE2, необходимого для синтеза аденина. Вследствие этого, на среде без аденина наряду с розовыми колониями появляются белые. Доля этих белых колоний служит оценкой специфичности системы CRISPR/Cas9.

UDC 577.29

MODIFICATION OF SPCAS9 GENE FOR IMPROVING THE CRISPR/CAS9 GENOME EDITING SYSTEM

Armyaninova D. K., Karpov D.S.

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia,
119991, Moscow, Vavilov str., 32
Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia,
117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 10/2.
e-mail: aleom@yandex.ru

Revolutionary system for genome editing - CRISPR/Cas9 – has serious limitations. To overcome these limitations, we have created mutant forms of Cas9 and developed a simple method for estimation of Cas9 key properties.

Key words: CRISPR, Cas9, genome editing

The revolutionary technology for genome editing utilizes prokaryotic system of adaptive "immune" response against foreign DNA – CRISPR/Cas9 system of II type from Streptococcus pyogens (Melanina L.A. et al., 2016). Genome editing is realized by the complex consisting of RNA-dependent DNA-endonuclease Cas9 and chimeric

guide RNA that has a region complementary to the target genome site. The third important component of the system – PAM – short (3-5 nt long) sequence that is specifically recognized by the Cas9 endonuclease. Cas9/sgRNA complex seeks for target site and if this site has the adjacent PAM then Cas9 after conformational changes makes cleavage in the both strands of DNA (Sontheimer and Barrangou, 2015).

CRISPR/Cas9 system is successfully used to change genomes of all of the model organisms including prokaryotes, lower and higher eukaryotes. Moreover, CRISPR/Cas9 system is successfully used in therapeutic applications to eliminate HIV-1 provirus integrated into genome of human cell lines (Kaminski et al., 2016), and remove episome forms of hepatitis virus (Kennedy et al., 2015) and herpesviruses (Ferdy R. van Diemen et al., 2016). Cell technologies for cancer treatment based on immune cells edited with CRISPR/Cas9 system were developed and for the first time used in human (Cyranoski D., 2016).

However, experiments on editing mutant allele of β-globin causing beta thalassemia, in the tripronuclear (3PN) human zygotes elucidate on of the limitations of the CRISPR/Cas9 system – its low specificity (Liang et al., 2015). It has been found that CRISPR/Cas9 system can be non-specific not only for genome target but also for PAM. Next serious drawback of the system, limiting its therapeutic applications is the sensitivity to the chromatin structure (Chen et al., 2016). That is why the work on optimization of the CRISPR/Cas9 system is actual. Cas9 mutation is one of the efficient strategies for improving properties of the CRISPR/Cas9 system. So, mutations D147Y and P411T in the rec domain of the Cas9 increase effectiveness of DNA hydrolysis (Bao et al., 2015). Mutations K848A, K1003A and R1060A in the nuclease domain of Cas9 increase the general specificity of the enzyme (Slaymaker et al., 2016). There is a mutation D1135E in the PAM-recognition domain of Cas9 that increases specificity of the endonuclease to the PAM with sequence 5'-NGG-3' (Kleinstiver et al., 2015).

However, till now the mutant Cas9 is not created that carries all of the three groups of mutations that together may significantly improve its specificity and effectiveness of DNA hydrolysis in the context of eukaryotic chromatin. The aim of this work is to create improved versions of Cas9 by combining known mutations that improve its functions.

We have developed rapid method for cloning mutant Cas9 genes using recombinational cloning in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Using this method, we have obtained yeast expression plasmids encoding such Cas9 derivatives as eSpCas9(1.1) bearing mutations K848A, K1003A and R1060A, eSpCas9(1.2) bearing mutations K848A, K1003A, R1060A and D1135E and eSpCas9(1.3) bearing mutations K848A, K1003A, R1060A, D1135E, D147Y and P411T (Fig. 1).

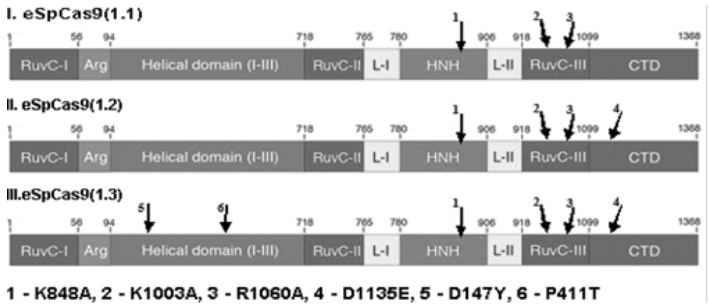


Figure 1. Schemes of mutations in the mutant forms of Cas9 proteins.

Moreover, we have developed a method to estimate specificity of different Cas9 mutant forms based on yeast strain PJ69-4A that is used in two-hybrid system. It seems that in this strain due to non-specific genome editing ADE2 gene required for adenine biosynthesis becomes activated though normally it is repressed. Therefore, yeasts growing on the medium lacking adenine form white colonies together with pink colonies. The quantity of white colonies is used to estimate the CRISPR/Cas9 system specificity.

References:

Armyaninova D.K., Karpov D.S., Yarygina E.I. CRISPR/Cas-system as a molecular tool for therapy of genetic diseases of animals and human. // Veterinary, zootechny and biotechnology. 2016. №4. P. 75 – 79.

Bao Z, Xiao H, Liang J, Zhang 1, Xiong X, Sun N, Si T, Zhao H. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in Saccharomyces cerevisiae // ACS Synth Biol. 2015 May 15;4(5):585-94.

Chen X., Rinsma M., Janssen J. M., Liu J., Maggio I., Goncalves M. A. Probing the impact of chromatin conformation on genome editing tools // Nucleic Acids Res. 2016. 44(13), 6482–6492.

Cyranoski D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time // Nature. 2016. Nov 24; 539 (7630): 479. doi:10.1038/nature.2016.20988.

Edward M. Kennedy, Leda C.Bassit, Henrik Mueller, Anand V.R. Kornepati, Hal P. Bogerd, Ting Nie, Payel Chatterjee,

Hassan Javanbakht, Raymond F. Schinazi, Bryan R. Cullen. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. // Virology. 2015. 476, P.196–205.
Ferdy R. van Diemen, Elisabeth M. Kruse, Marjolein J. G. Hooykaas, Carlijn E. Bruggeling, Anita C. Schürch, Petra M. van Ham, Saskia M. Imhof, Monique Nijhuis, Emmanuel J. H. J. Wiertz, Robert Jan Lebbink. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Herpesviruses Limits Productive and Latent Infections. // PLoS Pathog. 2016. 12(6): e1005701.
Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Y, Karn J, Hu W, Khalili K. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing // Sci Rep. 2016 Mar 4;6:22555. doi: 10.1038/srep22555.
Kleinstiver, B.P., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Topkar, V.V., Nguyen, N.T., Zheng, Z., Gonzales, A.P., Li, Z., Peterson, R.T., Yeh, J.R., Aryee, M.J., Joung, J.K. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities // Nature. 2015. №523. P.481 – 485.
Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., Huang, J. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes // Protein Cell. 2015. №6. P.363—372.
Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., Zhang, F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity // Science. 2016. №351. P.84 - 88.
Sontheimer E. J., Barrangou R. The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution // Human Gene Therapy. — 2015. — Vol. 26, no. 7. — P. 413—424. — DOI:10.1089/hum.2015.091. — PMID 26078042.

УДК: 636.2:619:579.881.31:577.21:579.083.1, ББК:

ПЦР ДИАГНОСТИКА АНАПЛАЗМОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

А.Л.Архипова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий» , Россия, 127422, Москва, Костякова, 12/4, info-ceerb@mail.ru, 8 915 049 68 43

Разработана тест-система для дифференцированного выявления A. marginale в крови крупного рогатого скота методом ПЦР в реальном времени. Чувствительность метода позволяет выявлять от 100 копий гена msp4 A. marginale в анализируемом образце ДНК. Специфичность метода позволяет дифференцировать A. marginale от других видов анаплазм.

Ключевые слова: анаплазмоз, Anaplasma marginale; крупный рогатый скот; ПЦР; msp4.

Анаплазмоз крупного рогатого скота (КРС) — трансмиссивное инфекционное заболевание, вызываемое риккетсиями Anaplasma marginale (отряд Rickettsiales, семейство Anaplasmatacea). Анаплазмоз КРС приносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам вследствие потерь молочной и мясной продуктивности и гибели скота и зарегистрирован во многих тропических и субтропических странах [1]. В Российской Федерации неблагополучными по анаплазмозу являются Центральный, Северо-Западный, Приволжский и Уральский ФО [2, 3].

Своевременная диагностика играет решающую роль в предотвращении распространения инфекционных заболеваний. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени сочетает в себе высокую специфичность и возможность количественной оценки патогена. Нами была разработана тест-система для дифференцированного выявления A. marginale в крови КРС на основе ПЦР в реальном времени. В качестве мишени для амплификации был выбран однокопийный ген msp4. В результате анализа нуклеотидных последовательностей гена msp4 разных изолятов A. marginale и близкородственных видов анаплазм были выявлены характерные для A. marginale участки, на основе которых были разработаны видоспецифичные праймеры и зонд для амплификации и детекции фрагмента гена msp4 длиной 177 пар нуклеотидов методом ПЦР в реальном времени. Чувствительность метода позволяет выявлять от 100 копий гена msp4 A. marginale в анализируемом образце ДНК. Специфичность метода позволяет надежно дифференцировать A. marginale от других видов анаплазм (A. ovis, A. bovis, A. centrale, A. phagocytophilum, A. platys).

Разработанный нами метод позволяет проводить оценку бактериальной нагрузки в крови КРС на основе стандартной кривой, полученной с использованием разработанной нами плазмиды pGEM, содержащей фрагмент гена msp4 A. marginale. В целях апробации разработанного нами метода были исследованы 30 образцов крови КРС. По результатам проведенного исследования 23% животных оказались анаплазмоносителями, с уровнем паразитемии от 3,01×104 до 5,42×105 анаплазм на мл крови.

Разработанный нами метод ПЦР диагностики анаплазмоза КРС может быть использован для раннего выявления зараженных животных с определением бактериальной нагрузки в целях принятия дальнейших мер для предотвращения распространения анаплазмоза КРС, для оценки эффективности вакцин против анаплазмоза КРС и для мониторинга эффективности лечения инфицированных животных.

Литература.
1. Kocan K.M. The natural history of Anaplasma marginale / J. de la Fuente, E. F. Blouin, J. F. Coetzee, S. A. Ewing // Vet. Parasitol. – 2010 – V. 167. – P. 95-107. 2. Гулюкин М.И., Заблоцкий В.Т., Белименко В.В. Мониторинг эпизоотической ситуации по протозойным кровепаразитарным болезням домашних животных в Российской Федерации - 2007-2012. Российский ветеринарный журнал СХЖ, 2013, 2 С.36-40. 3. Либерман Е.Л., Хлызова Т.А. Зависимость инвазирования крупного рогатого скота анаплазмозом от численности насекомых комплекса «Гнус» // Educatio. – 2015. – № 3. – С. 46-50.

PCR DIAGNOSTICS OF BOVINE ANAPLASMOSIS

A.Arkhipova

Federal State Budget Scientific Institution Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies, Russia, 127422, Moscow, Kostyakova, 12/4

A test system for the differentiated detection of A. marginale in the blood of cattle with real-time PCR was developed. The sensitivity of the method allows detecting 100 copies of the A. marginale msp4 gene in the analyzed sample of DNA. The specificity of the method allows differentiating between A. marginale and other Anaplasma.species.

Key words: anaplasmosis, Anaplasma marginale, cattle, PCR, msp4

Bovine anaplasmosis is a vector-born infectious disease caused by the rickettsia Anaplasma marginale (order Rickettsiales, family Anaplasmatacea). Bovine anaplasmosis causes significant economic losses to farmers because of decreasing milk and meat productivity of cattle and animals. Bovine anaplasmosis is registered in many tropical and subtropical countries [1], in Russian Federation - in Central, North-Western, Volga and Ural Federal Districts [2, 3].

Early diagnosis is crucial in preventing the spread of this infectious disease. Real-time polymerase chain reaction (PCR) combines high specificity and possibility of pathogens quantification. We have developed a PCR diagnostics for differential detection of A. marginale in cattle blood based on real-time PCR. For the detection, the single-copy msp4 gene was selected. Analysis of nucleotide sequences of msp4 gene from different isolates of A. marginale and closely related Anaplasma species was performed and species-specific primers and TaqMan probe for amplification and detection of 177 bp fragment of A. marginale msp4 gene were designed. Sensitivity of the assay allows detection of 100 copies of A. marginale msp4 gene in a sample. Specificity of the assay allows reliable differentiating between A. marginale and other Anaplasma species (A. ovis, A. bovis, A. centrale, A. phagocytophilum, A. platys).

Our PCR assay allows the evaluation of the bacterial load in the blood of cattle on the basis of standard curve obtained with plasmid pGEM containing fragment of A. marginale msp4 gene. 30 samples of cattle blood were tested by our PCR assay and 23.3% of animals were found to be anaplasmosis carriers with parasitaemia level ranging from 3.01 × 104 to 5.42 × 105 bacteria per ml of blood.

Our PCR assay can be used for early detection of infected animals with the estimating bacterial load to prevent the spread of bovine anaplasmosis, to evaluate the effectiveness of vaccines against bovine anaplasmosis and treatment of infected animals with antirickettsial drugs.

References:
1. Kocan K.M. The natural history of Anaplasma marginale / J. de la Fuente, E. F. Blouin, J. F. Coetzee, S. A. Ewing // Vet. Parasitol. - 2010 - V. 167. - P. 95-107. 2. Gulyukina MI, Zablocki VT, VV Belimenko Monitoring epizootic situation protozoan blood parasite diseases of domestic animals in the Russian Federation - 2007-2012. The Russian Veterinary Journal SHG, 2013 2 S.36-40. 3. EL Lieberman, Hlyzova TA Dependence infestation bovine anaplasmosis on the number of insects «midges» complex // Educatio. - 2015. - № 3. - S. 46-50.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ИОНОВ ТЕРБИЯ ЛЕГИРОВАННЫЙ С ДИПИКОЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

А.А.Бакал, Д.В.Шпунтова, А.М.Вострикова, И.Ю.Горячева

Саратовский государственный университет , Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83, artembakal95@gmail.com, 8-937-148-44-94

Особенностью лантанидов соединений является микросекунды диапазон люминесценции, которая устраняет фоновые флуоресценции и рассеяния. Другой особенностью лантанидов является возможность использовать их для проектирования датчиков FRET основе. Для возбуждения люминесценции лантаноидов необходим лазер с высокой емкости или передачи энергии от сенсибилизатора (так называемый антенный эффект). В данной работе влияние ионной силы, pH и ионной микроволновой печи на тербия и тербия комплексе с дипиколиновая acidwas исследованы и вариации спектров люминесценции и времени жизни было показано.

Ключевые слова: дипиколинат тербия, ионы лантаноидов, сенсибилизация

В нашей работе были изучены влияние pH среды и СВЧ излучения на люминесцентные характеристики комплекса дипиколината тербия. Значения времени жизни люминесценции были измерены в зависимости от концентрации тербия, дипиколиновой кислоты и pH. Максимальная фотолюминесценции была получена для водных растворов дипиколината тербия.

Использование комплексных соединений лантаноидов в качестве высокочувствительные фотолюминесцентных меток для биоаналитических исследований с конца прошлого века. Комплексные соединения лантаноидов обладают широким спектром возбуждения и узкими полосами испускания самих лантаноидов [1]. Испускание лантаноидов применяется в иммуноанализе, ДНК-анализе, других видах биологических исследований. Другой особенностью лантанидов является возможность использовать их для проектирования сенсоров на основе флуоресцентного индуктивно-резонансного переноса энергии.

Влияние фоновой биологической люминесценции, которая находится в наносекундном диапазоне, исключается из-за временной задержки при регистрировании люминесценции лантаноидов. Это позволяет повысить чувствительность анализа и увеличить соотношение сигнал/фон. В связи с этим использование испускания лантаноидов в различных вариантах меток и систем является перспективным.

При прямом воздействии на ионы лантаноидов(III) не всегда можно достичь высокий квантовый выход люминесценции. Для увеличения интенсисности люминесценции используют технику непрямого возбуждения («Эффект антенны») через сенсибилизатор [2-6]. В нашей работе в качестве «антенны» применяли дипиколиную кислоту. На рис.1 показаны возможные сформированные типы комплексов образованные ионом тербия и ионом дипиколиновой кислоты [7-12].

Целью нашей работы являлось изучение влияние ионной силы, pH и СВЧ излучения на люминесценцию ионов тербия и комплексов тербия с дипиколиновой кислотой. Были проведены эксперименты по определению зависимости люминесцентных свойств дипиколината тербия от разбавления. Помимо этого, было изучено влияние растворителей на люминесцентные свойства дипиколината тербия. Так же изучено влияние pH среды и ионной силы на люминесцентные свойства хлорида тербия. Исходя из полученных данных сделан вывод, что в качестве растворителя необходимо использовать дипиколиновую кислоту с концентрацией 10-4 М. Изучено, что pH = 8 оказывает влияние исключительно на время жизни хлорида тербия. При использовании буферных растворов с pH = 1 и 5,5 ухудшение люминесцентных свойств хлорида тербия связано с разбавлением.

THE LUMINESCENT PROPERTIES OF TERBIUM IONS DOPED WITH DIPICOLINIC ACID UNDER VARIOUS CONDITIONS

A.Bakal, D.Shpuntova, A.Vostrikova, I.Goryacheva

Saratov State University, Russia, 410012, Saratov, Astrakhan, 83

A special feature of the lanthanide compounds is microsecond luminescence range which eliminates background fluorescence and scattering. Other feature of lanthanides is the possibility to use them for designing the FRET-based sensors. For the excitation the luminescence of lanthanide required laser with high-capacity or energy transfer from the sensitizer (the so-called antenna effect). In this work the effect of ionic strength, pH, and microwave on ion terbium and terbium complex with dipicolinic acidwas investigated and variations of luminescence spectra and the lifetime was shown.

Key words: dipicolinates terbium lanthanide ions, sensitization

In our work we studied the effect of pH and microwave radiation on the fluorescent characteristics of the

complex dipicolinates terbium. Luminescence lifetime values were measured according to the concentration of terbium, dipicolinic acid and pH. Maximum photoluminescence was obtained for aqueous solutions dipicolinates terbium.

The use of lanthanide complexes as highly sensitive photoluminescent labels for bioanalytical studies in the last century. Lanthanide complex compounds have a wide range of excitation and emission of narrow strips of lanthanides themselves [1]. lanthanide emission is used in an immunoassay, DNA analysis, other forms of biological research. Another feature of the Lanthanides is possible to use them to design sensors based on fluorescence resonance energy inductively transfer.

Biological effect of background luminescence, which is in the nanosecond range is excluded from the temporary delay registering lanthanide luminescence. This makes it possible to increase the sensitivity of analysis and increased signal / background. In this regard, the use of lanthanide emission labels in different embodiments and systems is promising.

In a direct impact on the lanthanide ions (III) is not always possible to achieve a high luminescence quantum yield. To increase intensisnosti luminescence using indirect excitation technique («antenna effect») through a sensitizer [2-6]. In our work as an «antenna» used dipikolinuyu acid. Figure 1 shows the possible types of formed complexes formed by ion terbium ion and dipicolinic acid [7-12].

The aim of our study was to investigate the effect of ionic strength, pH, and microwave radiation on the luminescence of ions of terbium and terbium complexes with dipicolinic acid. Experiments were conducted to determine the dependence of the luminescence properties of terbium dipicolinates dilution. In addition, we studied the effect of solvents on the luminescent properties dipicolinates terbium. Also studied the influence of pH and ionic strength of the medium on the fluorescent properties of terbium chloride. Based on these data it is concluded that the solvent dipicolinic acid should be used at a concentration of 10-4 M. studied that pH = 8 only influences on the lifetime of terbium chloride. When using a buffer solution with pH = 5.5 and 1 deterioration chloride terbium luminescence properties associated with dilution.

References:
1. Selvin P.R. Annu. Rev. Principles and biophysical applications of lanthanide-based probes // Bio phys. Biomembr. 2002. Vol. 31. P. 275–302. 2. Weissman, S.I. Intramolecular Energy Transfer The Fluorescence of Complexes of Europium // J. Chem. Phys.1942. Vol. 10. P. 214–217. 3. Whan, R.E., Crosby, G.A. Spectroscopic studies of rare earth chelates // J. Mol. Spectrosc. 1962. Vol. 8. P.315–327. 4. Balzani, V. // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 1990. Vol. 51. P.55–62. 5. Crosby, G.A., Whan, R.E., Alire, R.M. Mechanism of Energy Transfer in Some Rare-Earth Chelates // J. Chem. Phys. 1961. Vol. 34. P. 743–748. 6. Crosby, G.A., Whan, R.E., Freeman, J.J. Spectroscopic studies of rare earth chelates // J. Phys. Chem. 1962. Vol. 66. P. 2493–2499. 7. D. L. Rosen, S. Niles Chelation Number of Terbium Dipicolinate: Effects on Photoluminescence Lifetime and Intensity // Appl. Spectrosc. 2001. Vol. 55. P. 208-216. 8. Richardson F. S. Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminescent Probes and Stains for Biomolecular Systems // Chem. Rev. 1982. Vol. 82. P. 541-552. 9. Haas Y., Stein G. Pathways of Radiative and Radiationless Transitions in Europium(III) Solutions: the Role of High Energy Vibrations // J. Phys. Chem. 1971. Vol. 75. P. 3677-3681. 10. Haas Y., Stein G. Radiative and Nonradiative Pathways in Solution: Excited States of the Europium(III) Ion // J. Phys. Chem. 1972. Vol. 76. P. 1093-1104. 11. Gallagher P. K. Fluorescence of Trivalent Europium in D2O-H2O Mixtures // J. Chem. Phys. 1965. Vol. 43. P.1742-1744. 12. Yuan J., Matsumoto K. Synthesis of a new tetradentate β-diketonate-europium chelate and its application for time-resolved fluorimetry of albumin // Biomed. Anal. J. Pharm. 1997. Vol. 15. P. 1397– 1403.

УДК: 57.088, ББК: Е.с512

АЛГОРИТМ ПРЕДСКАЗАНИЯ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Е.А.Бакин[1], М.Д.Аксешнина[2], М.К.Папков[3], Р.Р.Сулейманов[4], Е.С.Сюгис[5]

[1]Санкт-Петербургский Государственный Университет Аэрокосмического Приборостроения, Российская Федерация, 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 67, jenyb@vu.spb.ru, +7-905-252-54-81
[2]Санкт-Петербургский Академический Университет, Российская Федерация, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8/3-А, novmargo@gmail.com, +7-921-582-84-70
[3]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Российская Федерация, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29, mikhail.papkov@gmail.com, +79117182732
[4]ЗАО Биокад, Российская Федерация, 192007, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 140, rail.suleymanov@gmail.com, +79817129128
[5]Тартуский Университет, Estonia, 50090, Тарту, Ülikooli str., 18, elena. sugis@gmail. com, +79817129128

Для предсказания белок-белковых взаимодействий (ББВ), ассоциированных с болезнью Альцгеймера, предлагается двухступенчатый алгоритм классификации, эффективно использующий как небольшой объем размеченных данных (известные ББВ, ассоциированные с болезнью Альцгеймера), так и большой объем неразмеченных данных (множество всех известных ББВ человека).

Ключевые слова: белок-белковые взаимодействия, предсказание связей, унарный классификатор, PU-классификатор, болезнь Альцгеймера

В настоящее время большое количество научных публикаций посвящено исследованию процессов старения, а так же общих дегенеративных процессов в мозге человека. Эти исследования выявили множественные ассоциации различных генов и белков с возникновением таких нейродегенеративных болезней, как синдром Альцгеймера [1-2]. Публикация результаты подобных экспериментов в открытых базах данных создает предпосылки к использованию современных методов анализа заболеваний in silico [3-4].

Основной целью проекта было предсказание новых, неизвестных белок-белковые взаимодействия (ББВ), ассоциированные с болезнью Альцгеймера, по имеющемуся небольшому набору известных ББВ, а так же большому вспомогательному массиву неразмеченных данных. Для обучения алгоритма предсказания были использованы данные из баз IntAct, KEGG и DESEASE. Вся использованная информация была объединена в один многослойный раскрашенный граф, в котором, каждая вершина соответствовала белок-кодирующему гену, а ребро – наличию специфической связи (ББВ, коэкспрессии, дифференциальной коэкспрессии и пр.). Из полученного графа для каждой пары генов был вычислен вектор предикторов (кратчайшее расстояние, метрика Жаккара, и присутствие в сигнальных путях болезни Альцгеймера).

Полученный набор предикторов был использован для создания двухступенчатого классификатора, построенного по принципу PU (positive-unlabeled) [5]. На первом этапе с помощью размеченных данных из положительного класса (известные ББВ, ассоциированные с болезнью Альцгеймера) было проведено обучение унарного классификатора. Путем обработки неразмеченных данных унарным классификатором были получены данные, предположительно принадлежащие негативному классу (ББВ, не ассоциированные с болезнью Альцгеймера). На втором этапе, на основе данных, принадлежащих обоим классам, было произведено обучение стандартного классификатора SVM.

Применение описанного двухступенчатого классификатора позволило значительно уменьшить количество пар белок-кодирующих генов – кандидатов для лабораторных исследований на предмет ассоциированности с болезнью Альцгеймера. Представляет интерес рассмотрение других предикторов, используемых при построении классификатора

Литература.
1. Hu W., Lin X., Chen K. Integrated analysis of differential gene expression profiles in hippocampi to identify candidate genes involved in Alzheimer's disease // Mol Med Rep. — 2015. — Nov. — Vol. 12, no. 5. — P. 6679–6687. 2. The construction of common and specific significance subnetworks of Alzheimer's disease from multiple brain regions / W. Kong, X. Mou, N. Zhang et al. // Biomed Res Int. — 2015. — Vol. 2015. — P. 394260. 3. Mining disease genes using integrated protein-protein interaction and gene-gene coregulation information / J. Li, L. Wang, M. Guo et al. // FEBS Open Bio. — 2015. — Vol. 5. — P. 251–256. 4. Genomic convergence and network analysis approach to identify candidate genes in Alzheimer's disease / P. Talwar, Y. Silla, S. Grover et al. // BMC Genomics. — 2014. — Mar. — Vol. 15. — P. 199. 5. Positive-unlabeled learning for the prediction of conformational B-cell epitopes / J. Ren, Q. Liu, J. Ellis, J. Li // BMC Bioinformatics. — 2015. — Vol. 16 Suppl 18. — P. S12.

ALGORITHM FOR PREDICTION OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS ASSOCIATED WITH ALZHEIMER`S DISEASE

E.Bakin[1], M.Akseshina[2], M.Papkov[3], R.Suleymanov[4], E.Sügis[5]

[1]St. Petersburg State University of Aerospace Instrumentation, Russian Federation, 190000, Saint-Petersburg, Bolshya Morskaya str., 67
[2]St. Petersburg Academic University, Russian Federation, 194021, Saint-Petersburg, Khlopina str., 8/3-A
[3]Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University, Russian Federation, 195251, Saint-Petersburg, Politechnicheskaya str., 29
[4]Biocad Ltd., Russian Federation, 192007, Saint-Petersburg, Ligovsky avn., 140
[5]University of Tartu, Estonia, 50090, Tartu, Ülikooli str., 18

For prediction of protein-protein interactions associated with Alzheimer's disease, we propose a two-stage classification algorithm in which both moderate set of highly confident known PPIs and a large amount of unlabeled auxiliary data are used.

Key words: protein-protein interaction, link prediction, unary classification, PU-classification, Alzheimer`s disease

Nowadays, a large amount of studies are devoted to an investigation of brain ageing as well as degenerative processes. These research have depicted a strong association of various genes and proteins with a potential cause of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease [1-2]. The results of such experiments are deposited in various databases, which can be used for effective mining of a certain type of a biological data. This creates new opportunities for application of modern machine learning (ML) methods for a deeper in silico analysis of diseases, including prediction of some particular facts which are not currently known by a scientific community [3-4].

Following this principle, in our research we have applied ML methods for investigation of protein-protein interactions (PPI) associated with Alzheimer's disease. The aim was prediction of unknown PPIs by a moderate set of highly confident known PPIs and a large amount of unlabeled auxiliary data. In order to address this issue we have combined several datasets: filtered IntAct, KEGG, DISEASES. All the used data was joined in one multilayered graph by means of genes and proteins unification at the Ensemble ID level. Hence, each vertex represented a gene, while an edge represented existence of specific interaction (PPI, coexpression, etc.). From this graph for every pair of genes we have extracted a set of predictors (distances, Jaccard similarity and presence of these genes in Alzheimer pathways).

This set of predictors was used in classifier, which was build according to a positive-unlabeled (PU) classification principle [5]. In the first step we built unary classifier based on one-class SVM (outlier detector, OD) and fit it via known PPIs in Alzheimer's disease (positive samples). Processing of unlabeled data with OD gives a set of estimated negative samples. In the second step a conventional two-class SVM was fit via positive and estimated negative samples. Parameters of two-class SVM were adjusted by means of ROC-curves calculated via LOO cross-validation.

Application of described two-step classifier showed significant reduction of amount of genes pairs which can be potentially involved in PPIs associated with Alzheimer's disease. An analysis of other predictors usage in classifier is of a great interest.

References:
1. Hu W., Lin X., Chen K. Integrated analysis of differential gene expression profiles in hippocampi to identify candidate genes involved in Alzheimer's disease // Mol Med Rep. — 2015. — Nov. — Vol. 12, no. 5. — P. 6679–6687. 2. The construction of common and specific significance subnetworks of Alzheimer's disease from multiple brain regions / W. Kong, X. Mou, N. Zhang et al. // Biomed Res Int. — 2015. — Vol. 2015. — P. 394260. 3. Mining disease genes using integrated protein-protein interaction and gene-gene coregulation information / J. Li, L. Wang, M. Guo et al. // FEBS Open Bio. — 2015. — Vol. 5. — P. 251–256. 4. Genomic convergence and network analysis approach to identify candidate genes in Alzheimer's disease / P. Talwar, Y. Silla, S. Grover et al. // BMC Genomics. — 2014. — Mar. — Vol. 15. — P. 199. 5. Positive-unlabeled learning for the prediction of conformational B-cell epitopes / J. Ren, Q. Liu, J. Ellis, J. Li // BMC Bioinformatics. — 2015. — Vol. 16 Suppl 18. — P. S12.

УДК: 577.3

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ РАСТЕНИЕ-ПАТОГЕН НА ПРИМЕРЕ МХА PHYSCOMITRELLA PATENS И БАКТЕРИЙ РОДОВ PSEUDOMONAS И XANTHOMONAS.

Н.А.Бараева, Е.Д.Егорова, С.В.Виноградова

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; Институт биоинженерии, Россия, 117312, Москва, пр-т 60-летия Октября , 7, svetlana.vinogradova@biengi.ac.ru, +7 (499) 135-73-19

Мхи относятся к высшим растениям, в жизненном цикле которых преобладает стадия гаплоидного гаметофита. Мох Physcomitrella patens имеет большой потенциал в качестве модельной системы для исследования взаимодействия растений с патогенными микроорганизмами. Целью данной работы является изучение взаимодействия мха P. patens с фитопатогенными бактериями родов Pseudomonas и Xanthomonas на разных стадиях патогенеза.
Ключевые слова: Мох Physcomitrella patens, метаболомный профайлинг, анализ транскриптома, дифференциальная экспрессия

Мхи относятся к высшим растениям, в жизненном цикле которых, в отличие от цветковых растений, стадия гаплоидного гаметофита преобладает над диплоидным спорофитом. Общий предок мхов и цветковых растений возник около 480 млн. лет назад. В настоящее время мох Physcomitrella patens является модельным объектом для изучения клеточной биологии и эволюционных процессов (Cove D., 2005). Одним из наиболее важных аспектов анализа мха P. patens является изучение механизмов адаптации растения к абиотическим и биотическимстрессам. Полученные данные могут дать представление о регуляторных механизмах, возникших на ранних этапах эволюции растений (Kroemer K.,et al., 2004).

Мох P.patens имеет большой потенциал в качестве модельной системы для исследования взаимодействия растений с патогенными микроорганизмами. Ранее было показано, что P. patens восприимчив к заражению грибами и оомицетами, которые колонизируют мох и размножаются в тканях растения. В ответ на инфекцию P. patens активизирует защитные механизмы, аналогичные цветковым растениям, таким какнакопление активных форм кислорода (reactiveoxygenspecies, ROS), апоптоз клеток, утолщение клеточной стенки и индукцию защитных генов, таких как PAL, LOX, CHS и PR-1 (Ponce de León I., 2011).

Целью нашей работы является изучение взаимодействия мха P. patens с биотрофными фитопатогенными бактериями родов Pseudomonas и Xanthomonas на разных стадиях патогенеза.

В работе были использованы штаммы бактерий Xanthomonasarboricola, Pseudomonassyringae и Pseudomonasviridiflava. В естественных условиях фитопатогенные бактерии, относящиеся к виду X. arboricola, могут вызывать поражение плодовых древесных растений семейства Розоцветные (Rosaceae), подсемейства Сливовые (Prunoideae), а также лещины (Corylus) и грецкого ореха (Juglansregia). Бактерии рода Pseudomonas являются фитопатогенами многих сельскохозяйственных культур и вызывают корневые гнили, некрозы стеблей и листьев.

Патогенность изучаемых штаммов для P. patens была подтверждена с помощью цитологических методов. Метаболомный профайлинг P. patens, инокулированногоX. arboricola, P. syringae и P. viridiflava, выполняли на нескольких стадиях патогенеза. Гаметофоры P. patens культивировали на агаризованной питательной среде Кнопа и инокулировали суспензиями (OD 0,4) бактерий. Из гаметофоров на 0-ой, 2-ой, 5-ый, 10-ый, 17-ый и 30-ый дни после инокуляции выделяли метаболиты и определяли их методом GC-MS. В результате было обнаружено 60 метаболитов, преимущественно принадлежащих к соединениям, участвующим в углеродном обмене. Кроме того, во многих образцах гаметофоров были обнаружены сахарные спирты (полиолы), такие как гексит, пентитол и миоинозитол, участвующие в осмопротекции многих покрытосеменных растений (Hoekstra et al., 2001). Также нами была отмечена интенсификация развития симптомов патогенеза при снижении концентраций пальмитиновой (16:0), стеариновой (18:0), олеиновой (9-18:1), линолевой (9,12-18:2) и линоленовой (9,12,15-18:3) кислот, входящих в состав мембранных липидов и триациоглицеролов. На ранних стадиях патогенеза у штаммов P. syringae и X. arboricola по сравнению с контролем интенсифицировалось накопление арахидоновой кислоты, способствующей усилению синтеза защитных веществ в растении, в том числе фенольных соединений, (Rensing et al., 2007).

Анализ транскриптома P. patens проводили на 5-ый день после инокуляции X. arboricola, P. syringae и P. viridiflava. С этой целью из гаметофоров мха выделяли РНК, синтезировали кДНК и секвенировали на приборе SOLiD 3500xl.

В результате работы была доказана патогенность штаммов X. arboricola, P. syringae и P. viridiflava для P. patens. Профилирование метаболитов, образующихся в результате инокуляции мха бактериями родов Pseudomonas и Xanthomonas, подтверждает размножение патогенов в клетках гаметофоров P. patens. Все исследованные нами бактерии индуцировали накопление соединений, необходимых для размножения бактерий в клетках и участвующих в системной устойчивости растений.

Литература.
1. Cove D. The moss Physcomitrella patens//Annu. Rev. Genet. 2005. Vol. 39. – P. 339-358. 2. Lang D., van Gessel, N., Ullrich, K. K., Reski, R. The Genome of the Model Moss Physcomitrella patens//Advances in Botanical Research. 2016. Vol. 78. P. 97-140. 3. Kroemer K., Reski R., Frank W. Abiotic stress response in the moss Physcomitrella patens: evidence for an evolutionary alteration in signaling pathways in land plants//Plant Cell Reports. 2004. Vol. 22. № 11. P. 864-870. 4. Ponce de León I. The Moss Physcomitrella patens as a Model System to Study Interactions between Plants and Phytopathogenic Fungi and Oomycetes//Journal of pathogens. 2011.Vol. 2011. № 2011 5. Hoekstra F. A., Golovina E. A., Buitink, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance// Trends in plant science. 2001. Vol. 6. № 9. P. 431-438. 6. Rensing S. A., Ick J., Fawcett J. A., Lang D. & Reski, R. An ancient genome duplication contributed to the abundance of metabolic genes in the moss Physcomitrella patens// BMC evolutionary biology. 2007. Vol. 7. № 1. P 1.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 13-04-40104 и Гранта Президента РФ №МК-7138.2015.4.

THE STUDY OF PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS IN PHYSCOMITRELLA PATENS MODEL SYSTEM.

N.Baraeva, E.Egorova, S.Vinogradova

Research Center of Biotechnology of the RAS; Institute of Bioengineering, Russia, 117312, Moscow, 60 let Oktjabrja pr-t, 7

Mosses belong to the higher plants with domination of haploid gametophyte generation in a life cycle. The moss Physcomitrella patens has a great opportunity as a model organism for studies of interactions between plants and pathogens. The aim of this study is to explore interactions between moss P. patens and phytopatogenic bacteria Pseudomonas and Xantomonas at different stages of pathogenesis.

Key words: Moss Physcomitrella patens, metabolome profiling, transcriptome analysis, differential expression

Mosses belong to the higher plants with domination of haploid gametophyte generation in a life cycle.The last common ancestor of mosses and flowering plants occurred about 480 million years ago. Nowadays the moss Physcomitrella patens used as a model organism for cell biology and evolution processes studying (Cove D., 2005). Transcriptome assemblies and annotation via BLAST service of P. patens available at web resource cosmoss.org (http://www.cosmoss.org; Lang et al., 2016). One of the most important aspects of moss analyses is to study mechanisms of plant adaptation to abiotic and biotic stresses. These data provides information on the regulatory mechanisms that were developed during land plant evolution (Kroemer K.,et al., 2004).

The moss Physcomitrella patens has a great opportunity as a system for studying interactions between plants and pathogens. Previously were shown that P. patens is susceptible to fungal and oomycete infection that colonize plant and propagate in plant tissue.In response to infection, the moss activates defense mechanisms similar to those induced in flowering plants. These includes the accumulation of reactive oxygen species (ROS), programmed cell death, cell wall fortification, and induction of defense-related genes such as PAL, LOX, CHS, and PR-1 (Ponce de León I., 2011).

The aim of this study is to investigate interactions between moss P. patens and biotrophic phytopatogenic Pseudomonas and Xantomonas pathogens at different stages of pathogenesis.

For this purpose, we used Xantomonas arboricola, Pseudomonas syringae and Pseudomonas viridiflava bacterial strains. The plant pathogen Xantomonas arboricola causes disease in trees from Rosaceae family, Prunaceae subfamily; hazelnut (латынь) and walnut (латынь). P. syringae and P. viridiflava are phytopathogenic bacteria of crops that can cause root rot, necrosis of leaves and stems.

For acknowledgement the pathogenicity of the bacteria to P.patens were analyzed phenotypic and cytologic changes in inoculated gametophores. Metabolomic profiling of P. patens inoculated with X. arboricola, P. syringae and P. viridiflava, performed at several stages of pathogenesis. P. patens gametophores were cultivated on Knop's medium and inoculated with bacterial suspensions (OD of 0.4). Metabolites were isolated and identified by GC-MS on the 0th, 2nd, 5th, 10th, 17th and 30th days after inoculation. We detected 60 metabolites, mainly belonging to the components of the carbohydrate metabolism. In addition, the sugar alcohols or polyols, such as hexitol, pentitol and myoinositol were found in many gametophore samples. Their specific role in osmoprotection has been reported for many seed plants (Hoekstra et al., 2001). We also discovered the intensification of pathogenesis at lower concentrations of palmitic (16:0), stearic (18:0), oleic (9-18:1), linoleic (9,12-18:2) and linolenic (9,12,15-18:3) acids, which are part of membrane lipids and triacyglycerol. The accumulation of arachidonic acid, promotes the increased synthesis of protective compounds in plants, including phenolic compounds was intensified at early stages of pathogenesis of strains of P. syringae and X. arboricola compared with the control (Rensing et al., 2007).

As a result, we established the pathogenicity of X. arboricola, P. syringae and P. viridiflava strains for P. patens. Profiling of metabolites resulting from inoculation Pseudomonas and Xanthomonas bacteria of the moss, confirms pathogenic reproduction in P. patens cells. All studied bacteria induced the accumulation of compounds required for bacterial growth and involved in plant's systemic resistance.

References:
1. Cove D. The moss Physcomitrella patens//Annu. Rev. Genet. 2005. Vol. 39. – P. 339-358. 2. Lang D., van Gessel, N., Ullrich, K. K., Reski, R. The Genome of the Model Moss Physcomitrella patens//Advances in Botanical Research. 2016. Vol. 78. P. 97-140. 3. Kroemer K., Reski R., Frank W. Abiotic stress response in the moss Physcomitrella patens: evidence for an evolutionary alteration in signaling pathways in land plants//Plant Cell Reports. 2004. Vol. 22. № 11. P. 864-870. 4. Ponce de León I. The Moss Physcomitrella patens as a Model System to Study Interactions between Plants and Phytopathogenic Fungi and Oomycetes//Journal of pathogens. 2011.Vol. 2011. № 2011 5. Hoekstra F. A., Golovina E. A., Buitink, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance// Trends in plant science. 2001. Vol. 6. № 9. P. 431-438. 6. Rensing

S. A., Ick J., Fawcett J. A., Lang D. & Reski, R. An ancient genome duplication contributed to the abundance of metabolic genes in the moss Physcomitrella patens// BMC evolutionary biology. 2007. Vol. 7. № 1. P 1.

Grant: The work was supported by RFBR according to the research project №13-04-40104 and by grant of President of Russian Federation №МК -7138.2015.4.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ХРОМОСОМ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ С ПОМОЩЬЮ РАЗРАБОТАННОГО ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ И ОПТИМИЗИРОВАННОЙ МЕТОДИКИ Q-FISH

М.Ш.Барковская[1], А.Г.Богомолов[2], Е.А.Блинова[1], Н.Б.Рубцов[2], В.А.Козлов[1]

[1]Научно-исследовательский институт Фундаментальной и Клинической Иммунологии, Россия, 630099, Новосибирск, Ядринцевская, 14, margaritabarkovskaya@gmail.com, (383)227-01-35
[2]Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, Проспект Лаврентьева, 10

Для определения длины теломер в отдельных хромосомах было разработано новое программное обеспечение МеТеЛен (Measurement of Telomere Length of chromosomes) и оптимизирован протокол Q-FISH с целью улучшения качества последующего цитогенетического анализа. Была исследована длина теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом у пациентов с ревматоидным артритом в сравнении с донорами.

Ключевые слова: ревматоидный артрит (РА), количественная флуоресцентная гибридизация in situ (Q-FISH), длина теломер индивидуальных хромосом, мононуклеары периферической крови (МНК), суммарная интенсивность флуоресценции (IFI), пептидно-нуклеиновая проба (PNA-probe)

Теломеры – это нуклеопротеиновые структуры, венчающие концы хромосом [1,2] и служащие защитой от «репликативного старения» [3,4]. Укорочение средней длины теломер в клетках иммунной системы может служить признаком старения иммунной системы при хронических воспалительных и иммуноопосредованных заболеваниях. В наших предыдущих исследованиях было обнаружено, что средняя длина теломер в мононуклеарах (МНК) периферической крови снижена при заболеваниях атопической и аутоиммунной природы [5,6]. Известно, что распределение теломерных повторов на различных плечах индивидуальных хромосом не равномерно и характеризуется теломерным профилем.[7,8]. Целью нашей работы было изучение длины теломер на отдельных плечах индивидуальных хромосом пациентов с РА в сравнении со здоровыми донорами.

В исследование вошли условно-здоровые доноры (n=6, медиана возраста 51,5 (49-53)) и пациенты с РА (n=6, медиана возраста 51,5 (50-54)). Работа проводилась на препаратах метафазных хромосом, полученных из МНК периферической крови. У всех испытуемых было получено информированное медицинское согласие на исследование. Все пациенты на момент забора материала находились на лечении в клинике иммунопатологии НИИФКИ г. Новосибирска в стадии обострения основного заболевания, диагностика заболевания проводилась в соответствии с общепринятыми критериями.

Количество теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом оценивалось методом количественной флуоресцентной гибридизации insitu(Q-FISH) [9,10]. Неотъемлемой частью методики Q-FISHявляется идентификация хромосом посредством DAPI-бэндинга. Чтобы улучшить качество цитогенетического анализа, входе работы нами были модифицированы методические условия: температура и время денатурации ДНК, концентрация Cy3-PNA-зонда (Cy3-(CCCTAA)3 EurogenetecLtd, Belgium), условия фиксации и отмывок. Применение оптимизированного протокола улучшило качество DAPI-бэндов и позволило сделать цитогенетический анализ более достоверным.

Для количественного измерения теломерных последовательностей необходимо также проведение корректной цифровой обработки полученных изображений метафазных пластинок. Поэтому нами было создано программное обеспечение (МеТеЛен) (http://www.bionet.nsc.ru/en/development/application-development/development-of-a-computer/metelen.html), позволяющее проводить анализ количества теломерных повторов на отдельных плечах индивидуальных хромосом. Для улучшенного анализа изображений по сравнению с ранее разработанными программами, мы добавили возможность вычитать фоновый сигнал и корректировать недостатки оптической системы. Также программа позволяет выполнять в полуавтоматическом режиме нормировку интенсивности флуоресцентного сигнала и определять принадлежность теломер к хромосомам. Эти функции отсутствуют в существующих

аналогах программы. Для тестирования программного обеспечения и оптимизированной методики были проведены валидационные эксперименты. Они продемонстрировали, что созданная программа и модифицированная методика могут служить для корректного вычисления длины теломер у пациентов с РА и здоровых доноров.

При сравнении теломерных профилей, было обнаружено, что длина теломерной последовательности на р-плече 16 хромосомы достоверно короче у пациентов с РА , чем у доноров ($p < 0,05$). Выявленное укорочение длины теломер на р-плече 16 хромосомы при РА может иметь значение для патогенеза этого заболевания. Так, укорочение теломер может приводить к повышенной экспрессии генов, расположенных рядом с теломерными регионами. В 13 регионе р плеча 16 хромосомы локализуется ряд генов (CIITA,CLEC16A, DNAJA3,SOCS1,TRAP 1), которые ассоциированы с РА или могут принимать участие в его патогенезе. Поскольку теломерный профиль является индивидуальной характеристикой, то мы проанализировали наличие укороченных теломерных последовательностей на отдельных плечах индивидуальных хромосом относительно средней длины теломер для каждого испытуемого отдельно. В целом, у пациентов с РА было большее количество достоверно укороченных теломер, чем у здоровых доноров. Выявленные особенности теломерных профилей пациентов с РА могут быть свидетельством пролиферативного стресса, который возникает в результате массовой пролиферации клеток иммунной системы при иммунопатологии. Кроме того, можно предположить, что наличие большого количества укороченных теломер может способствовать гибели клетки через апоптоз. Потому что именно эти теломерные последовательности могут первыми подвергаться критическому укорочению, приводить к слиянию хромосом конец-в-конец и повреждению генома.

Было продемонстрировано применение разработанной программы и оптимизированной методики Q-FISH для анализа длины теломер у пациентов с ревматоидным артритом. Полученные данные показали, что распределение теломерного профиля пациентов с ревматоидным артритом достоверно отличается от такового у доноров: а именно, отмечается укорочение длины теломерной последовательности на р-плече 16 хромосомы ($p< 0,05$) и наблюдается увеличение количества укороченных теломер у пациентов с РА в сравнении с донорами. Что, по нашим предположениям, может вносить вклад в патогенез этого мультифакториального заболевания.

Литература.
1. Оловников А.М., Теория маргинотомии.// Журн. Теоретич. Биол. 41(1):181-190, 1973. 2. Blackburn E.H., Gall J.G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena// J. Mol. Biol. 120:33-53, 1978. 3. Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S. et al., A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes// Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(18):6622-6626, 1988 4. Hayflick L, The limited in vitro lifetime of human diploid strains// Exp. Cell. Res. 37:614-636, 1965. 5 Борисов В.И., Демаков С.А., Непомнящих В.М., и др. Сокращение теломерных районов ДНК в субпопуляциях CD4+ и CD8+ -лимфоцитов при заболеваниях атопической природы // Омский научный вестник. – 2007. - №3. – С. 172-174. 6. Борисов В.И., Кожевников В.С., Сенюков В.В., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Раннее старение иммунной системы при ревматоидном артрите // Российский иммунологический журнал. – 2007. - №2. – С. 144-149. 7 Lansdorp P.M., Verwoerd N.P., van de Rijke F.M. et al. // Hum. Mol. Genet. 1996. V.5. №5. P. 685-691. 8 Graakjaer J., Londono-Vallejo J.A., Christensen K. et al., The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans shows signs of heritability and is maintained through life// Mech. ageing dev., 124(5): 629-640, 2003. 9 Aubert G., Lansdorp P.M., Telomeres and aging// Physiol. Rev. 2008, 88: 557-579. 10 Poon S.S.S., Lansdorp P.M., Quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH)// Curr. Protoc. Cell Biol., 12: 18.4:18.4.1 – 18.4.21, 2001.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-15-00346

ESTIMATION OF TELOMERE LENGTH OF INDIVIDUAL CHROMOSOMES IN RHEUMATOID ARTHRITIS WITH NEWLY DEVELOPED SOFTWARE AND OPTIMIZED Q-FISH PROTOCOL

M.Barkovskaya[1], A.Bogomolov[2], E.Blinova[1], N.Rubtsov[2], V.Kozlov[1]

[1]Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia, 630099, Novosibirsk, Yadrintsevskaya street , 14
[2]Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russia, 630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva , 10

The new software MeTeLen (Measurement of Telomere Length of chromosomes) was developed to estimate the length of individual telomeres in identified chromosomes by Q-FISH technique. Telomere length on individual chromosome arms were analyzed in patients with reumatoid arthritis in compare with donors.
Key words: rheumatoid arthritis (RA), quantitative fluorescent in situ hybridization (Q-FISH), telomere length in

individual chromosomes, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), integrated fluorescence intensity(IFI), peptide nucleic acid probe (PNA-probe)

Telomeres are nucleoprotein structures at the ends of chromosomes [1,2]. They protect chromosomes from "replicative senescence" during cell divisions [3,4]. Decreasing average telomere length in the cells of an immune system can indicate immune aging in immune-mediated and chronic inflammatory diseases. Previously we have found, that average telomere length in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)is reduced in atopic and autoimmunity disorders [5,6]. It is known, that the distribution of telomere repeats on different chromosomes is not homogeneous, but has a specific telomere profile in humans[7,8].In this study, we focused on studying the length of individual telomeres in patients with RA in comparison with healthy volunteers.

The study included 6 patients with RA (the median age 51,5 years (50-54)) and 6 healthy donors (the median age 51,5 years (49-53)). Metaphase spreads obtained fromPBMCs were used in this study. Written informed consent was obtained from each person enrolled in the study. At the time of sampling, RA inpatients characterized with acute exacerbation of the disease received treatment at the Clinic of Immunopathology of Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology in Novosibirsk. RA was diagnosed by clinicians according to routine diagnostic practice.

For measurement of telomere repeats relative quantity on individual chromosome arms we used quantitative fluorescent in situ hybridization (Q-FISH) with a PNA-probe specific for telomeres [9,10]. An additional important stage in the estimation of individual telomere length with the Q-FISH technique is chromosome identification after DAPI banding. To improve the quality of cytogenetic analysis after Q-FISH, we optimized the temperature and time of DNA-denaturation, concentration of PNA-probe (Cy3-(CCCTAA)3 Eurogenetec Ltd, Belgium), pepsin treatment, stringency of wash and fixation steps. The modified version allows for improvement of the quality of DAPI-banding after Q-FISH, which makes chromosome identification more reliable.

Quantitative estimation of telomere length requires following computer-assisted analysis of metaphase spreads images. The new MeTeLen software (Measurement of Telomere Length of chromosomes) was developed to estimate the length of individual telomeres in identified chromosomes (http://www.bionet.nsc.ru/en/development/application-development/development-of-a-computer/metelen.html). For enhanced image analysis compared with the previously developed programs, we included estimation of background signal and correction of defects of the optical system. MeTeLen accomplishes also, in a semi-automatic manner, tasks such as normalization of integrated fluorescent intensity (IFI) and chromosome assignment of telomere. These options are absent in existing analogues. The validation tests were carried out to test developed software and modified technique. The possibility of the developed software and modified technique application for correct analysis of telomere length in patients with RA and healthy donors was shown.

When comparing the telomere profiles, it was found, that telomere on chromosome 16 p are significantly shorter in patients with RA than in donors ($p < 0,05$). The observed significant shortening of telomere length on chromosome 16 p in RA may be relevant in pathogenesis of this disorder. Thus, telomere shortening can lead to increased gene expression near the telomere DNA region. In 16 p 13 a number of genes is localized (CIITA,CLEC16A, DNAJA3,SOCS1,TRAP 1), that are associated with RA or may be involved in its pathogenesis. Since each person has an individual telomere profile, we also analyzed the presence of shortened telomere sequences on individual chromosome arms relative to the average length of telomeres for each subject separately. In general, patients with RA have larger number of significantly shortened telomeres than healthy donors The revealed features of telomeric profiles of patients with RA may be an indication of a proliferative stress that occurs as a result of the mass immune cell proliferation in the immunopathology. Furthermore, it can be assumed that the presence of great number of shortened telomeres can promote cell death through apoptosis. Because this telomeric sequences can first undergo a critical shortening and lead to a fusion of chromosomes end-to-end and genome damage.

The application of the developed software and modified Q-FISH technique for analysis of telomere length in patients with rheumatoid arthritis was demonstrated. Received data have shown, that there is significant difference between patients' and controls' telomere profiles. More specifically, telomere length in 16 p individual chromosome arm in rheumatoid arthritis is shortened compared to donors ($p < 0,05$). Also patients with RA have larger number of significantly shortened telomeres than healthy volunteers. According our assumption this may influence on pathogenesis of this multifactorial disease.

References:
1. Olovnikov A. M., A theory of marginotomy, J. Theor. Biol. 41(1):181-190, 1973. 2. Blackburn E.H., Gall J.G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena, J. Mol. Biol. 120:33-53, 1978. 3. Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S. et al., A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(18):6622-6626, 1988 4. Hayflick L, The limited in vitro lifetime of human diploid strains, Exp. Cell. Res. 37:614-636, 1965. 5. Borisov V.I., Demakov S.A., Nepomnyaschikh V.M. et al., Some features of changing telomere length in lymphocytes from the patients with bronchial asthma, Med. Immunol. 11(6):

523-530, 2009. 6. Borisov V.I., Kozhevnikov V.S., Senyukov V.V. et al., Early aging of immune system in rheumatoid arthritis patients, Russ. J. Immunol. 1(2): 144-149, 2007. 7. Lansdorp P.M., Verwoerd N.P., van de Rijke F.M. et al. // Hum. Mol. Genet. 1996. V.5. №5. P. 685-691. 8. Graakjaer J., Londono-Vallejo J.A., Christensen K. et al., The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans shows signs of heritability and is maintained through life, Mech. ageing dev., 124(5): 629-640, 2003. 9. Aubert G., Lansdorp P.M., Telomeres and aging// Physiol. Rev. 2008, 88: 557-579. 10. Poon S.S.S., Lansdorp P.M., Quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH), Curr. Protoc. Cell Biol., 12: 18.4:18.4.1 – 18.4.21, 2001.

Grant: The study was funded by RSF (research project No 14-15-00346)

УДК: 004.041

ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА «УСЛОВИЯ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ»

Д.Р.Батыргазиева, Е.В.Гусева

Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Россия, 125047, Москва, Героев Панфиловцев, 20-1, diana.b1994@mail.ru, 89250417857

Была разработана информационная система, содержащая литературные данные по проведению процессов культивирования различных клеток млекопитающих. Информационная система может служить вспомогательным средством для систематизации имеющихся экспериментальных данных для предварительной оценки и выбора условий культивирования для определенного типа клеток

Ключевые слова: информационная система, база данных, культивирование, клетки млекопитающих, носители, аппарат для культивирования/ биореактор

Культивирование клеток млекопитающих является активно развивающимся направлением, нашедшим свое применение в области фармацевтической промышленности и медицины. По всему миру проводятся многочисленные исследования, открываются новые стороны терапевтического действия используемых клеточных культур. Особую важность это направление приобрело после принятия летом 2016г. Федерального закона «О биомедицинских клеточных продуктах». В связи с этим возникает острая необходимость систематизации и структурирования информации, в первую очередь, по экспериментальным данным, приведенным в различных информационных источниках. Для этих целей была создана информационная система «Условия и оборудования для культивирования клеток млекопитающих», объединяющая в себе основные элементы процесса: клеточную линию, питательную среду, носитель/ подложку и аппарат для проведения процесса/ биореактор. Основным назначением данной системы является получение первичной информации по исследуемой культуре клеток на основе литературных данных на этапе планирования эксперимента.

Информационная система включает в себя базу данных и экспертную часть. База данных состоит из 6 таблиц. Таблица «Биореакторы» содержит информацию об основных типах аппаратов для культивирования. Выделены такие параметры, как: тип перемешивания, объем аппарата, возможность использования одноразового или многоразового варианта конструкции. В таблице «Клеточные линии» отражена морфология клеток, принцип культивирования, возможности пересева и возможная область применения. Данные о материалах и об особенностях подложек сосредоточены в таблице «Подложки». В данной части БД рассматриваются различные виды подложек (мембраны, микроносители, скаффолды), их геометрические параметры, материал, наличие пор, а также максимальное количество клеток, которое удалось на них вырастить. Рассмотрены такие материалы, как: желатин, хитозан, полимолочная и другие полимерные кислоты. При заполнении данных учитывались не только популярные промышленные микроносители, но и варианты носителей, разработанных различными исследователями. С помощью таблицы «Область применения» осуществляется связь между системой культивирования и соответствующей культурой клеток. Здесь рассмотрены основные направления применения продуктов, получаемых в результате культивирования клеток: тканевая инженерия, вирусология и биофармацевтика.

Таким образом, созданная информационная система позволяет структурировать и отсортировывать данные о процессе культивирования клеток млекопитающих в зависимости от необходимых параметров, тем самым уменьшая время для проведения первичного поиска. Кроме того, при совместном использовании с базами знаний, БД может являться основой для создания систем поддержки принятия решений, которые, в свою очередь, позволяют получить информацию для проведения эксперимента или планирования производства. Разработанная система будет помещена в открытом доступе на сайте университета.

Литература.
1. Российская коллекция клеточных культур: электронный каталог / Институт цитологии РАН. URL: http://www.cytspb.rssi.ru/ (дата обращения: 13.12.2016). 2. Microcarriers cell culture: principles and methods // GE Healthcare. URL:http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents/Handbooks/pdfs/Microcarrier%20Cell%20Culture (дата обращения: 13.12.2016)

INFORMATION SYSTEM «PARAMETERS AND EQUIPMENT FOR MAMMALIAN CELLS CULTIVATION»

D.Batyrgazieva, E.Guseva

D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Russia, 125047, Moscow, Geroev Panfilovtsev, 20-1

The information system has been developed including the literature data on cultivation processes for different mammalian cells. The information system may serve as an assistant to systemize the existing experimental data for the primary estimation and choice of cultivation system for the definite type of cells.

Key words: information system, database, cultivation, mammalian cells, matrices, equipment for cultivation/ bioreactors

The cultivation of mammalian cells is the developing area in the field of pharmaceuticals and medicine. The worldwide numerous studies opened new aspects of therapeutic action used cell cultures. It is very important that the Federal law "About biomedical cell products" has been adopted in summer of 2016. In this regards there is an urgent need to systematize and structure the information on the experimental data described in the different sources. The created information system "Parameters and equipment for mammalian cell cultivation" has been developed combining the main elements of the process: cell line, culture medium, matrix/ scaffold and equipment for cultivation/ bioreactor. The main assignment of this system is the receiving of the primary information on the investigating cell line based on literature data on the step of experiment design.

The information system includes the database and expert part. The database consists of 6 tables. Table «Bioreactors» contains the information about major types of apparatuses for cultivation of mammalian cells. The highlighted parameters are defined as type of agitation, volume of apparatus, possibility disposable or reusable equipment. The Table «Cell line» reflected morphology of cells, principle of cultivation, re-seeding possibility and possible applications. The information about materials and the features of matrices is done in the table «Matrices». All types of matrices are considered (membranes, microcarriers, plates, scaffolds) including their geometrical parameters, material of the matrix, porosity and the maximum number of cells on it. The kinds of materials are described as gelatin, chitosan, PLA and other polymeric acids. There is the information about not only the popular industrial microcarriers, but about the microcarriers developed by different researchers too. The link between cultivation system and the corresponding cell lines is carried out using the table «Application fields». Here is the main directions of cell products application: tissue engineering, virology and biopharmaceutics.

Thus, the created information system allows to structure and sort data about the cultivation process of mammalian cells depending on the required parameters. Besides the database can be a basis for the creation of Decision Support System that provide an information for the experiment design. The information system will be located with open access at the University website.

References:
1. Russian cell culture collection: e-catalogue / Institute of Cytology RAS. URL: http://www.cytspb.rssi.ru/ (date accessed: 13.12.2016). 2. Microcarriers cell culture: principles and methods // GE Healthcare. URL:http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents/Handbooks/pdfs/Microcarrier%20Cell%20Culture (date accessed: 13.12.2016).

УДК: 577.114; 615.099, ББК:

ИЗУЧЕНИЕ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ХИТОЗАНА В ОТНОШЕНИИ АСПИРИНА И АНАЛЬГИНА

А.Д.Беляева

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Россия, 195027, Санкт-Петербург, Большеохтинский пр., 31-15, belyaeva_any@mail.ru, 89219772846

Исследованы сорбционные свойства хитозана в отношении Аспирина (ацетилсалициловой кислоты) и Анальгина (натрия метамизола) при различных концентрациях препаратов. Установлена более высокая сорбционная активность хитозана в отношении Анальгина, чем в отношении Аспирина.

Ключевые слова: хитозан; Аспирин; Анальгин; сорбция; ВЭЖХ.

На сегодняшний день остро стоит проблема токсикоза организма человека, вызванного избыточным приемом лекарственных препаратов. Сорбционный является одним из наиболее эффективных способов детоксикации. Перспективным сорбентом является хитозан, благодаря наличию различных функциональных групп. Специфичность его действия в отношении ряда лекарственных препаратов является предметом наших исследований.

Исследовали влияние концентрации низкомолекулярного хитозана на процесс сорбции Аспирина и Анальгина. Сорбент брали в концентрациях 0,125; 0,25; 0,5 и 1,0 г/л. Концентрация лекарственных препаратов составляла 1 г/л. Сорбцию проводили при pH=6,5, в стационарном режиме, при комнатной температуре в течение 1 часа.

Определение содержания Аспирина (ацетилсалициловой кислоты) и Анальгина (натрия метамизола) до и после сорбции выполняли методом ВЭЖХ с предварительным построением градуировочного графика на приборе Agilent 1200, колонка Zorbax SB - C18, 150 мм x 4.6 мм, 5 мкм, температура колонки (25±1)°C, состав подвижной фазы: ортофосфорная кислота (конц.): ацетонитрил : вода особо чистая = 2 : 400 : 600 (об/об/об), детектор: спектрофотометрический, длина волны: 237 нм. Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Зависимость степени сорбции ацетилсалициловой кислоты и натрия метамизола от концентрации хитозана

Исходная концентрация хитозана, г/л	Степень сорбции ацетилсалициловой кислоты, %	Стандартное отклонение	Степень сорбции натрия метамизола, %	Стандартное отклонение
0,125	18,3	0,8	21,4	0,7
0,25	26,7	0,6	41,3	1,2
0,5	42,3	0,9	61,6	0,9
1,0	62,4	1,0	75,7	0,9

Дальнейшие исследования сорбционных свойств хитозана в отношении данных лекарственных препаратов проводились для концентрации сорбента, равной 1 г/л.

Было исследовановлияние концентраций Аспирина и Анальгина на процесс сорбции их хитозаном. Лекарственные препараты были взяты в концентрациях 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,25; 2,5; и 5,0 г/л. Концентрация хитозана составляла 1 г/л. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Зависимость степени сорбции Аспирина и Анальгина от их исходной концентрации

Исходная концентрация лекарственного препарата, г/л	Степень сорбции ацетилсалициловой кислоты, %	Стандартное отклонение	Степень сорбции натрия метамизола, %	Стандартное отклонение
0,125	71,9	1,2	91,4	2,1
0,25	66,5	1,8	85,1	1,3
0,5	64,7	1,3	80,3	1,1
1,0	62,9	1,7	77,4	0,8
1,25	59,3	1,9	75,5	1,3
2,5	51,1	1,1	70,4	2,3
5,0	29,0	1,3	50,4	0,5

Таким образом установлено, что хитозан проявляет большую сорбционную активность в отношении Анальгина, чем в отношении Аспирина.

THE STUDY OF SORPTION PROPERTIES OF CHITOSAN TOWARDS ASPIRIN AND ANALGIN

A.Beliaeva

Saint-Petersburg State Institute of Technology (Technical University), Russia, 195027, Saint-Petersburg, Bolsheokhtinsky pr., 31-15

In the present work, the sorption properties of chitosan towards Aspirin (acetylsalicylic acid) and Analgin (sodium metamizole) at different concentrations of medical preparations were studied. The sorption activity of chitosan towards Analgin was determined bigger than towards Aspirin.

Key words: chitosan; Aspirin; Analgin; sorption; HPLC.

Nowadays, there is a rising problem of intoxication of human body caused by excessive intake of medical preparations. One of the most effective methods for detoxification is sorption. Due to the presence of different functional groups, chitosan is considered to be a perspective sorbent. The specificity of its effect on several medical preparations is the subject of our research.

The effect of concentration of low molecular weight chitosan on the process of Aspirin's and Analgin's sorption was studied. Sorbent was taken in powder form in 4 different concentrations: 0.125, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L. Concentration of drugs was 1 g/L. Sorption was proceeded during one hour, in stationary mode, at pH=6.5 at room temperature. The experiment was made in triplicate.

Determination of Aspirin (acetylsalicylic acid) and Analgin (sodium metamizole) before and after sorption was implemented by HPLC-method using Agilent 1200 at column Zorbax SB - C18, 150 mm x 4.6 mm, 5 µm, temperature of column (25±1)°C, mobile phase composition: ortophosphoric acid : acetonitrile : ultrapure water = 2 : 400 : 600 (v/v/v); detection: DAD; analytical wavelength: 237 ± 2 nm. The results are shown in the Table 1.

Table 1 – The dependence of the degree of sorption of acetylsalicylic acid and of sodium metamizole on the concentration of chitosan

Concentration of chitosan,g/L	The degree of sorption of acetylsalicylic acid, %	Standard deviation	The degree of sorption of sodium metamizole, %	Standard deviation
0.125	18.3	0.8	21.4	0.7
0.25	26.7	0.6	41.3	1.2
0.5	42.3	0.9	61.6	0.9
1.0	62.4	1.0	75.7	0.9

Further studies of sorption properties of chitosan for Aspirin and Analgin were made for concentration of sorbent equal to 1 g/L.

The effect of concentration of Aspirin and Analgin on the process of their sorption by chitosan was studied. Drugs were taken in 7 different concentrations: 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.25, 2.5, and 5.0 g/L. Concentration of chitosan was 1 g/L. The results are shown in the Table 2.

Table 2 – The dependence of the degree of sorption of acetylsalicylic acid and of sodium metamizole on their initial concentration

The initial concentration of drugs, g/L	The degree of sorption of acetylsalicylic acid, %	Standard deviation	The degree of sorption of sodium metamizole, %	Standard deviation
0.125	71.9	1.2	91.4	2.1
0.25	66.5	1.8	85.1	1.3
0.5	64.7	1.3	80.3	1.1
1.0	62.9	1.7	77.4	0.8
1.25	59.3	1.9	75.5	1.3
2.5	51.1	1.1	70.4	2.3
5.0	29.0	1.3	50.4	0.5

Thus, it was determined that chitosan shows bigger sorption activity towards Analgin than towards Aspirin.

УДК: 579.2+578.8+577.2, ББК: Е

ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ-ХОЗЯЕВ БАКТЕРИОФАГОВ БИМ BV-45

Н.В.Бесараб

Институт микробиологии НАН Беларуси, Республика Беларусь, 220141, Минск, ул. Купревича, 2, natal-vasilna@rambler.ru, +(375) 17 267-47-66

В работе приведены сведения по изучению строения О-специфических полисахаридов (ОПС) липополисахаридов (ЛПС) – потенциальных рецепторов на клеточных стенках грамотрицательных бактерий для штамма бактериофага из Фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. С использованием метода ЯМР-спектроскопии установлена структура ОПС штамма бактерии-хозяина бактериофага.

Ключевые слова: липополисахариды, бактериофаг

Штамм бактериофага БИМ BV-45 из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов проявляет инфицирующую способность в отношении штаммов Pseudomonas syringae БИМ B-240 и Pseudomonas fluorescens БИМ B-582, причем формирующиеся негативные колонии фагов морфологически отличаются для штаммов бактерий. Как известно, в процессе инфицирования адгезины бактериофага специфично связываются с рецепторами на поверхности бактериальной клетки. Для бактериофагов семейства Podoviridae описано наличие эндосиалидаз, ЭПС гидролаз, эндорамнозидаз, мишенями которых являются капсульные полисиаловые кислоты, капсульные экзополисахариды, липополисахариды (ЛПС) бактериальной клеточной стенки. Структура ЛПС является важным диагностическим признаком грамотрицательных бактерий и используется для построения фенетических деревьев. Способность бактериофагов связываться с ЛПС-рецепторами на клеточной стенке бактерий делает возможным использование их в качестве тест-систем на выявление мутантов с модифицированной структурой ЛПС.

С целью исследования потенциальных рецепторов бактериофагов проведен анализ строения молекул ЛПС бактерий. ЛПС бактерии БИМ B-240 экстрагировали фенольным методом по Вестфалю, деградацию ЛПС проводили мягким кислотным гидролизом 2% уксусной кислотой, с помощью фракционирования хроматографией на колонке (60 □ 2,5 см) с гелем Sephadex G-50 (S) получали О-специфические полисахариды. С использованием метода ЯМР-спектроскопии установлена следующая структура ОПС штамма бактерии-хозяина:

-D-GlcpNAc
1
2
3)-□-D-Rhap-(13)-□-D-Rhap-(12)-□-D-RhapI-(12)-□-D-RhapII-(1

Ранее был проведен анализ строения ЛПС штамма БИМ B-582 [1]. Установленная структура отличается от таковой для штамма B-240, в своем составе имеет уникальный моносахарид 4-деокси-D-ксило-гексозу. Следует отметить, что штамм бактерии БИМ B-582 отличается также образованием капсулы. Полученные результаты свидетельствуют об инфицирующей активности бактериофага БИМ BV-45 в отношении бактерий с разной структурной организацией ЛПС клеточной стенки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16 54 00081-Bel_a) и БРФФИ (конкурс проектов «БРФФИ–РФФИ-2016», заявка № Б16Р-056, Договор № Б16Р-056).

С использованием метода ЯМР-спектроскопии установлена следующая структура ОПС штамма бактерии-хозяина БИМ B-240: □-D-GlcpNAc 1 □ 2 □3)-□-D-Rhap-(1□3)-□-D-Rhap-(1□2)-□-D-RhapI-(1□2)-□-D-RhapII-(1□ Ранее был проведен анализ строения ЛПС штамма БИМ B-582 [1]. Установленная структура отличается от таковой для штамма B-240, в своем составе имеет уникальный моносахарид 4-деокси-D-ксило-гексозу. Полученные результаты свидетельствуют об инфицирующей активности бактериофага БИМ BV-45 в отношении бактерий с разной структурной организацией ЛПС клеточной стенки.

Литература.
1. Valueva, O.A. et al. Structure of the Major O-Specific Polysaccharide from the Lipopolysaccharide of Pseudomonas fluorescens BIM B-582: Identification of 4-Deoxy-D-xylo-hexose As a Component of Bacterial Polysaccharides // J. Nat. Prod. 2011, №74, p. 2161–2167.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16 54 00081-Bel_a) и БРФФИ (конкурс проектов «БРФФИ–РФФИ-2016», заявка № Б16Р-056, Договор № Б16Р-056).

LIPOPOLYSACCHARIDES OF BACTERIAL STRAINS – HOSTS OF BACTERIOPHAGE BIM BV-45

N.Besarab

The Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus republic, 220141, Minsk, Kuprevich str., 2

The paper presents data on structure of O-specific polysaccharides (OPS) of lipopolysaccharides (LPS) – potential receptors on cell wall of gram-negative bacteria for bacteriophage strain deposited at Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. Using NMR-spectroscopy technique structure of OPS from bacterial strain-bacteriophage host was analyzed.

Key words: lipopolysaccharides, bacteriophage.

Bacteriophage strain BIM BV-45 provided from the stock of Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms displays infecting activity toward strains Pseudomonas syringae BIM B-240 and Pseudomonas fluorescens BIM B-582. Noteworthy, that formed negative phage colonies are morphologically distinct in different bacterial strains. In the course of infection phage adhesins bind specifically to receptors on the surface of bacterial cell. Bacteriophages of Podoviridae family are distinguished by presence of endosialidases, EPS hydrolases, endorhamnosidases aimed at capsular polysialic acids, exopolysaccharides, lipopolysaccharides (LPS) of bacterial cell wall. LPS structure serves a vital diagnostic trait of gram-negative bacteria used for charting of phonetic trees. Ability of bacteriophages to adhere to LPS receptors on bacterial cell wall enables to use them as test systems revealing mutants with modified LPS structure.

Analysis of bacterial LPS molecules was performed to characterize potential bacteriophage receptors. LPS of strain BIM B-240 were extracted by phenolic method according to Westfall, degraded by mild acid hydrolysis with 2% acetic acid, fractionated by column chromatography (60 ´ 2,5 cm) with Sephadex G-50 (S) to yield O-specific polysaccharides. The following OPS structure of bacterial host was established using NMR spectroscopy:

b-D-GlcpNAc
1
–
2
3)-a-D-Rhap-(13)-a-D-Rhap-(12)-a-D-RhapI-(12)-a-D-RhapII-(1

Earlier analysis of LPS structure in strain BIM B-582 was conducted [1]. The latter differs from that of strain BIM B-240 by the unique constituent monosaccharide 4-desoxy-D-xylohexose. It should be noted that bacterial strain BIM B-582 is also distinguished by capsule generation. The obtained results testify to infectious activity of phage BIM BV-45 toward bacteria with diverse structure of cell wall lipopolysaccharides.

The study was financially supported by RFFI grant 16 54 00081-Bel_a and BRFFI grant B16P-056.

The following OPS structure of bacterial host BIM B-240 was established using NMR spectroscopy: ⍰-D-GlcpNAc 1 ⍰ 2 ⍰3)-⍰-D-Rhap-(1⍰3)-⍰-D-Rhap-(1⍰2)-⍰-D-RhapI-(1⍰2)-⍰-D-RhapII-(1⍰ Earlier analysis of LPS structure in strain BIM B-582 was conducted [1]. The latter differs from that of strain BIM B-240 by the unique constituent monosaccharide 4-desoxy-D-xylohexose.The obtained results testify to infectious activity of phage BIM BV-45 toward bacteria with diverse structure of cell wall lipopolysaccharides.

References:

1. *Valueva, O.A. et al. Structure of the Major O-Specific Polysaccharide from the Lipopolysaccharide of Pseudomonas fluorescens BIM B-582: Identification of 4-Deoxy-D-xylo-hexose As a Component of Bacterial Polysaccharides // J. Nat. Prod. 2011, №74, p. 2161–2167*

Grant: The study was financially supported by RFFI grant 16 54 00081-Bel_a and BRFFI grant B16P-056.

УДК 573.6.086.83

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ПРИЖИЗНЕННОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ С ПОМОЩЬЮ ИНФРАКРАСНЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК

Бозрова С.В[1], Барышникова М.А.[2], Мочалов К.Е.[1], Кривенков В.А. [1], Тухватуллин А.И. [3], Логунов Д.Ю. [3], Набиев И.Р. [1,4], Суханова А.В. [1,4]

[1] Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ (Московский инженерно-физический институт), 115522, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478 Москва, Россия
[3] ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, 123098 Москва, Россия
[4] Реймский Университет Шампань-Арденны, 51100, Реймс, Франция
email: svetaboz@yandex.ru

Протестирована возможность визуализации инфракрасных квантовых точек в организме экспериментальных животных. Показано, что инфракрасные квантовые точки могут послужить потенциальным инструментом для прижизненной визуализации опухолей.

Ключевые слова: квантовые точки, животные модели, диагностика рака, визуализация опухолей, нанотехнологии.

Известно, что рак является одной из основных причин смертности во всем мире. Клиницисты и ученые работают над новыми схемами лечения и профилактики различных видов рака. Одну из наиболее важных ролей в борьбе против рака играет ранняя диагностика и корректный мониторинг заболевания.

На сегодняшний день не существует идеального и общепринятого способа определения местоположения злокачественной опухоли или ее метастазов в организме пациента. Для решения этой проблемы ученые работают с различными приборами и методами. Наиболее широко используемыми методами являются позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) [1], однофотонная эмиссионная компьютерная томография [2] и др. Кроме этого, одним из наиболее перспективных методов, позволяющих избежать использование дорогостоящего оборудования, является использование фотонных методов флуоресцентного анализа [3-5]. Несмотря на то, что на сегодняшний день этот подход признан одним из наиболее перспективных методов [6], его применения в клинической практике весьма ограничено.

Благодаря своим уникальным оптическим характеристикам, квантовые точки (КТ) могут оказаться полезным инструментом для визуализации онкомаркеров в естественных условиях [7-9]. Однако, перед ответом на вопрос о применимости этих нанокристаллов в клинической практике, должны быть получены ответы об их токсичности при использовании in vivo. В связи с тем, что большинство КТ содержат высокотоксичные тяжелые металлы, нами были поставлены задачи проанализировать возможности использования квантовых точек, не содержащих тяжелые металлы (состава Ag2S) [10] и флуоресцирующих в инфракрасной области оптического спектра (ИК-КТ), в области «окна прозрачности» биологических тканей.

ИК-КТ были синтезированы методами высокотемпературного металлоорганического синтеза и переведены в водную фазу с использованием производных полиэтиленгликоля (ПЭГ), содержащих нейтрально заряженные гидроксильные группы. Эта процедура позволила сделать КТ растворимыми в водных биологических буферных растворах и предохранить их от агрегации. Все физико-химические свойства ИК-КТ, такие как их размер, заряд и стабильность, были стандартизированы; работа проводилась с КТ гидродинамического диаметра около 10 нм и с максимумом флуоресценции около 1,3 микрона.

Для визуализации КТ in vivo использовали прибор IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences). Оптические фильтры для возбуждения и испускания флуоресценции были установлены на «менее 500 нм» и «более 800 нм», соответственно. Предварительно, был проведен имэджинг с 5-мин. экспозицией для того, чтобы убедиться в том, что флуоресценция КТ уверенно детектируется прибором.

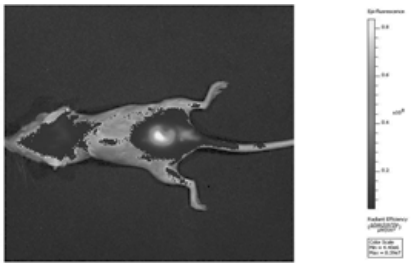


Рисунок 1. Флуоресценция ИК-КТ в теле мыши.

В эксперименте исследовали двух BALB/c самок мышей. После введения животным наркоза (изофлуран) им подкожно вводили 2,5 мг/мл раствора ИК-КТ, после чего проводился эксперимент по имэджингу в камере IVIS Lumina II (Рис. 1). Как можно заметить, флуоресценция ИК-КТ четко идентифицируется в организме мыши, существенно превосходя по своему уровню аутофлуоресценцию тканей животного. Для усовершенствования системы анализа и увеличения его чувствительности, нами проводится оптимизация системы возбуждения и детекции излучения ИК-КТ в теле животных. Использование трехкоординатной прецизионно позиционируемой линзовой системы для согласования возбуждающего излучения внешнего лазерного источника и входной апертуры оптоволоконной системы ввода освещения IVIS Lumina II должно обеспечить увеличение чувствительности детекции ИК-КТ более чем в 10 раз, что позволит существенно улучшить качество визуализации опухолей в организме с помощью ИК-КТ.

Высокий уровень флуоресценции ИК-КТ в теле экспериментального животного гарантирует высокий потенциал их использования в исследованиях по прижизненной визуализации опухолей. Конъюгаты

однодоменных антител к онкомаркеру HER2 с ИК-КТ являются перспективными нанометками, позволяющими эффективно достигать и обеспечивать высокоспецифичное мечение онкомаркера в организме животного. Сочетание создаваемых нанозондов с оптимизированной, для имэджинга ИК-КТ, конструкцией анализатора IVIS Lumina II, позволит вывести биоимэджинг квантовых точек в организме животных на качественно новый уровень чувствительности и специфичности анализа.

Литература.
1. Lorenzen S. et al. Visualisation of metastatic oesophageal and gastric cancer and prediction of clinical response to palliative chemotherapy using 18FDG PET. // Nuklearmedizin. 2007. Vol. 46, № 6. P. 263–270.
2. Tomiguchi M. et al. Prediction of sentinel lymph node status using single-photon emission computed tomography (SPECT)/computed tomography (CT) imaging of breast cancer // Surg. Today. 2016. Vol. 46, № 2. P. 214–223.
3. Zagozdzon A.M. et al. Generation of a new bioluminescent model for visualisation of mammary tumour development in transgenic mice // BMC Cancer. 2012. Vol. 12, № 1. P. 209.
4. Kocher B., Piwnica-Worms D. Illuminating cancer systems with genetically engineered mouse models and coupled luciferase reporters in vivo // Cancer Discov. 2013. Vol. 3, № 6. P. 616–629.
5. Goldman S.J., Jin S. The bioluminescent imaging of spontaneously occurring tumors in immunocompetent ODD-luciferase bearing transgenic mice // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2014. Vol. 1098. P. 129–143.
6. Jeschke S. et al. Visualisation of the lymph node pathway in real time by laparoscopic radioisotope- and fluorescence-guided sentinel lymph node dissection in prostate cancer staging // Urology. 2012. Vol. 80, № 5. P. 1080–1087.
7. Medintz I.L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. // Nat. Mater. 2005. Vol. 4, № 6. P. 435–446.
8. Ballou B. et al. Noninvasive imaging of quantum dots in mice // Bioconjug. Chem. 2004. Vol. 15, № 1. P. 79–86.
9. Hu R. et al. Functionalized near-infrared quantum dots for in vivo tumor vasculature imaging. // Nanotechnology. 2010. Vol. 21, № 14. P. 145105.
10. Zhang Y. et al. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicology of Ag2S near-infrared quantum dots in mice. // Biomaterials. 2013. Vol. 34, № 14. P. 3639–3646.

UDK 573.6.086.83

DEVELOPING AN APPROACH FOR IN VIVO TUMOR IMAGING IN THE MOUSE MODEL USING INFRARED QUANTUM DOTS

Bozrova S.V. [1], Baryshnikova M.A. [2], Mochalov K.E. [1], Krivenkov V.A. [1], Tuhvatullin A.I. [3], Logunov D.Y. [3], Nabiev I.R. [1,4], Sukhanova A.V. [1,4]

[1] Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 115522, Moscow, Russia
[2] Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, 115478, Moscow, Russia
[3] Federal Scientific Research Center of Epidemiology and Microbiology named Gamalei, 123098, Moscow, Russia
[4] Laboratoire de Recherche en Nanosciences, EA4682-LRN, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51100, Reims, France
email: svetaboz@yandex.ru

The visualization capability of infrared quantum dots has been tested in the organism of experimental animals. It has been shown that infrared quantum dots can serve as a potential tool for in vivo imaging of tumors.

Key words: quantum dots, animal models, cancer diagnostics, tumor imaging, nanotechnology.

It is widely known that cancer is one of the top reasons of mortality worldwide. Clinicians and scientist from all over the world are working on the new schemes of treatment and prevention of different types of cancer. One of the most important roles in the battle against cancer belongs to early diagnostics and correct monitoring of the disease. Sometimes it could prevent hard and harmful treatment or insufficient suffering of the patients.

There are no perfect diagnostics tools in the clinic practice nowadays when we talk about position location of the malignant tumor or its metastasis. In ideal world perfect way to detect tumor would be noninvasive, fast and rather cheap. To solve this problem scientists are working with the different tools. One of the most widely used methods is PET (positron emission tomography) [1], single photon emission computed tomography [2] and others. To avoid expensive equipment fluorescent methods were considered as the most perspective ones [3–5]. Jeschke S. et al laparoscopic radioisotope- and fluorescence-guided visualization of the lymph node pathway in real time has been revealed to be successful [6]. But still, there is no such effective tool for in vivo cancer visualization that could be used in clinical practice.

Due to its unique optical features quantum dots could be a useful tool for cancer in vivo visualization [7–9]. But there are still a lot of questions for QD usage and the most important one is their toxicity. Since most of the quantum dots are made of heavy metals we considered to use infrared quantum dots with the composition Ag2S which are non-toxic [10].

We have carried out in vivo experiments with fluorescent IR QD, which are currently the most promising in cancer visualization research. IR QD were synthesized using methods of high-temperature metal-organic synthesis, solubilized, and modified with electrically neutral derivatives of polyethylene glycol (PEG) containing neutrally charged hydroxyl groups to make them soluble in water and aqueous buffer solutions and protect them from clustering. All physical-chemical properties were assessed to be sure that QD have the correct size and fluorescence spectrum. The size of the QD was about 10 nm and fluorescence maximum at the 1,3 micron wavelength.

We used IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences) to perform in vivo visualization in mice. Due to the higher fluorescence intensity with 808 excitation and emission filters were set to <500 nm and >800 nm respectively. To be sure that QD are illuminated at this wavelength pilot photography was made with 5-minute exposition.

Two BALB/c female mice were investigated in our experiment. Both of them were anesthetized with isoflurane and after that subcutaneously injected with 2,5 mg/ml of IR QD solution to the experiment animal and analyzed in the IVIS Lumina camera (Fig. 1).

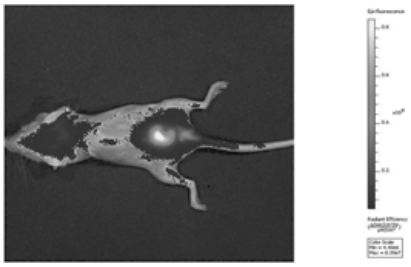


Figure 1. Fluorescence of IR QD in the mouse body

As we can see IR QD are able to be highly bright in the mouse organism even though there is an autofluorescence signal of the animal tissues.

To improve an analyzing system in future and increase its sensitivity the modification of the excitation light source was performed. Usage of the three-axis precision positionable lens system could increase sensitivity up to 10 times which is very important for in vivo visualization of IR QD in the organism.

As long as we can see that IR QD are highly luminescent in the experimental animal body there is a wide field for the future in vivo cancer visualization investigations. Anti-HER2 antibody-IR QD conjugates are highly potential nanoconstructs that allows to reach and provide specific labeling of tumor marker in the body of an experimental animal. Together with optically improved analyzer IVIS Lumina II these nanoconstructs will bring quantum dots bioimaging in animals to a new level of sensitivity and specificity of analysis.

References::

1. Lorenzen S. et al. Visualisation of metastatic oesophageal and gastric cancer and prediction of clinical response to palliative chemotherapy using 18FDG PET. // Nuklearmedizin. 2007. Vol. 46, № 6. P. 263–270.

2. Tomiguchi M. et al. Prediction of sentinel lymph node status using single-photon emission computed tomography (SPECT)/computed tomography (CT) imaging of breast cancer // Surg. Today. 2016. Vol. 46, № 2. P. 214–223.

3. Zagozdzon A.M. et al. Generation of a new bioluminescent model for visualisation of mammary tumour development in transgenic mice // BMC Cancer. 2012. Vol. 12, № 1. P. 209.

4. Kocher B., Piwnica-Worms D. Illuminating cancer systems with genetically engineered mouse models and coupled luciferase reporters in vivo // Cancer Discov. 2013. Vol. 3, № 6. P. 616–629.

5. Goldman S.J., Jin S. The bioluminescent imaging of spontaneously occurring tumors in immunocompetent ODD-luciferase bearing transgenic mice // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2014. Vol. 1098. P. 129–143.

6. Jeschke S. et al. Visualisation of the lymph node pathway in real time by laparoscopic radioisotope- and fluorescence-guided sentinel lymph node dissection in prostate cancer staging // Urology. 2012. Vol. 80, № 5. P. 1080–1087.

7. Medintz I.L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. // Nat. Mater. 2005. Vol. 4, № 6. P. 435–446.

8. Ballou B. et al. Noninvasive imaging of quantum dots in mice // Bioconjug. Chem. 2004. Vol. 15, № 1. P. 79–86.

9. Hu R. et al. Functionalized near-infrared quantum dots for in vivo tumor vasculature imaging. // Nanotechnology. 2010. Vol. 21, № 14. P. 145105.

10. Zhang Y. et al. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicology of Ag2S near-infrared quantum dots in mice. // Biomaterials. 2013. Vol. 34, № 14. P. 3639–3646.

УДК: 543.068.8, ББК: 24.4

КОМБИНАЦИОННОЕ РАССЕЯНИЕ И ГИГАНТСТКОЕ КОМБИНАЦИОННОЕ РАССЕЯНИЕ НА КУБИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦАХ ЗОЛОТА В ФОТОННО-КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ВОЛНОВОДАХ В АНАЛИЗЕ КРОВИ

С.Д.Бондаренко[1], Д.Н.Браташов[1], Н.А.Бурмистрова[1], А.А.Шувалов[1], А.А.Чиброва[1], Б.Н.Хлебцов[1], Ю.С.Скибина[2], И.Ю.Горячева[1]

[1]Саратовский Национальный Исследовательский Государственный Университет им. Н.Г.Чернышевского , Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, bondsd90@gmail.com, 89271484144
[2]ООО НПП «Наноструктурная Технология Стекла», Россия, 410033, Саратов, пр. 50 лет Октября, 101, bondsd90@gmail.com, 89271484144

Изучено влияние структуры фотонно-кристаллических волноводов с полой сердцевиной с нанесенным на внутреннюю поверхность композитным покрытием полиэтиленимин/золотые наночастицы на спектры комбинационного и гигантского комбинационного рассеяния родамина Б и крови человека

Ключевые слова: оптические биосенсоры, фотонно-кристаллические волноводы, комбинационное рассеяние, наночастицы золота

Фотонно-кристаллические волноводы (ФКВ) являются перспективными чувствительными элементами при конструировании оптических биосенсоров. Интерес к использованию ФКВ в этой области обусловлен рядом их уникальных оптических свойств, связанных с особенностями распространения света не только за счёт градиента коэффициентов пропускания материалов волновода, но и нелинейных фотонно-кристаллических явлений [1, 2]. Особенности ФКВ позволяют использовать их одновременно как микроконтейнер, трансдьюсер аналитического сигнала и инструмент низкоинвазивного пробоотбора биообъектов. Важным является возможность интеграции ФКВ с известными сенсорными системами детектирования, в том числе платформами на основе комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР).

Изучено влияние структуры ФКВ с полой сердцевиной (ФКВ ПС) с нанесенным на внутреннюю поверхность слоем золотых наночастиц на спектры КР и ГКР родамина Б и крови человека. Модификацию внутренней поверхности ФКВ ПС проводили последовательно методом послойного нанесения полиэтиленимина (ПЭИ) и нанесением слоя золотых пустотелых кубических частиц («клетки», nanocages, с ребром 50 нм [3]). Измерения спектральных характеристик ФКВ ПС проводили на анализаторе AvaSpec-HS2048XL, источник излучения лампа Torlabssl5600. Показано, что нанесение композитного покрытия ПЭИ/золотые наночастицы практически не влияет на положение локальных максимумов в спектрах пропускания ФКВ ПС.

Измерения спектров КР и ГКР проводили на установке Renishaw inVia (лазеры 532 и 785 нм, мощность до 30 мВт). Спектр ГКР модельного вещества родамина-Б (1 мМ, lEx=785 нм) демонстрирует значительный фактор усиления основных линий, что позволяет идентифицировать вещество и фон от стеклянных обкладок ФКВ. Однако близость lEx и минимума фотонной запрещённой зоны (ФЗЗ) ФКВ ПС приводит к возможности наблюдения интенсивного сигнала ГКР исключительно при фокусировке высокоапертурной оптикой вблизи периферии поперечного сечения ФКВ.

Анализ образцов крови показал, что интенсивность сигнала КР сильно зависит от эффективности согласования числовой апертуры и точки фокусировки пучка света и апертуры входного сечения ФКВ ПС. Спектр КР образца крови, полученный с ФКВ ПС с ФЗЗ существенно отличными от длин волн используемых лазеров, показал возможность значительного увеличения сигнала при меньшей используемой мощности лазера 532 нм. В тоже время результаты измерения этого же образца при использовании лазера 785 нм свидетельствуют об малом усилении сигнала плазмонными частицами внутри волновода.

Литература.
[1] Skibina J. S., Malinin A. V., Zanishevskaya A. A., Tuchin V. V. "Photonic Crystal Waveguide Sensing" in Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants // Series in Sensors, D.P. Nikolelis, T. Varzakas, A. Erdem, G.-P. Nikoleli, Eds. CRC Press, 2013. P. 1-32. [2] Malinin A. V., Skibina Y. S., Tuchin V. V., Chainikov M. V., Beloglazov V. I., Silokhin I. Y., Dolmashkin A. A. The Use of Hollow-Core Photonic Crystal Fibres as Biological Sensors // Quantum Electronics. 2011. Vol. 41. P. 302-307. [3] Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Maksimova I. L., Terentyuk G. S., Khlebtsov N. G. Silver nanocubes and gold nanocages: Fabrication and optical and photothermal properties // Nanotechnol Russia. 2010. Vol. 5. P. 454-468.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке РНФ (проект 14-13-00229).

RAMAN SCATTERING AND SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING ON GOLD NANOCAGES IN PHOTONIC CRYSTAL FIBERS FOR BLOOD ANALYSIS

S.Bondarenko[1], D.Bratashov[1], N.Burmistrova[1], A.Shuvalov[1], A.Chibrova[1], B.Khlebtsov[1], J.Skibina[2], I.Goryacheva[1]

[1]Saratov State University, Russia, 410012, Saratov, Astrakhanskaya Str., 83
[2]SPE LLC «NGT, Russia, 410033, Saratov, Avenue 50 let Oktyabrya, 101

The structure influence of hollow-core photonic crystal fibers with inner surface coated by composite PEI/gold nanoparticles for Raman scattering and Surface-Enhanced Raman scattering spectra of rhodamine B and human blood was studied.

Key words: optical biosensors, photonic crystal fibers, Raman scattering, gold nanoparticles

Photonic crystal fibers (PCFs) are promising sensor elements in the design of optical biosensors. Possibility to use the PCFs in this area based on a number of unique optical properties associated with pecularities of the light guiding not only due to the index reflection gradient of the waveguide materials, but nonlinear photonic crystal phenomena [1, 2]. PCFs unique features allow to use them as micro-containers and signal transducer at the same time, and also as analytical tools for low invasive biological objects sampling. The possibility of PCFs integration to known sensor systems, including platforms based on Raman scattering (RS) and Surface-Enhanced Raman scattering (SERS) is important.

The structure influence of PCFs with a hollow core (PCFs HC) coated on the inner surface with gold nanoparticles layer for Raman and SERS spectra of rhodamine B and human blood was studied. The modification of PCFs inner surface was performed successively by layer by layer coating with polyethyleneimine (PEI) and gold nanocages (edge 50 nm) [3]. The transmission spectrum of PCFs samples was studied with the analyzer AvaSpec-HS2048XL, the source of white light Torlabs sl5600. It was shown that applying of composite layers PEI/gold nanoparticles has practically no effect on position of the local maximums of the transmission spectrum of PCFs.

The Raman and SERS spectra were investigated with Renishaw inVia (laser wavelength was 532 and 785 nm, power up to 30 mW). SERS spectra of Rhodamine B as model compound (1 mM, lEx=785 nm) shown significant enhancement of base lines that allows us to identify of the substance and background of the glass PCFs claddings. However, the similarity of lEx and the photonic band gap (PBG) minimum of PCFs HC leads to the observing of intensive SERS signal only in case focusing with high aperture optics near the PCFs cross-section periphery.

Blood samples analysis shown that the RS signal intensity is strongly dependent on the efficiency of numerical aperture coordination and focusing point of the light beam and the aperture of the PCFs HC entrance. Raman spectrum of a blood sample obtained from the PCFs HC with photonic bandgap which was significantly different from used lasers wavelengths has shown the possibility of significant signal increasing with lower laser power at 532 nm. At the same time the results for the same sample measuring with laser 785 nm indicated insignificant signal amplification by plasmon particles inside the waveguide.

References:
[1] Skibina J. S., Malinin A. V., Zanishevskaya A. A., Tuchin V. V. "Photonic Crystal Waveguide Sensing" in Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants // Series in Sensors, D.P. Nikolelis, T. Varzakas, A. Erdem, G.-P. Nikoleli, Eds. CRC Press, 2013. P. 1-32. [2] Malinin A. V., Skibina Y. S., Tuchin V. V., Chainikov M. V., Beloglazov V. I., Silokhin I. Y., Dolmashkin A. A. The Use of Hollow-Core Photonic Crystal Fibres as Biological Sensors // Quantum Electronics. 2011. Vol. 41. P. 302-307. [3] Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., Maksimova I. L., Terentyuk G. S., Khlebtsov N. G. Silver nanocubes and gold nanocages: Fabrication and optical and photothermal properties // Nanotechnol Russia. 2010. Vol. 5. P. 454-468.

Grant: This work was supported by the Russian Scientific foundation (project 14-13-00229).

УДК: 577.151.45, ББК: 28.072

ОСОБЕННОСТИ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ РАЗЛОЖЕНИЯ БЕНЗОАТА У АКТИНОБАКТЕРИЙ RHODOCOCCUS OPACUS 1CP И RHODOCOCCUS WRATISLAVIENSIS G10

О.В.Борзова, И.П.Соляникова, Е.С.Шумкова, Е.В.Емельянова, Н.В.Присяжная, Л.А.Головлева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН) (место работы) / Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Пущинский государственный естественно-научный институт (ПущГЕНИ) (место учебы), Россия, 142290, Пущино, ИБФМ РАН, проспект Науки, 5, oksana.borzova@inbox.ru, +7 901 784 83 82

Проанализирована способность актинобактерий утилизировать бензоат натрия. Изучены особенности интрадиольных диоксигеназ штаммов Rhodococcus opacus 1CP и Rhodococcus wratislaviensis G10. Обнаружено, что гены биодеструкции бензоата у данных штаммов имеют общее происхождение.

Ключевые слова: Интрадиольные диоксигеназы, бензоат, микробная биодеградация

Бензоат и его производные широко используются в качестве пищевых консервантов и промышленных растворителей. Кроме того, он является исходным материалом при производстве фармацевтических препаратов, агрохимикатов, полимеров, взрывчатых веществ и многих других продуктов повседневного использования [1,2]. Бензоат является одним из самых простых ароматических соединений и является продуктом окислительного катаболизма многих ароматических углеводородов [3].

Ряд культур актинобактерий был проверен на наличие ферментов, ответственных за разложение бензоата. С использованием 16 соединений, производных бензоата и фенола, была определена субстратная специфичность бензоат-1,2-диоксигеназы (БДО) (фермента, инициирующего разложение бензоата) у 11 актинобактерий. Она варьировала от узкой у штаммов Rhodococcus opacus 1CP, Gordonia polyisoprenivorans 135 и Rhodococcus rhodochrous 89 до широкой у Rhodococcus ruber P25 и Microbacterium sp. B51. В бесклеточных экстрактах изучаемых микроорганизмов были обнаружены пирокатехин-1,2-диоксигеназа (ПК-1,2-ДО) и муконатциклоизомераза. Таким образом, у всех исследованных бактерий разложение бензоата идет по пути образования и последующего расщепления пирокатехина в орто-положении.

Для дальнейших исследований были выбраны 2 штамма: R. opacus 1CP – высокоактивный деструктор хлорфенолов, и R. wratislaviensis G10 – деструктор (галоген)ароматических соединений. Целью работы являлось определение особенностей диоксигеназ, индуцирующихся у культур R. opacus 1CP и R. wratislaviensis G10 при росте на бензоате.

БДО штамма R. opacus 1CP характеризовалась экстремально узкой субстратной специфичностью. По сравнению с ней БДО штамма R. wratislaviensis G10 являлась менее специфичной. Из проверенных потенциальных субстратов, представленных хлор-, метил-, гидрокси-замещенными бензоатами, салицилатами и фенолами, всего 31 соединение, БДО клеток R. wratislaviensis G10 была активна с бензоатом, 3-хлорбензоатом и 3- и 4-метилбензоатами.

Методом МАЛДИ показана высокая степень идентичности белковых профилей клеток R. opacus 1CP и R. wratislaviensis G10, как при выращивании на бензоате, так и на богатой среде.

Из биомассы выбранных штаммов, выращенных на бензоате, были выделены и охарактеризованы ферменты периферийного метаболизма: протокатехоат-3,4-диоксигеназа (ПКК-3,4-ДО) и ПК-1,2-ДО. Обнаруженные диоксигеназы были относительно схожи по своим физико-химическим характеристикам.

Ранее было установлено, что у выделенных из территориально-удаленных сайтов штаммов R. opacus 1CP, R. opacus 6a, R. ruber P25, R. wratislaviensis P1 и R. wratislaviensis G10 гены, кодирующие α-субъединицу БДО имеют сходство, составляющее от 88 до 97% с соответствующими генами штамма Rhodococcus jostii RHA1 [4]. На ДНК штамма R. wratislaviensis G10 с использованием специфичных праймеров к вариабельным участкам генов, кодирующих α- и β-субъединицы ПКК-3,4-ДО у R. opacus 1CP, проходила специфичная амплификация. Сходство 500-нуклеотидных участков обеих субъединиц ПКК-3,4-ДО R. opacus 1CP и R. wratislaviensis G10 составило 99%. С использованием праймеров, специфичных к 4 генам ПК-1,2-ДО штамма R. opacus 1CP, у штамма R. wratislaviensis G10 обнаружено два гена, кодирующих ПК-1,2-ДО.

Таким образом, выявлены особенности диоксигеназ и обнаружено высокое сходство генов биодеструкции ароматических соединений у R. opacus 1CP и R. wratislaviensis G10, выделенных с разницей в 20 лет из образцов почв, расположенных на расстоянии 1400 км друг от друга, что свидетельствует об общем происхождении этих генов [5].

Литература.
1. Gibson D. T. The microbial oxidation of aromatic compounds // Crit. Rev. Microbiol. 1971. № 1. P. 199-223. 2. Smith M. R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria // Biodegradation. 1990. № 1. P. 191-206. 3. Hamzah R. Y. and Al-Baharna B. S. Catechol ring cleavage in Pseudomonas cepacia: the simultaneous induction of ortho and meta pathways // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994. № 41. P. 250-256. 4. Solyanikova I. P., Emelyanova E. V., Shumkova E. S., Egorova D. O., Korsakova E. S., Plotnikova E. G., Golovleva L. A. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro-

and hydroxy-substituted analogs by actinobacteria // Int. Biodet. Biodegr. 2015. № 100. P. 155-164. 5. Соляникова И.П., Борзова О.В., Емельянова Е.В., Шумкова Е.С., Присяжная Н.В., Плотникова Е.Г., Головлева Л.А. Диоксигеназы, индуцирующиеся при разложении бензоата деструкторами хлорбифенилов Rhodococcus wratislaviensis G10 и хлорфенолов Rhodococcus opacus 1CP, и гены, потенциально вовлеченные в этот процесс // Биохимия. – 2016. – Т. 81, № 9. - С. 1241-1255.

Финансирование: Работа поддержана грантом РНФ 14-14-00368.

PECULIARITIES OF KEY ENZYMES OF BENZOATE DEGRADATION IN ACTINOBACTERIA RHODOCOCCUS OPACUS 1CP AND RHODOCOCCUS WRATISLAVIENSIS G10

O.Borzova, I.Solyanikova, E.Shumkova, E.Emelyanova, N.Prisyazhnaya, L.Golovleva

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS / Pushchino State Institute of Natural Sciences, Russia, 142290, Pushchino, avenue of Science, 5

Ability of actinobacteria to utilize sodium benzoate has been analyzed. Peculiarities of intradiol ring-cleavage dioxygenases of strains Rhodococcus opacus 1CP and Rhodococcus wratislaviensis G10 has been determined. Common origin of biodegradation benzoate genes in these strains has been defined.

Key words: Intradiol ring-cleavage dioxygenases, sodium benzoate, microbial degradation.

Benzoate and its derivatives are widely used as food preservatives and industrial solvents. Moreover, it is precursor for the production of pharmaceuticals, agrochemicals, polymers, explosives and many other products of daily use [1,2]. Benzoate is one of the simplest aromatic compounds and it is an intermediate of the oxidative catabolism of many aromatic hydrocarbons [3].

The range of actinobacteria has been checked on the presence of enzymes responsible for the decomposition of benzoate. The substrate specificity of benzoate 1,2-dioxygenases (BDO) (an enzyme initiating the benzoate degradation) was determined in the 11 actinobacteria, using 16 compounds: phenol and benzoate derivatives. It ranged from narrow in strains Rhodococcus opacus 1CP, Gordonia polyisoprenivorans 135 and Rhodococcus rhodochrous 89 to wide in Rhodococcus ruber P25 and Microbacterium sp. B51. Catechol 1,2-dioxygenase (1,2-CTD) and muconate cycloisomerase were detected in cell-free extracts of studied microorganisms. Thus, benzoate degradation in all studied bacteria follows the pathway of the catechol formation and its subsequent cleavage in the ortho position.

2 strains: R. opacus 1CP - a highly effective destructor of chlorophenols, and R. wratislaviensis G10 – a destructor of (halo-) aromatics were selected for further research. The aim of the work was to determine peculiarities of dioxygenases induced in the cells of R. opacus 1CP and R. wratislaviensis G10, isolated from different soil samples, at growth on benzoate .

BDO of strain R. opacus 1CP has been characterized by extremely narrow substrate specificity. BDO of strain R. wratislaviensis G10 was wide specific in comparison with the first one: it was active with benzoate, 3-chlorobenzoate and 3- and 4-methylbenzoate from tested chloro-, methyl-, hydroxy-substituted benzoates, salicylates and phenols, total 31 potential substrates.

High degree of identity of the protein profiles of cells R. opacus 1CP and R. wratislaviensis G10 both when grown on benzoate and on LB medium has been shown using method MALDI-ToF mass-spectrometry.

Peripheral metabolism enzymes: protocatechuate 3,4-dioxygenase (3,4-PCD) and 1,2-CTD, have been isolated and characterized from the biomass of selected strains , that was cultivated grown on benzoate. Detected dioxygenases were relatively similar in their physical and chemical characteristics.

Previously, it has been found that genes of the some actinobacteria (studied genes from the strains: R. opacus 1CP, R. opacus 6a, R. ruber P25, R. wratislaviensis P1 and R. wratislaviensis G10, that has been isolated from geographically remote sites) encoding the alpha-subunit of BDO have similarity from 88 up to 97% with the corresponding genes of strain Rhodococcus jostii RHA1 [4]. A specific amplification has been carried out on the DNA of R. wratislaviensis G10 using specific primers to variable segments of the genes encoding α- and β-subunit of the 3,4-PCD in R. opacus 1CP. The similarity of the 500-nucleotide sites of genes of both subunits of R. opacus 1CP and R. wratislaviensis G10 3,4-PCD was 99%. Two genes encoding 1,2-CTD, was detected in the strain R. wratislaviensis G10 using primers specific for 4 genes 1,2-CTD of the strain R. opacus 1CP.

Thus, the peculiarities of dioxygenases have been identified and the high similarity of biodegradation of

aromatic compounds genes in R. opacus 1CP and R. wratislaviensis G10 (besides, these strains were isolated with a difference of 20 years from soil samples spaced 1400 km from each other) has been found, that suggesting a common origin of these genes [5].

References:
1. Gibson D. T. The microbial oxidation of aromatic compounds // Crit. Rev. Microbiol. 1971. № 1. P. 199-223. 2. Smith M. R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria // Biodegradation. 1990. № 1. P. 191-206. 3. Hamzah R. Y. and Al-Baharna B. S. Catechol ring cleavage in Pseudomonas cepacia: the simultaneous induction of ortho and meta pathways // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994. № 41. P. 250-256. 4. Solyanikova I. P., Emelyanova E. V., Shumkova E. S., Egorova D. O., Korsakova E. S., Plotnikova E. G., Golovleva L. A. Peculiarities of the degradation of benzoate and its chloro- and hydroxy-substituted analogs by actinobacteria // Int. Biodet. Biodegr. 2015. № 100. P. 155-164. 5. Solyanikova I.P., Borzova O.V., Emelyanova E.V., Shumkova E.S., Prisyazhnaya N.V., Plotnikova E.G., Golovleva L.A. Dioxygenases of Chlorobiphenyl-Degrading Species Rhodococcus wratislaviensis G10 and Chlorophenol-Degrading Species Rhodococcus opacus 1CP Induced in Benzoate-Grown Cells and Genes Potentially Involved in These Processes // Biochemistry (Moscow). - 2016. - T. 81, № 9. - P. 1241-1255.

Grant: The work was funded by Russian Science Foundation, grant no 14-14-00368.

УДК: 543.635.9, ББК: 24.4

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИАЗОФОСА И КАРБАРИЛА МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА В ВОДЕ И ЗЕРНЕ ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ

А.Ю.Бородулева, С.А.Еремин

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, 119991, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/73, boroduleva.anna@gmail.com, 8-962-939-84-89, 8-(495)-939-41-92

Получены иммунореагенты для поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) триазофоса и карбарила. Разработаны экспрессные методики анализа воды и зерна на содержание данных веществ. Методики анализа оптимизированы для проведения параллельного определения двух пестицидов в пробах, приготовленных по одной схеме.

Ключевые слова: Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; пестициды; триазофос; карбарил; мультидетекция.

Современные пестициды, разрешенные к применению для обработки растений, обладают меньшей токсичностью и быстрее разлагаются в внешней среде по сравнению со своими предшественниками. Однако, во избежание случаев отравления, содержание пестицидов в воде, сельскохозяйственных культурах и пищевых продуктах законодательно нормируется во многих странах. Аналитическому контролю подлежит широкий спектр продукции, что подразумевает необходимость разработки экспрессных и недорогих методов скринингового анализа.

Нами разработаны методики поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) для одновременного определения двух веществ – триазофоса и карбарила – в воде и в зерне хлебных злаков. Для выполнения данной работы был синтезирован ряд трейсеров; их структура была подтвержена методом тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с ВЭЖХ. Были определены оптимальные концентрации иммунореагентов и выбраны трейсеры, применение которых позволяет достичь наилучшей чувствительности анализа. Были подобраны условия пробоподготовки зерна, в которых влияние матрицы пробы на анализ каждого из пестицидов нивелируется,

что позволило проводить определение пестицидов параллельно в одно время и по одной схеме. Пределы обнаружения триазофоса и карбарила в воде составили 1.5 и 6 нг / мл, соответственно, пределы обнаружения триазофоса и карбарила в зерне - 40 и 150 нг / г, соответственно. Показано соответствие результатов ПФИА результатам, полученным методом ВЭЖХ-МС, в исследовании зерна и воды, контаминированных триазофосом и карбарилом.

На основании сравнения ряда трейсеров выбраны трейсеры с меткой этилендиаминфлуоресцеинизотиоцианат (ЭДФ), позволяющие проводить определение анатитов с наилучшей чувствительностью. Разработаны простые и быстрые методики определения карбарила и триазофоса в воде и в зерне хлебных

злаков методом ПФИА; методика ПФИА карбарила разработана впервые. Подобраны общие условия пробоподготовки зерна для анализа карбарила и триазофоса. Чувствительность анализа является достаточной для проведения скрининга образцов на уровне ниже максимально допустимого.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TRIAZOPHOS AND CARBARYL USING FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY IN WATER AND CEREALS

A.Boroduleva, S.Eremin

Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Russia, Moscow, Leninskie gory, building 1, 119991, Russia , 119991, Moscow, Leninskie gory, 1/73

Immunoreagents for the development of fluorescence polarization immunoassay (FPIA) of triazophos and carbaryl are obtained. Express methods of water and cereals analysis are developed. Analysis procedure for parallel determination of two pesticides in the samples prepared according to the same scheme is optimized.

Key words: Fluorescence polarization immunoassay; pesticides; triazophos; carbaryl; multidetection.

Modern pesticides approved for agricultural use are less toxic and less stable in environment than its predecessors. However, in order to avoid cases of poisoning, levels of pesticides in water, crops and food are standartized in many countries. Many products are subjected to analytical control, so the development of express and inexpensive analytical methods is necessary.

We have developed fluorescence polarization immunoassay methods for simultaneous determination of two pesticedes – triazophos and carbaryl – in water and cereals. Different tracers were synthesized for this work; their structures were confirmed by high-resolution tandem mass spectrometry coupled with HPLC. Optimum concentrations of immunoreagents were determined and tracers for the most sensitive FPIA were chosen. Sample preparation conditions allowing to minimize matrix effect of sample for both pesticede analisis were selected, so pesticides were determined in parallel at one time and under one scheme. Triazophos and carbaryl LODs in water were 1.5 and 6 ng / ml, respectively, triazophos and carbaryl LODs in grain were 40 and 150 ng / g, respectively. The correspondence of FPIA results of analysis to the HPLC-MS results of analysis of contaminated grain and water was shown.

Tracers with ethylenediamine fluoresceinthiocarbamyl label were chosen because they allow to determine analytes with the highest sensitivity. Simple and rapid FPIA methods for carbaryl and triazophos determination in water and cereals were developed; FPIA for carbaryl was first developed. The equal conditions of grain sample preparation for the analysis of carbaryl and triazophos were chosen. Sensitivity of the assay is sufficient for real sample screening below the maximum permissible level.

577.151.45, ББК:

КИНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗ ИЗ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГРИБОВ С ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗАМИ

Булахов А.Г.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Ленинский проспект., 33, к. 2, Москва, 119071, alexbulakhov@yahoo.com, +79096775052.

Исследовано взаимодействие полисахаридмонооксигеназ (ПМО) с целлобиогидролазами(ЦБГ) и эндоглюканазами при осахаривании целлюлозы. Показано, что по кинетике накопления продукта деструкции целлюлозы под действием смесей ПМО с ЦБГI и ЦБГII, можно определить тип оксигеназы.

Ключевые слова: полисахаридмонооксигеназа, осахаривание целлюлозы, целлобиогидролаза I и II

Недавно было обнаружено, что полисахаридмонооксигеназы, являются важными компонентами мультиферментных целлюлазных комплексов, продуцируемых микроскопическими грибами. ПМО

осуществляют окислительную деполимеразацию целлюлозы, как правило, действуя либо на C1, либо на C4 атом ангидроглюкозного остатка полимерной цепи. Для проявления каталитической активности ПМО необходимо наличие в реакционной смеси донора электронов и растворенного кислорода. В качестве доноров могут выступать химические агенты, такие как аскорбиновая или галлиевая кислоты, а также целлобиозодегидрогеназа (ЦДГ) – фермент, входящий в состав мультиферментной системы грибов и катализирующий сопряженную реакцию окисления целлобиозы. Ранее мы показали, что введение ПМО вместе с ЦДГ в целлюлазный комплекс на основе Penicillium verruculosum увеличивает его осахаривающую способность при деструкции микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) до 30%. Однако влияние ПМО на активность индивидуальных ферментов, входящих в состав целлюлазных препаратов, изучено не достаточно; кроме того, тип действия ПМО определяют с помощью весьма трудоемкого анализа. В данной работе было исследовано влияние ПМО из Thielavia terrestris, Trichoderma reesei и Myceliophthora thermophila на осахаривающую способность ферментных смесей на основе целлобиогидролаз I и II T. reesei, а также эндоглюканаз (ЭГ) I и II P. verruculosum. Путем сравнения кинетики накопления продукта гидролиза целлюлозы исследуемыми и контрольными ферментными смесями (содержащими и не содержащими ПМО, соответственно) было выяснено, что ПМО разных типов по-разному взаимодействуют с ЦБГI и ЦБГII. ПМО первого типа проявляли синергетический эффект с ЦБГI, при этом несколько ослабляя действие ЦБГII. В то же время ПМО смешанного типа усиливала действие обеих ЦБГ. Исследование же деструкции целлюлозы смесями ЭГ с ПМО не выявило заметного синергизма и существенных различий между разными ПМО. Таким образом, были показано, что потенциально тип действия ПМО можно определить по его взаимодействию с ЦБГI и ЦБГII, однако для подтверждения обнаруженных закономерностей требуются дальнейшие эксперименты на более широком наборе ферментов.

Финансирование: Работа выполнена в соответствии с государственным заданием по теме «Создание высокоактивных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз, а также ферментов негидролитической природы, усиливающих гидролитическое действие карбогидраз, для превращения в сахара, спирты и органические кислоты углевод-содержащих отходов промышленности и сельского хозяйства», Номер гос регистрации: 01201351359.

KINETIC INSIGHTS TO INTERACTION BETWEEN INDIVIDUAL CELLULASES FROM FUNGAL MULTIENZYME COMPLEXES AND POLYSACCHARIDE MONOOXYGENASES

A.G. Bulakhov

Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Address: Leninsky prospect, 33, build. 2, 119071 Moscow, Russian Federation, alexbulakhov@yahoo.com

We have investigated interaction of polysaccharide monooxygenases (PMO) with cellobiohydrolases (CBH) and endoglucanases (EG) during saccharification of cellulose. It was demonstrated that analysis of kinetics of accumulation of products during cellulose destruction by mixtures of PMO with CBHI and II can reveal the PMO's type.

Key words: polysaccharide monooxygenases, saccharification of cellulose, cellobiohydrolase I and II.

Recently it was discovered that polysaccharide monooxygenases (PMO) are key components of multienzyme cellulolytic complexes produced by fungi. PMO performs oxidative depolymerization of cellulose. Enzyme usually acts on C1 or C4 atom of anhydroglucose residue of polymer chain. Electron donor and molecular oxygen presence in reaction mixture are essential for PMO's catalytic activity. Either chemicals, such as ascorbic or gallic acids, or cellobiosedehydrogenase (CDH) are capable to be a donor. CDH is one of the enzyme of fungal secretome which catalyzes the reaction of cellobiose oxidation. Previously we had shown that addition of PMO with CDH to cellulase complex from Penicillium verruculosum increases its saccharification ability of avicell for up to 30%. Therefore the influence of PMO's action to activity of individual cellulases from enzyme preparations is not enough researched. Besides the detection of PMO's type is a very laborious analysis. In this paper we have researched the influence of PMOs from Thielavia terrestris, Trichoderma reesei and Myceliophthora thermophila on saccharification ability of cellobiohydrolases (CBH) I and II T. reesei, and of endoglucanases (EG) I and II P. verruculosum. The analysis of kinetics of accumulation of product of cellulose destruction by investigated and control enzyme mixtures (the

former contained PMO, the last did not) revealed that PMO of different type variously interact with CBHI and II. First type PMO exhibited synergism with CBHI, while it had slightly decreased CBHII's activity. Investigation of interaction of PMOs and EG had not elucidated synergetic effects and differences between different types of PMOs. Thus PMO's type is expected to be identified by its interaction with CBHI and CBHII. Nevertheless the confirmation of found behavior is required to be proved with more broad range of enzymes.

УДК: УДК 57.085.23, ББК:

БЕЛОК ЧЕЛОВЕКА SLURP-1 – ПРИРОДНЫЙ ЗАЩИТНИК КЛЕТОК ЛЕГКОГО ОТ НИКОТИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ.

М.Л.Бычков, М.А.Шулепко, Е.Н.Люкманова

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, Россия, 119192, Москва, Ленинские горы, 1 , maksim.bychkov@gmail.com, +7 977 720 89 67

SLURP-1 - природный белок человека, являющийся селективным аллостерическим антагонистом α7-nAChR. Рекомбинантный препарат SLURP-1 ингибирует пролиферацию клеток карциномы легкого A549, а также останавливает рост клеток A549, вызванный активацией α7 нАХР никотином. SLURP-1 может служить рассматриваться как в качестве новогоый, первого в своем классе, противоопухолевыйого препарата природного происхождения с высокой противоопухолевой эффективностью и низкой токсичностью и иммуногенностью.

Ключевые слова: SLURP-1; α7-nAChR; A549; терапия рака

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR) является лигандозависимым ионным каналом и играет важную роль в межклеточной сигнализации. С дисфункциями nAChR связано возникновение и развитие ряда расстройств нервной, мышечной, иммунной и эндокринной систем. В последнее время появились данные о локализации некоторых подтипов nAChR в тканях эпителиального происхождения и о вовлечении этих рецепторов в процессы клеточной пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза. Известно, что с употреблением никотина (табака) связано развитие сердечно-сосудистых заболеваний, а также рака легкого, поджелудочной железы, толстой кишки, желудка и мочевого пузыря. Показано, что активация nAChR типа α7 (α7-nAChR) никотином стимулирует пролиферацию и миграцию раковых клеток легкого (1,2). Таким образом, α7-nAChR является перспективной мишенью для разработки новых противоопухолевых препаратов, - селективных ингибиторов этого рецептора. Прообразами для подобных препаратов могут выступать природные эндогенные нейропептиды семейства Ly6/uPAR. Одним из таких пептидов является SLURP-1 (SecretedLy-6/uPAR-relatedprotein 1) - природный белок человека, секретируемый эпителиальными клетками и являющийся ауто/паракринным регулятором дифференциации и пролиферации клеток. Ранее нами было показано, что SLURP-1 является селективным аллостерическим антагонистом α7-nAChR (3).

В ходе данного исследования мы исследовали влияние рекомбинантного препарата SLURP-1 на пролиферацию нормальных кератиноцитов (линия HaCat) и клеток карциномы легкого (линия A549). Было показано, что SLURP-1 ингибирует пролиферацию кератиноцитов и раковых клеток с IC50 41,8 и 2,32 нМ, соответственно. Разница в действии препарата на нормальные и раковые клетки свидетельствует о наличии «терапевтического окна», и, соответственно, об условной безопасности применения рекомбинантного SLURP-1 при терапии опухолей. Изучение морфологии клеточных ядер после их окраски флуоресцентными ядерными красителями показало, что рекомбинантный SLURP-1 не вызывает в клетках ни некротической, ни апоптотической гибели клеток.

Так как потребление никотина напрямую связано с развитием рака легкого, мы изучили влияние препарата SLURP-1 на никотин-индуцированную пролиферацию опухолевых клеток. Мы показали, что никотин стимулирует пролиферацию клеток A549. Методами иммуногистохимии установлено, что никотин увеличивает экспрессию α7-nAChR в клетках A549, ингибируя при этом секрецию эндогенного SLURP-1. Напротив, обработка клеток A549 рекомбинантным SLURP-1 предотвращает увеличение экспрессии α7-nAChR под действием никотина и останавливает никотин-индуцированный рост клеток A549. Таким образом, SLURP-1, обладающий выраженной антипролиферативной активностью по отношению к опухолевым клеткам, может рассматриваться как новый противоопухолевый препарат природного происхождения с низкой токсичностью и иммуногенностью.

1. Рекомбинантный препарат SLURP-1 ингибирует пролиферацию клеток карциномы легкого A549. 2. Никотин стимулирует пролиферацию клеток A549 посредством увеличения экспрессии α7-nAChR и ингибирования секреции клетками эндогенного SLURP-1 3. Обработка клеток A549 что рекомбинантнойм SLURP-1 в клетках A549 предотвращает увеличение экспрессии α7-nAChR под действием никотина и останавливает никотин-индуцированный рост клеток A549 4. SLURP-1, может служить рассматриваться как в качестве новогоый, первого в своем классе, противоопухолевыйого препарата природного происхождения с высокой противоопухолевой эффективностью и низкой токсичностью и иммуногенностью.

Литература.
1. Chernyavsky A.I., Shchepotin I.B., Galitovkiy V., Grando S.A. Mechanisms of tumor-promoting activities of nicotine in lung cancer: synergistic effects of cell membrane and mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors//BMC Cancer. 2015.Vol. 5 № 152. doi: 10.1186/s12885-015-1158-4. 2. Zhang C., Ding X.P., Zhao Q.N., Yang X.J., An S.M., Wang H., Xu L., Zhu L., Chen H.Z. Role of a7-nicotinic acetylcholine receptor in nicotine-induced invasion and epithelial-to-mesenchymal transition in human non-small cell lung cancer cells//Oncotarget. 2016.Vol. 8. doi: 10.18632/oncotarget.10498. 3. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D., Bychkov M.L., Kulbatskii D.S., Kasheverov I.E., Astapova M.V., Feofanov A.V., Thomsen M.S., Mikkelsen J.D., Shenkarev Z.O., Tsetlin V.I., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Human Secreted Ly-6/uPAR Related Protein-1 (SLURP-1) Is a Selective Allosteric Antagonist of α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor//PLoS One. 2016 Feb 23;. Vol. 11 №2 e0149733. doi: 10.1371/journal.pone.0149733.

Финансирование: Проект поддержан грантом Российского Научного Фонда (№ 14-14-0025)

HUMAN PROTEIN SLURP-1 - A NATURAL DEFENDER OF LUNG CELLS FROM THE NICOTINE-INDUCED CELL PROLIFERATION AND MALIGNANT TRANSFORMATION.

M.Bychkov, M.Shulepko, E.Lyukmanova

Biology department Lomonosov MSU, Moscow, Russia, Russia, 119192, Moscow, Leninskie gory, 1

SLURP-1 - natural human protein, which acts as selective, allosteric antagonist of α7-nAChR. Recombinant SLURP-1 preparation inhibits the proliferation of A549 lung carcinoma cells and stops the growth of A549 cells induced by nicotine activation of α7 nAChR. SLURP-1 can be considered as a new anticancer drug of natural origin, with a low toxicity and immunogenicity.

Key words: SLURP-1; α7-nAChR; A549; cancer therapy

Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is ligand-dependent ion channel that plays an important role in intercellular signaling. Dysfunctions of nAChR are related to the emergence and development of a number of disorders of the nervous, muscular, immune and endocrine systems. Recently new data were obtained about localization of nAChR subtypes in tissues of epithelial origin, and the involvement of these receptors in processes of cell proliferation, differentiation, migration and apoptosis. It is known that consumption of nicotine (tobacco) is associated with the development of cardiovascular diseases as well as lung, pancreas, colon, stomach and bladder cancers. It has been shown that activation of αalfa7 type nAChR (αalfa7-nAChR) by nicotine stimulates proliferation and migration of cancer lung cells (1,2). Thus, αalfa7-nAChR may serve as promising target for the development of new anticancer drugs - selective inhibitors of the receptor. Natural endogenous neuropeptides from the family Ly6/uPAR family can act as prototypes for such drugs. One of these peptides is SLURP-1 (Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1) - a natural human protein secreted by epithelial cells, which serves and is as the auto / paracrine regulator of cell differentiation and proliferation. We have previously showed that SlurpLURP-1 is a selective allosteric antagonist of α7- nAChR (3).

In this study we investigated the effect of drug recombinant SLURP-1 on the proliferation of normal keratinocytes (HaCaT line) and lung carcinoma tumor lung cells (A549 line), and SLURP-1 effect on nicotine-induced growth of NSCLC cells. It was shown that 1 μM of SLURP-1 preparation inhibits the proliferation of normal keratinocytes line HaCaT and A549 cells with IC50 41,8 and 2.32 nM, respectively.by 21% and 32%, respectively. Thus, the preparation of recombinant SLURP-1 stops the proliferation of A549 lung carcinoma cells with an effective half-maximal concentration of 2.32 nM. The study of morphology of cell nuclei after nuclear staining with fluorescent dyes showed that recombinant SLURP-1 does not cause necrotic or apoptotic cell death. The difference in efficiency of

SLURP-1 action of preparation points on the a existence of «therapeutic window» and thus the conditional safety of the drug recombinant SLURP-1 for cancer therapy. The study of morphology of cell nuclei after nuclear staining with fluorescent dyes showed that recombinant SLURP-1 does not cause necrotic or apoptotic cell death.

Since nicotine addiction is directly linked with the development of lung cancer, we studied the effect of SLURP-1 preparation on nicotine-induced tumor cell proliferation. We have showed that nicotine stimulates the proliferation of A549 lung carcinoma cells. Immunohistochemistry revealed that nicotine increases the 7- nAChR expression in A549 cells, simultaneously inhibiting the secretion of endogenous SLURP-1. In contrast, treatment of tumor cells with recombinant SLURP-1 in A549 cells prevents an increase of 7- nAChR expression induced by nicotine, and stops nicotine-induced growth of A549 cells.

Thus, SLURP-1, which has the pronounced anti-proliferative activity against lung carcinoma tumor cells, could be considered as a new anticancer agent of natural origin with low toxicity and immunogenicity.

1. Recombinant SLURP-1 preparation inhibits proliferation of A549 lung carcinoma cells. 2. Nicotine stimulates proliferation of A549 cells by increasing the expression of the α7-nAChR and inhibiting the secretion of endogenous SLURP-1 by cells 3. Treatment of A549 cells with recombinant SLURP-1 prevents increase of α7-nAChR expression by nicotine and stops nicotine-induced growth of A549 cells 4. SLURP-1 can be considered as a new anticancer drug of natural origin, with a low toxicity and immunogenicity.

References:
1. Chernyavsky A.I., Shchepotin I.B., Galitovkiy V., Grando S.A. Mechanisms of tumor-promoting activities of nicotine in lung cancer: synergistic effects of cell membrane and mitochondrial nicotinic acetylcholine receptors//BMC Cancer. 2015.Vol. 5 № 152. doi: 10.1186/s12885-015-1158-4. 2. Zhang C., Ding X.P., Zhao Q.N., Yang X.J., An S.M., Wang H., Xu L., Zhu L., Chen H.Z. Role of a7-nicotinic acetylcholine receptor in nicotine-induced invasion and epithelial-to-mesenchymal transition in human non-small cell lung cancer cells//Oncotarget. 2016.Vol. 8. doi: 10.18632/oncotarget.10498. 3. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Kudryavtsev D., Bychkov M.L., Kulbatskii D.S., Kasheverov I.E., Astapova M.V., Feofanov A.V., Thomsen M.S., Mikkelsen J.D., Shenkarev Z.O., Tsetlin V.I., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Human Secreted Ly-6/uPAR Related Protein-1 (SLURP-1) Is a Selective Allosteric Antagonist of α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor//PLoS One. 2016 Feb 23;. Vol. 11 №2 e0149733. doi: 10.1371/journal.pone.0149733.

Grant: The work was supported by a grant from the Russian Science Foundation (№ 14-14-0025).

УДК: 544.7, ББК: 24.6

СИНТЕЗ ДВУХСЛОЙНЫХ НАНОЧАСТИЦ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ, ПОКРЫТЫХ ХИТОЗАНОМ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

А.Н.Ванеев[1], А.Д.Алексашкин[2], Т.О.Абакумова[3], О.А.Кост[2], А.В.Кабанов[2], Н.Л.Клячко[2]

[1]МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/11, vaneev.aleksandr@gmail.com, 89175863878
[2]МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/11,
[3]ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России, Россия, 119991, Москва, Кропоткинский пер., 23

В данной работе синтезировали двухслойные наночастицы супероксиддисмутазы на основе блок-иономерного комплекса с протамином и полиглутаминовой кислотой-полиэтиленгликолем, покрытые хитозаном, для дальнейшего применения в офтальмологии.

Ключевые слова: наночастицы, супероксиддисмутаза, доставка лекарств, хитозан

В настоящее время ведется активный поиск новых средств для лечения заболеваний глаз, связанных с воспалительными процессами. Одним из таких заболеваний является увеит - воспаление сосудистой оболочки глаза. Данная проблема актуальна, поскольку при отсутствии должной терапии увеит часто приводит к слепоте. В патогенезе увеита важную роль играет окислительный стресс, и введение антиоксидантов может оказаться эффективным. Антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза, обладают на порядки большей эффективностью по сравнению с низкомолекулярными антиоксидантами, поскольку ферменты способны многократно вступать в реакцию с субстратом. Однако местное введение нативных ферментов (в виде глазных капель) оказывается неэффективным в связи с их быстрым выведением. Поэтому важно создать систему, которая будет обладать, во-первых, большим временем удерживания в области глазных тканей, во вторых, малой иммуногенностью.

С этой целью в ходе данной работе нами были получены двухслойные наночастицы супероксиддисмутазы,

покрытые хитозаном. Полимерная оболочка должна снизить иммуногенность препарата, а хитозан, благодаря своим мукоадгезивным свойствам, увеличить время удерживания.

На первом этапе были получены наночастицы СОД на основе блок-иономерных комплексов с полиионами. Для этого к раствору СОД добавляли раствор протамина, а затем раствор полианиона ПЭГ-ПГ (сополимер метокси-поли(этиленгликоль)113-блок-поли (L-глутаминовой кислоты натриевая соль)50). Затем добавляли глутаровый альдегид (0,5% водный раствор). Побочные продукты и непрореагировавшие реагенты удаляли центрифугированием. Данная методика позволила получить наночастицы СОД отрицательного заряда (зета-потенциал -13 мВ) диаметром 50 нм. Активность наночастиц была определена с использованием пирогаллола.

Эксперименты по высвобождению проводились с использованием диализных контейнеров (100 кДа). Было показано, что СОД из наночастиц с течением времени высвобождается гораздо медленнее, чем нативная СОД, и суммарная активность наночастиц продолжает сохраняться в течение 24 часов. Так, за 24 часа из раствора с нативным ферментом высвободилось 90% СОД, за это же время из раствора с наночастицами только 30%. Это свидетельствует о том, что СОД прочно связана с полимерами, и, благодаря этому, частицы могут обладать большим временем циркуляции в отличие от нативного фермента.

На втором этапе к наночастицам СОД добавляли раствор хитозана (молекулярная масса 5 кДа, раствор в воде 1 мг/мл). Покрытие наночастиц хитозаном подтверждается изменением зета-потенциала (с отрицательного на положительный).

Таким образом, были получены двухслойные наночастицы супероксиддисмутазы, покрытые хитозаном.

Финансирование: Данная работа выполнена при поддержке гранта РНФ №14-13-00731.

SYNTHESIS OF DOUBLE-LAYER NANOPARTICLES OF SUPEROXIDE DISMUTASE COVERED BY CHITOSAN FOR OPHTHALMIC APPLICATIONS

A.Vaneev[1], A.Aleksashkin[2], T.Abakumova[3], O.Kost[2], A.Kabanov[2], N.Klyachko[2]

[1]Lomonosov Moscow State University, Faculty of Material Science, Russia, 119991, Moscow, Leninskie gori , 1/11
[2]Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Russia, 119991, Moscow, Leninskie gori , 1/11
[3]The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Russia, 119991, Moscow, Kropotkinsky, 23

Double-layered nanoparticles of superoxide dismutase based on block ionomer complexes with protamine and polyglutamic acid-polyethylene glycol covered by chitosan were obtained for following applications in ophthalmology.

Key words: nanoparticles, superoxide dismutase, drug delivery, chitosan

Nowadays, an active search for new drugs for treatment of ocular diseases occurs. For example, uveitis is inflammatory disease of the uvea. Search for drugs to treat uveitis effectively is important. The reason is that in the absence of proper therapy, this disease often leads to blindness.

Oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of uveitis, and injection of antioxidants may be effective. Antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase, have much more efficiency in comparison with small molecular antioxidants, because the enzymes react with the substrate repeatedly. However, administering native enzymes to the eye in the form of eye drops is ineffective due to their rapid clearance. Therefore, it is important to create a drug delivery system that will possess long time of circulation and low immunogenicity.

To achieve this goal, SOD nanoparticles covered with chitosan were synthesized. Polymeric shell was used to decrease immunogenicity; chitosan was used to increase time of circulation.

Briefly, SOD nanoparticles were synthesized by mixing of SOD solution with protamine and PLE-PEG solutions sequentially after that glutaraldehyde was added. Byproducts were removed by centrifugation through centrifugal filters. Nanoparticles of 50 nm in diameter with negative charge were obtained.

The release experiments were conducted using a dialysis container (100 kDa). SOD had being released from nanoparticles more slowly than the native SOD; total activity of nanoparticles was saved for 24 hours.

Thus, 90% SOD had released after 24 hours from the solution with the native enzyme, for the same time 30% SOD had released from the solution with nanoparticles. This demonstrates that SOD connected strongly with the polymers and through this the particles may have a large circulation time as opposed to the native enzyme.

Chitosan solution (molecular weight 5 kDa; aqueous solution 1 mg/ml) was added to nanoparticles to cover them. To confirm that particles were covered with chitosan, zeta-potential was measured: it changed from negative to positive values.

Thus, superoxide dismutase nanoparticles covered with chitosan were obtained.

Grant: This work was supported by RSF grant №14-13-00731

УДК: 577.322.75, ББК:

СОСТАВЛЕНИЕ ПЕПТИДНЫХ КАРТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ МОДИФИКАЦИЙ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ (НА ПРИМЕРЕ ФИБРИНОГЕНА И ПЛАЗМЕННОГО ФИБРИНСТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО ФАКТОРА)

А.Д.Васильева, Л.В.Юрина, А.В.Бычкова, А.Е.Бугрова, М.И.Индейкина, А.С.Кононихин, Е.Н.Николаев, М.А.Розенфельд

Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии Наук, Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина , 4, ms.kadaver@mail.ru, +79256261779

Методом масс-спектрометрии исследованы сайты окислительных модификаций плазменных факторов свертывания крови - фибриногена и фибринстабилизирующего фактора. Выявлен ряд аминокислотных остатков, чувствительных к воздействию окислителя, и сделаны предположения о их влиянии на структуру и функции плазменных факторов свертывания крови.

Ключевые слова: Масс-спектрометрия, фибриноген, фибринстабилизирующий фактор, окисление, посттрансляционные модификации, картирование белков

Окислительный стресс может быть одним из важнейших факторов в патогенезе различных заболеваний, в том числе, атерогенезе и в этиологии тромбоза. Белки, циркулирующие в плазме крови, являются мишенями для активных форм кислорода (АФК) и могут выступать в качестве биологических маркеров окислительного стресса [1]. Несмотря на значительное количество работ по окислительной модификации белков, наблюдается общий дефицит исследований, направленных на идентификацию сайтов окисления в молекулах [2].

В качестве объектов исследования нами были выбраны ключевые белки-факторы свертывания крови: фибриноген и плазменный фибринстабилизирующий фактор (pFXIII).

Чувствительность фибриногена к окислительной модификации в 20 раз превышает чувствительность других основных белков плазмы крови (альбумина, иммуноглобулинов, трансферрина, церулоплазмина) [3]. Таким образом, фибриноген, составляющий около 4% белков плазмы крови, in vivo ранее других и в большей степени подвергается окислительной модификации [4]. Окислительная модификация молекул фибриногена вызывает сборку так называемого тромбогенного фибрина. Структура такого фибрина характеризуется более тонкими индивидуальными фибриллами, низкой пористостью, ослаблением механической прочности и повышенной резистентностью к плазминовому гидролизу [2], что может стать одной из причин тромбоэмболии и прочих заболеваний.

pFXIII является полифункциональным белком, основная и наиболее детально изученная функция которого заключается в ковалентном сшивании полипептидных γ- и α-цепей фибрина. pFXIII также оказывает антитромботическое действие путем ингибирования адгезии тромбоцитов к полимерам фибрина, имеет важное значение для поддержания беременности, участвует в заживлении ран и ангиогенезе [5, 6]. Ранее было показано, что индуцированная озоном окислительная модификация pFXIII сопровождается изменениями в его химической структуре и снижением активности фермента [7].

При исследовании окислительной модификации каталитической субъединицы в pFXIII методом масс-спектрометрии были обнаружены следующие окислительные сайты: Tyr104, Tyr117, Cys153 (β-сэндвич), Met160, Trp165, Met266, Cys328, Asp352, Pro387, Arg409, Cys410, Tyr442, Met475, Met476, Tyr482, Met500 (центральный каталитический домен), Met596 (β-цилиндр 1), Met647, Pro676, Trp692, Cys696, Met710 (β-цилиндр 2). Из числа обнаруженных модифицированных аминокислот, Tyr442 и Tyr481 находятся в области связывания кальция молекулой pFXIII. Присутствие окисленных аминокислот на таких функционально важных участках может приводить к частичной и полной потере ферментативной активности.

Были получены данные о модификациях ряда аминокислотных остатков молекулы фибриногена методом масс-спектрометрии. В Aα-цепи фибриногена были обнаружены следующие окислительные сайты: His24, His 84, Met91, His132, Met 147, Tyr178, Lys191, His201, Met207, Lys208, Pro209, Trp229, Met235, Met 238, Met 240, Tyr 258, Trp276, Trp302, Trp341, Trp391, His456, Met476, Met517, His544, His 545, Pro546, Met 584. Расположение окисленного остатка AαTrp302 рядом с остатком AαLys303, ковалентно сшивающимся с α2-антиплазмином [9], может оказывать влияние на устойчивость фибринового сгустка к плазминовому гидролизу. Окисление остатка Met476, а также других обнаруженных сайтов окисления в αC-домене, может препятствовать латеральной агрегации протофибрилл, что сказывается на структуре фибринового сгустка [2]. Окисленные аминокислотные остатки Tyr41, His67, Met118, Tyr119, Tyr142, His149, Met190, Tyr225,

Met242, Tyr292, Pro307, Met314, Met367, Met373, Trp385, Trp402, Trp403, Trp418, Trp424, Met426, Met438, Trp444, Met447 были идентифицированы в Bβ-цепи. Окисление остатка βMet367 также, как и других остатков, входящих в структуру β-модуля, может влиять на конформацию фрагмента β330-375, ответственного, как полагают [9], за латеральную агрегацию протофибрилл посредством взаимодействия двух β-модулей. В γ-цепи окислительной модификации оказались подвержены Met78, Met89, Met94, His146, Trp208, His217, Trp227, Pro243, Tyr244, Trp253, Met264, Tyr274, His400.

Работы по картированию молекул белков с точным обозначением сайтов модификации аминокислот при окислении способствуют получению специфичных антител к окисленным эпитопным последовательностям белков [12], что необходимо для совершенствования методов диагностики группы патологий и создания тест-систем нового поколения.

1. Были исследованы окислительные модификации индуцированно окисленных белков – факторов свертывания крови. По данным эксперимента, при индуцированном окислении у исследуемых белков модифицируются аминокислотные остатки, которые (из литературных данных) могут прямо или косвенно влиять на структуру белков и выполнение их функций. 2. Наибольшее количество модификаций обусловлено вовлечением в окислительный процесс наиболее легко окисляемых серосодержащих аминокислотных остатков цистеина и метионина. Ароматические аминокислотные остатки тирозина и триптофана также являются уязвимой мишенью для окислителя. 3. Результаты исследования могут быть использованы для совершенствования методов диагностики и создания тест-систем нового поколения.

Литература.
1. Stadtman E. Protein oxidation and aging//Free Radic. Res. 2006. Vol. 40. № 12. P. 1250–1258. 2. Martinez, M.; Weisel, J. W.; Ischiropoulos, H. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots// Free Radic. Biol. Med. 2013. Vol. 65. P. 411–418; 3. Shacter, E.; Williams, J. A.; Lim, M. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay//Free Radic. Biol. Med. 1994. Vol. 17. P. 429–436. 4. Henschen-Edman A. H. Fibrinogen non-inherited heterogeneity and its relationship to function in health and disease//Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. Vol. 936. P. 580–593. 5. Karimi M., Bereczky Z., Cohan N., Muszbek L. Factor XIII Deficiency Semin//Thromb Hemost. 2009. Vol. 35. P. 426–38. 6. Muszbek L., Bagoly Z.,Cairo A., Peyvandi F. Novel aspects of factor XIII deficiency//Curr Opin Hematol. 2011. Vol. 18. P. 366–372. 7. Rosenfeld M. A., Bychkova A. V., Shchegolikhin A. N., Leonova V. B.,Biryukova M. I., Kostanova E. A. Ozone-Induced Oxidative Modification of Plasma Fibrin-Stabilizing Factor//Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1834. № 12. P. 2470–2479. 8. Tamaki T., Aoki N. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor//Biochim Biophys Acta. 1981. Vol. 661. P. 280-286. 9. Yang Z., Mochalkin I., Doolittle R. F. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 14156–14161. 10. Weisel J. W., Litvinov R. I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications//Blood. 2013. Vol.121. № 10. P. 1712–1719. 11. Rosenfeld M. A., Bychkova A. V., Shchegolikhin A. N., Leonova V. B., Kostanova E. A., Biryukova M. I., Sultimova N. B., Konstantinova M. L. Fibrin Self-Assembly is Adapted to Oxidation//Free Radic Biol Med. 2016. Vol. 95. P. 55–64. 12. Persson C., Kappert K., Engström U., Östman A., Sjöblom T. An antibody-based method for monitoring in vivo oxidation of protein tyrosine phosphatases//Methods. 2005. Vol. 35. P. 37–43

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-15-04-08188а и № 16-34-60244 мол_а_дк. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского Научного фонда, № 16-14-00181

COMPILATION PEPTIDE MAPS OF OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS OF BLOOD PLASMA (FIBRINOGEN AND PLASMA FIBRINSTABILIZING FACTOR)

A.Vasilyeva, L.Yurina, A.Bychkova, A.Bugrova, M.Indeykina, A.Kononikhin, E.Nikolaev, M.Rosenfeld

N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Russia, 119334, Moscow, Kosygina st., 4

Oxidative modification sites of plasma clotting factors (fibrinogen and plasma fibrin-stabilizing factor) were investigated by mass spectrometry method. A number of amino acid residues susceptible to oxidant were identified, Assumptions about their impact on the structure and function of plasma clotting factors are made.

Key words: Mass spectrometry, fibrinogen, fibrinastabilizing factor, oxidation, post-translational modifications, protein mapping

Oxidative stress can be a major factor in the pathogenesis of various diseases including thrombosis and atherogenesis etiology. Proteins found in the blood plasma, are targets for reactive oxygen species (ROS) and can serve as biological markers of oxidative stress [1]. Despite the significant amount of issues on the oxidative modification of proteins, there is still a general lack of studies aimed at the identification of sites of oxidation in the molecules [2].

As objects of the research the key coagulation factors proteins were chosen: fibrinogen and plasma fibrin-stabilizing factor (pFXIII).

Fibrinogen is 20 times more sensitive to the oxidative modification than other major plasma proteins (albumin, immunoglobulins, transferrin, ceruloplasmin) [3]. Thus, fibrinogen, representing about 4% of blood plasma proteins, largely undergoes oxidative modification in vivo [4]. Oxidative modification of fibrinogen molecules causes assembly of the so-called thrombogenic fibrin. The structure of this fibrin is characterized by a thinner individual fibril, low porosity and weakening of mechanical strength, improved resistance to hydrolysis by plasmin [2], which may be one of the reasons of thromboembolism and other diseases.

pFXIII is a multifunctional protein with the major function of a covalent crosslinking of polypeptide γ- and α-chain of fibrin. FXIII also exerts antithrombotic effect by the inhibition of platelet adhesion to fibrin polymers. Furthermore, FXIII is essential for maintaining pregnancy and it is involved in wound healing and angiogenesis.

It was previously shown, that ozone-induced oxidative modification pFXIII accompanied by changes in its chemical structure and a reduction in enzyme activity.

Oxidative modification of the study of the catalytic subunit in pFXIII by mass spectrometry following oxidative sites were discovered: β-sandwich (Tyr104, Tyr117, Cys153), a central catalytic domain (Met160, Trp165, Met266, Cys328, Asp352, Pro387, Arg409, Cys410, Tyr442 , Met475, Met476, Tyr482, Met500), β-barrel 1 (Met596), β- barrel 2 (Met647, Pro676, Trp692, Cys696, Met710). Among the modified amino acids detected, Tyr442 and Tyr481 are in calcium binding site of molecule pFXIII. The presence of oxidized amino acids at these functionally important parts can lead to partial or complete loss of enzymatic activity.

Data about modification of a number of amino acid residues of fibrinogen molecule were obtained by mass spectrometry. Following oxidative sites were discovered in the Aα-chain of fibrinogen: His24, His 84, Met91, His132, Met 147, Tyr178, Lys191, His201, Met207, Lys208, Pro209, Trp229, Met235, Met 238, Met 240, Tyr 258, Trp276, Trp302, Trp341, Trp391, His456, Met476, Met517, His544, His 545, Pro546, Met 584. Location of oxidized residue AαTrp302, nearly AαLys303, which covalently cross-linking with α2-antiplasmin [9], may have an impact on the stability of the fibrin clot to plasmin hydrolysis. Oxidation of residue Met476, as well as other sites detected oxidation αC-domain, can inhibit lateral aggregation of protofibrils, which can affects the structure of the fibrin clot. [2] The oxidized amino acid residues Tyr41, His67, Met118, Tyr119, Tyr142, His149, Met190, Tyr225, Met242, Tyr292, Pro307, Met314, Met367, Met373, Trp385, Trp402, Trp403, Trp418, Trp424, Met426, Met438, Trp444, Met447 were identified in Bβ-chains. Oxidation of residue βMet367, as well as other residues within the β-module structure, can affects the conformation β330-375 fragment responsible believed [9], the lateral aggregation of protofibrils by reacting two β- modules. In γ-chain were exposed to oxidative modification: Met78, Met89, Met94, His146, Trp208, His217, Trp227, Pro243, Tyr244, Trp253, Met264, Tyr274, His400.

With the development of mass spectrometry became possible mapping of protein molecules with the exact amino acid modification sites designation by oxidation. This information can become a crucial to generating accurate protein profiles for quick analysis of modifications by mass spectrometry, as well as to produce specific antibodies to oxidized protein epitope sequences [12]. It is necessary to improve the diagnosis and development of new test systems.

1. We investigated oxidative modifications induced oxidation of blood clotting factors. According to the data of the experiment, when the induced oxidation of the studied proteins are modified amino acid residues, which (according to the literature) may directly or indirectly affect the structure of proteins and the fulfillment of their functions. 2. The greatest number of modifications due to the oxidation process involving the most easily oxidizable sulfur-containing amino acids cysteine and methionine. Aromatic amino acid residues tyrosine and tryptophan are also the target of oxidant. 3. The results of the study can be used to improve the diagnosis and development of new test systems.

References:

1. Stadtman E. Protein oxidation and aging//Free Radic. Res. 2006. Vol. 40. № 12. P. 1250–1258. 2. Martinez, M.; Weisel, J. W.; Ischiropoulos, H. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots// Free Radic. Biol. Med. 2013. Vol. 65. P. 411–418; 3. Shacter, E.; Williams, J. A.; Lim, M. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay//Free Radic. Biol. Med. 1994. Vol. 17. P. 429–436. 4. Henschen-Edman A. H. Fibrinogen non-inherited heterogeneity and its relationship to function in health and disease//Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. Vol. 936. P. 580–593. 5. Karimi M., Bereczky Z., Cohan N., Muszbek L. Factor XIII Deficiency Semin//Thromb Hemost. 2009. Vol. 35. P. 426–38. 6. Muszbek L., Bagoly Z.,Cairo A., Peyvandi F.

Novel aspects of factor XIII deficiency//Curr Opin Hematol. 2011. Vol. 18. P. 366–372. 7. Rosenfeld M. A., Bychkova A. V., Shchegolikhin A. N., Leonova V. B.,Biryukova M. I., Kostanova E. A. Ozone-Induced Oxidative Modification of Plasma Fibrin-Stabilizing Factor//Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1834. № 12. P. 2470–2479. 8. Tamaki T., Aoki N. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor//Biochim Biophys Acta. 1981. Vol. 661. P. 280-286. 9. Yang Z., Mochalkin I., Doolittle R. F. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 14156–14161. 10. Weisel J. W., Litvinov R. I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications//Blood. 2013. Vol.121. № 10. P. 1712–1719. 11. Rosenfeld M. A., Bychkova A. V., Shchegolikhin A. N., Leonova V. B., Kostanova E. A., Biryukova M. I., Sultimova N. B., Konstantinova M. L. Fibrin Self-Assembly is Adapted to Oxidation//Free Radic Biol Med. 2016. Vol. 95. P. 55–64. 12. Persson C., Kappert K., Engström U., Östman A., Sjöblom T. An antibody-based method for monitoring in vivo oxidation of protein tyrosine phosphatases//Methods. 2005. Vol. 35. P. 37–43

Grant: The study was supported by RFBR, research project № 15-15-04-08188a and № 16-34-60244 mol_a_dk. The part of research related to peptides and PTM identification by high resolution mass spectrometry measurements was supported by the Russian Science Foundation № 16-14-00181.

УДК: 579.66, ББК: 28.4

УЛУЧШЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ 2 МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА PENICILLIUM VERRUCULOSUM С ПОМОЩЬЮ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

А.В.Вахрушева[1], В.А.Немашкалов[2], Т.В.Бубнова [2], А.М.Рожкова[3], И.Н.Зоров [3], А.П.Синицын[3], А.Г.Габдулхаков[4]

[1]МГУ им. М. В. Ломоносова, Россия, 142290, Пущино, Г, 21, vakhrusheva.ann@yandex.ru, 89856171544
[2]ИБФМ им. Г. К. Скрябина РАН, Россия, 142290, Пущино, Д, 20, vnemashkalov@gmail.com, (4967)31-85-55
[3]ФИЦ Биотехнологий РАН, Россия Москва, Черняховского, 6, amrojkova@mail.ru, 89104644791
[4]Институт Белка РАН, Россия, 142290, Pushchino, Д, 22, azat@vega.protres.ru, (4967)31-82-75

Методом рентгеноструктурного анализа была определена пространственная структура эндоглюканазы 2 из Penicillium verruculosum в изолированном состоянии (PDB ID 5I6S) и в комплексе с целлобиозой (PDB ID 5L9C). На основе полученных данных были спланированы точечные мутации, повлиявшие на физико-химические свойства фермента.

Ключевые слова: эндоглюканаза 2; сайт-направленный мутагенез; Penicillium verruculosum; кормовые ферментные препараты; комбикорм; сельскохозяйственные животные.

В настоящее время использование ферментных препаратов в качестве кормовой добавки является ключевым условием эффективного животноводства [1], главным образом, свиней и птицы. Основой комбикормов для сельскохозяйственных животных являются злаковые культуры, такие как овёс, рожь, пшеница, ячмень и другие, клеточная стенка которых содержит в своём составе труднорасщепляемые некрахмальные полисахариды (НПС) [2]. НПС обладают, так называемыми, антипитательными свойствами, что приводит к уменьшению скорости прохождения корма по пищеварительному тракту, снижению его переваримости и эффективности всасывания питательных веществ. Добавление ферментных препаратов в корма сельскохозяйственных животных позволит снизить вязкость кормов и повысить их усвояемость, как следствие, ускорится рост молодняка и улучшится физиологическое состояние животных [3].

Ключевыми ферментами, используемыми в качестве кормовой добавки для расщепления растворимых НПС, являются β-глюканазы, в число которых входят эндо-1,4-β-глюканазы (ЭГ2). Таким образом, целью данной работы является улучшение физико-химических свойств эндоглюканазы 2 промышленного грибного продуцента ферментов Penicillium verruculosum.

Структуры ЭГ2 и его комплекса с целлобиозой были решены методом рентгеноструктурного анализа. Сначала данный фермент был выделен из P. verruculosum и закристаллизован методом диффузии паров в висячей капле. Структуры были определены методом молекулярного замещения и уточнены до Rcryst=21.8% и Rfree=25.9% при разрешении 2.1 Å. Полученные модели удовлетворяют всем стереохимическим и рентгеноструктурным критериям. Координаты моделей депонированы в банк белковых структур (PDB ID 5I6S и PDB ID 5L9C).

На основании полученной структуры были спланированы точечные аминокислотные замены: W183A, D213A, S215A, направленные на снижение ингибирования работы фермента продуктом реакции. Также было

спланировано введение цистеиновых мостиков, S12C-A217C, S127C-A165C, Y171C-L201C, направленных на увеличение термостабильности. Методом ПЦР с использованием геномной ДНК P. verruculosum в качестве матрицы был амплифицирован ген целевого фермента ЭГ2, содержащий необходимые мутации. Эти фрагменты далее были клонированы в шаттл-вектор, разработанный в Институте биохимии им. А.Н. Баха ранее. Далее полученные плазмиды были трансформированы в компетентные клетки E. coli для наработки ДНК.

На следующем этапе была проведена трансформация лабораторного штамма-реципиента P. canescens, что позволило получить рекомбинантные штаммы, продуценты мутантных форм ЭГ2. Мутантные формы фермента были выделены, и проанализированы их физико-химические свойства, такие как каталитическая активность и термостабильность.

1) Решена структура эндоглюканазы 2 из P. verruculosum в изолированном состоянии (PDB ID 5I6S) и в комплексе с целлобиозой (PDB ID 5L9C) методом рентгеноструктурного анализа; 2) С помощью сайт-направленного мутагенеза на основе гриба P. canescens получены рекомбинантные штаммы-продуценты мутантных форм эндоглюканазы 2 (мутации W183A, D213A, S215A, направленные на повышение активности, мутации S12C-A217C, S127C-A165C, Y171C-L201C - на увеличение термостабильности фермента); 3) Проведено культивирование новых продуцентов в ферментёрах с рабочим объёмом 1 л с целью наработки ферментных препаратов, содержащих мутантные формы эндоглюканазы 2; 4) Методом хроматографии выделены гомогенные мутантные формы эндоглюканазы 2 и исследованы их физико-химические свойства.

Литература.
1. Ravindran V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities // J. Appl. Poult. Res. 2013. V. 22. № 3. P. 628. 2. Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю. и др. Получение биокатализаторов на основе рекомбинантных штаммов-продуцентов гетерологичной ксиланазы в грибе Penicillium verruculosum. Применение их в гидролизе отходов лесной и деревообрабатывающей промышленностей // Катализ в промышленности. — 2010. — № 5. — С. 64. 3. Яровенко В.Л., Калунянц К.А., Голгер Л.И. Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий // Пищевая промышленность. — 1969. — С. 26.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН и Российского научного фонда (№ 16-14-00163).

THE IMPROVEMENT OF THE PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF THE ENDOGLUCANASE 2 FROM FILAMENTOUS FUNGUS PENICILLIUM VERRUCULOSUM BY SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

A.Vakhrusheva[1], V.Nemashkalov [2], T.Bubnova[2], A.Rozhkova[3], I.Zorov[3], A.Sinitsyn[3], A.Gabdulkhakov[4]

[1]*Lomonosov Moscow State University, Russia, 142290, Pushchino, G, 21*
[2]*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Russia, 142290, 4The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Russia Moscow, Chernjakhovskogo, 6*
[3]*The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Russia, 119296, Moscow, Leninskii prospekt, 64*
[4]*The Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Russia Moscow, Dovjenko, 6*
[7]*Institute of Protein Research RAS, Russia, 142290, Pushchono, D, 22*

The spatial structure of isolated endoglucanase 2 (PDB ID 5I6S) from Penicillium verruculosum and its complex with cellobiose (PDB ID 5L9C) were determined by X-ray analysis. Based on the obtained data, point mutations affected on the physical and chemical properties of the enzyme were planned.

Key words: endoglucanase 2; site-directed mutagenesis; Penicillium verruculosum; feed enzyme preparations; feed; livestock.

Currently the use of enzyme preparations as a feed additive is a key point for effective animal husbandry [1], primarily swine and poultry. The basis of livestock feed are cereals (oats, rye, wheat, barley and etc.), the cell wall of which contains the hard cleavable non-starch polysaccharides (NSP) [2]. NSPs have so called anti-nutritional properties that reduce the rate of food passage through the digestive tract, its digestibility and efficiency of nutrient absorption. The enzymes addition in livestock feed will reduce its viscosity and increase digestibility, as the result it will accelerate the younger generation growth and improve the physiological state of animals [3].

The key enzymes used as a feed additive for cleavage of soluble NPSs are β-glucanases, which include endo-1,4-β-glucanase (EG2). Thus, the aim of this work is to improve the physical and chemical properties of the fungal endoglucanases 2 of the producer of industrial enzymes - Penicillium verruculosum.

The isolated structure of EG2 and its complex with cellobiose were solved by X-ray analysis. First, the enzyme was isolated from P. verruculosum and crystallized by vapor diffusion in hanging drop. The structures were determined by molecular replacement and refined to Rcryst = 21.8% and Rfree = 25.9% with a resolution of 2.1 Å. The resulting models satisfy all stereochemical and X-ray criteria. Coordinates of models were deposited to the Protein Structure Bank (PSB ID 5I6S and PDB ID 5L9C).

Based on this structure, amino acid substitutions W183A, D213A, S215A,aimed at reducing of theenzyme inhibition by the reaction product,have been planned. The introduction of cysteine bridges, S12C-A217C, S127C-A165C, Y171C-L201C, increasing the thermal stability, has been planned also. Containing the necessary mutations gene of the target enzyme EG2 was amplified by PCR method with the use of P. verruculosum genomic DNA as template. Further these fragments were cloned into a shuttle vector, designed by Bach Institute of Biochemistry RAS earlier. Then the formed plasmids were transformed into competent cells of E. coli for DNA development.

In the next step the transformation of the laboratory strain-recipient P. canescens was held, that allowed to obtain recombinant strains, the mutant producers of EG2. Mutant forms of the enzyme were isolated, their physical and chemical properties such as catalytic activity and thermostability were analyzed.

1) The isolated structure of endoglucanase 2 from P. verruculosum and its complex with cellobiose were solved by X-ray analysis (PDB ID 5I6S and PDB ID 5L9C, respectively); 2) The recombinant strains-producers of mutant forms of endoglucanase 2 (mutations W183A, D213A, S215A, increasing the activity and mutations S12C-A217C, S127C-A165C, Y171C-L201C, increasing the thermal stability of the enzyme) were obtained by the site-directed mutagenesis on the basis of the fungus P. canescens; 3) Cultivating of the new producers for accumulation of enzyme preparations, containing mutant forms of endoglucanase 2, was conducted in the fermenters with a one liter working volume; 4) Homogeneous endoglucanase 2 mutant forms were isolated by chromatography and their physicochemical properties were investigated.

References:
1. Ravindran V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities // J. Appl. Poult. Res. 2013. V. 22. № 3. P. 628. 2. Osipov D.O., Rozhkova A.M., Matys V.Y., et al. Production of biocatalysts on the basis of recombinant strains of heterologous xylanase in the fungus Penicillium verruculosum. Their use in the timber and woodworking industries waste hydrolysis // Catalysis in industry. - 2010. - № 5. - P. 64. 3. Yarovenko V.L., Kalunyants K.A., Golger L.I. Production of enzyme preparations from fungi and bacteria // Food Industry. - 1969. - P. 26.

Grant: This work was supported by the Program «Molecular and Cell Biology» of the Presidium of Russian Academy of Sciences and the Russian Science Foundation (№ 16-14-00163).

.....

УДК: УДК 606, ББК:

ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЦИТОХРОМА С В МАКЕТЕ БИОТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА

С.В.Возчикова, С.В.Алферов

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Россия, 300012, Тула, Пр-кт Ленина, 92, vosofya@gmail.com, 25-70-95, 25-70-96

Проведена совместная иммобилизация мембранной фракции бактерий Gluconobacter oxydans и цитохрома С на поверхности графитового электрода. Сравнительная оценка работы разных электродов показала, что использование цитохрома С способствует увеличению величины генерируемого потенциала.

Ключевые слова: Биотопливный элемент, цитохром С, мембранная фракция Gluconobacter oxydans

Биотопливный элемент (БТЭ) – это биотехнологическое устройство, в основе которого лежат биоэлектрохимические системы, включающие микроорганизмы, способные перерабатывать энергию химических связей в электрическую. Одной из главных задач, при разработке БТЭ, является обеспечение электрохимической связи между биокатализатором и электродом. В качестве эффективного биокатализатора нашла применение мембранная фракция (МФ) бактерий Gluconobacteroxydans, однако этот тип биокатализатора требует использования искусственных переносчиков электронов. Цитохром С (Цит С) представляет собой небольшой редокс-белок, который принимает участие в биологическом переносе электронов. Цитохром С является одноэлектронным переносчиком. Он способен окисляться и восстанавливаться, но не связывает при этом кислород. Поэтому использование цитохрома С в качестве возможного переносчика электронов в модели БТЭ является актуальной задачей.

Таким образом целью данной работы являлась оценка возможности использования цитохрома С в качестве переносчика электронов в макете БТЭ на основе иммобилизованной мембранной фракции.

Для осуществления поставленной цели производили совместную иммобилизацию биокатализатора – мембранной фракции бактерий G.oxydans, и цитохрома С на поверхность графитового электрода. Затем проводили оценку работы БТЭ по величине генерируемой разности потенциалов в режиме замкнутой внешней цепи (внешнее сопротивление – 10 кОм). Полученный вид зависимости генерируемого потенциала от времени представлен на рисунке.

Рисунок. Зависимость генерированного потенциала от времени в макете БТЭ.

На представленной зависимости видно, что время генерации потенциала в макете уменьшается в 2 раза при иммобилизации на электрод цитохрома С, что свидетельствует об участии цитохрома в переносе электронов.

Для изучаемых макетов БТЭ на основе мембранной фракции были рассчитаны энергетические параметры элемента.

Таблица.

Сравнительная оценка мощностных характеристик для макета БТЭ с применением различных биокатализаторов.

Тип Биокатализатор	Генерируемый потенциал, мВ	Внутреннее сопротивление, кОм	Мощность ,мкВт
МФ	300±10	9	9,0±0,2
МФ + ЦитС [4,2 мкМ]	320±10	11	10,2±0,4
МФ + ЦитС [16,7 мкМ]	340±10	8	11,6±0,5

В ходе работы было установлено, что при совместной иммобилизации цитохрома С и мембранной фракции генерируемый потенциал увеличивается на 13%, мощность на 29%, а время генерации потенциала уменьшается в 2 раза. Предположительно, такое незначительное влияние обусловлено необходимостью разработки более подходящего метода иммобилизация, а так же проведению оптимизации выделения мембранной фракции бактерий G.oxydans с целью получения более эффективного биокатализатора

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ мол_нр_16-38-50218

ASSESSMENT OF USE OF CYTOCHROME C AS A MEDIATOR OF ELECTRON TRANSPORT IN THE LAYOUT BIOFUEL CELLS

S.Vozchikova, S.Alferov

Tula State University, Russia, 300012, Tula, Lenin Prospect , 92

Co-immobilization of the membrane fraction of bacteria Gluconobacter oxydans and cytochrome C have been made on the surface of graphite electrode. Comparative evaluation of the different electrodes showed that the use of cytochrome C helps to increase the generated potential.

Key words: Biofuel cells, cytochrome C, the membrane fraction of Gluconobacter oxydans

Biofuel cell (BFC) - a biotechnological device, which is based on bioelectrochemical systems, including microorganisms that can convert chemical energy into electricity. One of the main tasks in the development of the BFC is to provide an electrochemical communication between the biocatalyst and the electrode. It has been shoved that membrane fractions (MF) of bacteria Gluconobacter oxydans could be applied as effective biocatalyst, however this type of biocatalyst requires the use of artificial electron mediators. Cytochrome C (Cyt C) is a small redox protein that is involved in biological electron transfer. Cytochrome C is a one-electron shuttle. It is able to oxidize and recover, but does not bind with oxygen. Therefore, the use of cytochrome C as a possible electron shuttle in a BFC model is an urgent task.

Thus the aim of this work was to evaluate the possibility of using cytochrome C as an electron carrier in the BFC based on immobilized membrane fractions.

To implement the goal produced a co-immobilization of the biocatalyst - membrane fraction G.oxydans bacteria, and cytochrome C on the surface of a graphite electrode. Then the assessment of the generated potential in a closed external circuit mode (external resistance - 10kOhm) was carried out. The resulting dependence of the generated potential in time represented in the figure.

Figure. Generated potential in the BFC model.

It was determined that maximum generated potential time decreased twice when cytochrome C was used. For the studied BFC based on the membrane fraction were calculated energy parameters element.

Table. Comparative evaluation of power characteristics for BFC layout with various biocatalysts.

Тип Биокатализатор	Генерируемый потенциал, мВ	Внутреннее сопротивление, кОм	Мощность ,мкВт
МФ	300±10	9	9,0±0,2
МФ + ЦитС [4,2 мкМ]	320±10	11	10,2±0,4
МФ + ЦитС [16,7 мкМ]	340±10	8	11,6±0,5

It has been found that the co-immobilization of cytochrome C and the membrane fraction leads to increase in generated potential by 13% and a maximum power of 29%. Probably, such a slight effect is due to the need to develop more suitable immobilization method, as well as carrying out optimization of membrane fraction separation to provide more efficient biocatalyst.

Grant: This work was supported by RFBR grant № 16-38-50218

УДК: 54.057, ББК: 24.4

ТЕРМИЧЕСКАЯ КАРБОНИЗАЦИЯ УГЛЕВОДОВ В ЗАКРЫТОЙ СИСТЕМЕ НА ПРИМЕРЕ ЯДЕР КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ

А.М.Вострикова, О.А.Майорова, А.Н.Николаева, И.Ю.Горячева, Г.Б.Сухоруков

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83, vostrikova2401@bk.ru, 89297734650

В работе исследовали влияние закрытой системы ядер CaCO3 с преципитированным раствором- декстран сульфат натрия или таниновой кислоты на формирование наночастиц углерода. Проводили гидротермальную обработку данной системы при 200 оС в течении 180 минут.

Ключевые слова: ядра кальций карбоната, закрытый синтез углеродных наночастиц, таниновая кислота, декстран сульфат натрия, термический синтез.

За последнее десятилетие люминесцентные наночастицы заняли особую нишу в различных областях науки, в том числе в различных видах биологических и химических исследований. Следует подчеркнуть, что стремительное проникновение люминесцентных наночастиц в самые разные области науки и техники обусловлено, в первую очередь, высоким квантовым выходом люминесценции, фото- и физической стабильностью. Одним из типов таких частиц являются углеродные наночастицы (УНЧ). Основным процессом синтеза УНЧ является карбонизации, в результате которой получается продукт, содержащий в основном углерод. Полученные частицы состоят из однородных сферических частиц нанометрового размера. Свойствами УНЧ можно варьировать путем изменений условий синтеза (тип и концентрация водного раствора углевода, температура гидротермальной обработки, время синтеза). Нами изучено получение УНЧ в порах микроразменых ядер карбоната кальция; источником углерода явились раствор декстран сульфата натрия и таниновой кислоты. Синтез проводили в закрытой системе, по реакции преципитации карбоната кальция и внутреннего раствора (декстран сульфата или таниновая кислота).

В результате получали сферические микрочастицы карбоната кальция. Характеризовали полученные УНЧ с помощью методов спектрофлуориметрии и сканирующей электронной микроскопии. УНЧ обладают испусканием в области длин волн 450 нм и размером не более 10 нм.

Литература.
Zhao Q. L., Zhang Z. L., Huang B. H., Peng J., Zhang M., Pang D. W. Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite // Chem. Commun. (Camb.). 2008. Vol. 41. P. 5116–5118. Zhu S., Meng Q., Wang L., Zhang J., Song Y., Jin H., Zhang K., Sun H., Wang H., Yang B. Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2013. Vol. 52. № 14. P. 3953–3957. Wang X., Qu K., Xu B., Ren J., Qu X. Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents // J. Mater. Chem. 2011. Vol. 21. № 8. P. 2445–2450. Qu S., Wang X., Lu Q., Liu X., Wang L. A biocompatible fluorescent ink based on water-soluble luminescent carbon

nanodots // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012. Vol. 51. № 49. P. 12215–12218. Zhang X., Zhang Y., Wang Y., Kalytchuk S., Kershaw S. V., Wang Y., Wang P., Zhang T.,1 Zhao Y., Zhang H., Cui T., Wang Y., Zhao J., Yu W. W., Rogach A. L. Color-switchable electroluminescence of carbon dot light-emitting diodes // ACS Nano. 2013. Vol. 7. № 12. P. 11234–11241. Sun C., Zhang Y., Wang Y., Liu W., Kalytchuk S., Kershaw S. V., Zhang T., Zhang X., Zhao J., Yu W. W., Rogach A. L. High color rendering index white light emitting diodes fabricated from a combination of carbon dots and zinc copper indium sulfide quantum dots // Appl. Phys. Lett. 2014. Vol. 104. № 26. P. 261106. Luo P. G., Sahu S., Yang S.-T., Sonkar S. K., Wang J., Wang H., LeCroy G. E., Cao L., Sun Y.-P. Carbon "quantum" dots for optical bioimaging // J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med. 2013. Vol. 1. № 16. P. 2116–2127. Hola K., Zhang Y., Wang Y., Giannelis E. P., Zboril R., Rogach A. L. Carbon dots—emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics // Nano Today. 2014. Vol. 9. № 5. P. 590–603. Yu S.-H., Cui X., Li L., Li K., Yu B., Antonietti M., Cölfen H. From starch to metal/carbon hybrid nanostructures: Hydrothermal metal-catalyzed carbonization // Advanced Materials. 2004. Vol.16. № 18. P.1636-1640. Zheng M., Cao J., Chang X., Wang J., Liu J., Ma X. Preparation of oxide hollow spheres by colloidal carbon spheres // Mater. Lett. 2006. Vol. 60. P.2991–2993.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке РНФ (проект 16-13-10195).

THERMAL CARBONISATION CARBOHYDRATES IN A CLOSED SYSTEM FOR EXAMPLE CORES OF CALCIUM CARBONATE

A.Vostrikova, O.Mayorova, A.Nikolaeva, I.Gorycheva, G.Sukhorukov

Saratov State National Research University, Russia, 410012, Saratov, Astrakhanskaya, 83

In this work investigated the effect a closed system with CaCO3 cores precipitated solution - dextran sodium sulfate or tannic acid on the formation of carbon nanoparticles. Hydrothermal treatment is carried out of the system at 200°C during 180 minutes.

Key words: core calcium carbonate, closed synthesis of carbon nanoparticles, tannic acid, dextran sulfate sodium, thermal synthesis.

Over the past decade luminescent nanoparticles have occupied a special place in the different fields of science, including various types of biological and chemical research. It should be emphasized that the rapid penetration of fluorescent nanoparticles in a variety of science and technology is due, primarily, a high quantum yield of luminescence, photo and physical stability. Enabling use as material for use in a biological imaging and LED.One of these labels are carbon nanoparticles (CNP). The basic process is the synthesis of CNP carbonization, resulting in a product containing photoluminescence carbogenic dots. The resulting particles composed of homogeneous spherical particles of nanometer size. CNP properties can be varied by changes in the synthesis conditions (type and concentration of the aqueous carbohydrate solution, the hydrothermal treatment temperature, the time of synthesis).

As a result, spherical microparticles of calcium carbonate. We characterize the resultant CNP using spectrofluorimetry methods and scanning electron microscopy. CNP have emission at wavelengths 450 nm and not larger than 10 nm.

References:

Zhao Q. L., Zhang Z. L., Huang B. H., Peng J., Zhang M., Pang D. W. Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite // Chem. Commun. (Camb.). 2008. Vol. 41. P. 5116–5118. Zhu S., Meng Q., Wang L., Zhang J., Song Y., Jin H., Zhang K., Sun H., Wang H., Yang B. Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2013. Vol. 52. № 14. P. 3953–3957. Wang X., Qu K., Xu B., Ren J., Qu X. Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents // J. Mater. Chem. 2011. Vol. 21. № 8. P. 2445– 2450. Qu S., Wang X., Lu Q., Liu X., Wang L. A biocompatible fluorescent ink based on water-soluble luminescent carbon nanodots // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012. Vol. 51. № 49. P. 12215–12218. Zhang X., Zhang Y., Wang Y., Kalytchuk S., Kershaw S. V., Wang Y., Wang P., Zhang T.,1 Zhao Y., Zhang H., Cui T., Wang Y., Zhao J., Yu W. W., Rogach A. L. Color-switchable electroluminescence of carbon dot light-emitting diodes // ACS Nano. 2013. Vol. 7. № 12. P. 11234–11241. Sun C., Zhang Y., Wang Y., Liu W., Kalytchuk S., Kershaw S. V., Zhang T., Zhang X., Zhao J., Yu W. W., Rogach A. L. High color rendering index white light emitting diodes fabricated from a combination of carbon dots and zinc copper indium sulfide quantum dots // Appl. Phys. Lett. 2014. Vol. 104. № 26. P. 261106. Luo P. G., Sahu S., Yang S.-T., Sonkar S. K., Wang J., Wang H., LeCroy G. E., Cao L., Sun Y.-P. Carbon "quantum" dots for optical bioimaging // J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med. 2013. Vol. 1. № 16. P. 2116–2127. Hola K., Zhang Y., Wang Y., Giannelis E. P., Zboril R., Rogach A. L. Carbon dots—emerging light emitters for bioimaging, cancer therapy and optoelectronics // Nano Today. 2014. Vol. 9. № 5. P. 590–603. Yu S.-H., Cui X., Li L., Li K., Yu B., Antonietti M., Cölfen H. From starch to metal/carbon hybrid nanostructures: Hydrothermal metal-catalyzed carbonization // Advanced Materials. 2004. Vol.16. № 18.

P.1636-1640. Zheng M., Cao J., Chang X., Wang J., Liu J., Ma X. Preparation of oxide hollow spheres by colloidal carbon spheres // Mater. Lett. 2006. Vol. 60. P.2991–2993.

Grant: The work was supported by the project 16-13-10195.

УДК: 573.6.086.83, ББК:

БИОТЕХНОЛОГИЯ НОВЫХ ПИЩЕВЫХ И КОРМОВЫХ ИСТОЧНИКОВ ОРГАНИЧЕСКОГО СЕЛЕНА

Н.А.Галочкина, И.А.Глотова

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I 394087, Воронеж, Мичурина, 1, galochkina.na@mail.ru, 89204202066

Разработаны биотехнологические способы получения функциональных добавок для обогащения селеном пробиотических пищевых и кормовых продуктов. Основой добавок служат биомодифицированные коллагеновые белки с иммобилизованным селеном и биоактивированное зерно пшеницы

Ключевые слова: биотехнология, селен, пробиотические продукты, 4,4-ди[3(5-метилдипиразолил)]селенид (ДМДПС), селенсодержащая коллагеновая добавка (СКД), селенсодержащая злаковая добавка (СЗД)

Селен является эссенциальным микроэлементом, однако дефицит его в почве обусловливает целесообразность развития биотехнологических подходов к получению функциональных пищевых и кормовых добавок с биопротекторными свойствами для дозированного обогащения продуктов селеном.

Объектами исследования служили новые источники селена в виде выделенных из жилок и сухожилий из крупного рогатого скота коллагеновых белков, модифицированных 4,4-ди[3(5-метилпиразолил]селенидом (ДМДПС) и селенитом натрия, в виде пророщенного с ДМДПС и селенитом натрия зерна пшеницы сорта «Алая заря» селекции Воронежского ГАУ, а также обогащенные селеном пробиотические продукты и кормовые добавки.

Установлено, что для модификации селеном целесообразно использовать продукт биомодификации коллагена, полученный из соединительной ткани КРС путем последовательной пероксидно-щелочной и ферментативной обработки при выдержке в течение 2,5-3,0 ч при 36-38 0С с препаратом «коллагеназа» в количестве 0,02% к массе коллагена, при этом модификацию коллагена селеном проводят путем выдержки с ДМДПС в течение 2-4 ч [1]. Степень взаимодействия селеновых препаратов с коллагеном изменяется в ряду: Na2SeO3 (pH=5) > ДМДМС > Na2SeO3 (pH=10). Иммобилизация селеновых препаратов на коллагене вызывает увеличение содержания гидратной воды и практически не влияет на конформацию молекул белка. Внесение ДМДПС в дозировке 0,005% в воду при замачивании зерна пшеницы стимулирует биохимические процессы его проращивания, что подтверждается сокращением микрофенологических фаз на 2-4 часа по сравнению с традиционным способом. Установлено стимулирующее действие ДМДПС на накопление глутатиона. Максимальное содержание восстановленной формы глутатиона отмечено для образца пшеницы, пророщенной с ДМДПС – 8,53 мг%. Это на 22,6% больше чем в контрольном образце, и на 36,1% больше, чем в образце с селенитом натрия. Экстремальные значения показателя достигаются через 28 ч проращивания для контрольного образца, через 16-20 часов – для образцов с ДМДПС и Na2SeO3. Употребление 200 г пробиотических продуктов с селенсодержащими добавками позволяет обеспечить среднесуточную физиологическую потребность в селене от 11 до 28,8% для различных категорий потребителей, суммарное содержание антиоксидантов составляет для пробиотических продуктов с СКД 1,9 мг/100г; с СЗД - 2,1 мг/100 г. Содержание витамина С возрастает в 15 раз (0,43 г/200 г продукта), витамина Е в 1,5 раза (0,56 г/200 г продукта) для пробиотических продуктов с СЗД по сравнению со злаковой добавкой из пшеницы в состоянии покоя. Кормовые добавки с использованием СЗД и СКД в качестве ингредиентов рецептур апробированы в рационах поросят-отъемышей при переходе от молочного кормления к сухому. Установлено, что их применение увеличивает абсолютный прирост на 3,9 (±0,40) кг, или 17%, и 4,4 (±0,40) кг, или 19,2%, и прибыль - на 413,7 и 623,9 руб. за голову соответственно.

Литература.

1. Глотова И.А., Галочкина Н.А. // Способ получения полифункциональной добавки для обогащения селеном пищевых продуктов// Патент России № 2542123. 2015. Бюл. № 3

Финансирование: Работа поддержана Фондом развития малых форм предприятия в научно-технической сфере по программе «У.М.Н.И.К.» «Разработка биотехнологии обогащения селеном молокосодержащих продуктов» (гос. контракт № 748ГУ1/2013 вн. № 0000289 от 27.10.2013; № 5243ГУ2/2014 от 24.03.2015).

THE BIOTECHNOLOGY OF NEW FOOD AND FEED SOURCES OF ORGANIC SELENIUM

N.Galochkina, I.Glotova

Voronezh State Agrarian University 394087, Voronezh, Michurina, 1

Biotechnological methods of receipt of functional additives are developed for enrichment by selenium of probiotic food and feed products. The biomodified collagenic proteins with the immobilized selenium and the bioactivated grain of wheat are the basis of additives.

Key words: biotechnology, selenium, probiotic products, 4,4-di[3(5-methylpiperazine)]selenide (DNDPS), selenium-containing collagen additives (SKD), selenium-containing cereals additives (SZD)

Selenium is an essential trace element, however a deficiency in the soil in the majority of causes expediency to develop biotechnological approaches to receipt of functional nutritional and feed additives with bioprotecting properties for the dosed enrichment of products selenium.

The objects of study were new sources of selenium in the form collagen proteins selected from the veins and tendons of cattle, modified 4,4-di[3(5-methylpiperazine)]selenide (DNDPS) and selenit of sodium; in the form of germinated with DMDPS and selenit of sodium of grain of wheat of sort "Alaya Zarya" of selection of the of the Voronezh state agricultural University, and also the probiotic products and feed additives enriched with selenium.

It is established that for modification by a selenium it is expedient to use the product of biomodification collagen received from a connecting tissue of cattle by consecutive peroxide-alkaline and enzymatic hydrolysis at endurance during 2,5-3,0 h at 36-38 ºC with the drug «collagenase» in number of 0,02% to the mass of a collagen, with the collagen modification of the selenium is carried out by exposure with DMDPS during 2-4 h [1]. The degree of interaction between selenium preparations with a collagen changes among: Na2SeO3 (pH=5) > DMDMS > Na2SeO3 (pH =10). The immobilization of selenium preparations on a collagen causes an increase in the content of water and practically doesn't influence conformstion of molecules of protein. Introduction of DMDPS in water when soaking grain of wheat stimulates biochemical processes of germination in a dosage of 0,005% that is confirmed by reduction of microphenological phases for 2-4 hours in comparison with a traditional way. The stimulating action of DMDPS on glutathione accumulation is established. The maximum contents of restored glutathione is noted for a sample of wheat, germinated with DMDPS – 8,53 mg of%. It is 22,6% more than in a control sample, and is 36,1% more, than in a sample with sodium selenit. Extreme values of an indicator are reached after 28 h of germination for a control sample, after 16-20 hours – for samples with DMDPS and Na2SeO3. Consumption of 200 g of probiotic products with selenium-containing additives allows to provide the average daily physiological need for selenium from 11 to 28,8% for various categories of consumers, total content of antioxidants constitutes for pro-biotic products with SKD 1,9 mg / 100г; with SZD - 2,1 mg / 100. Content of vitamin C increases by 15 times (0,43 g / 200 of a product), vitamin E by 1,5 times (0,56 g / 200 of a product) for pro-biotic products with SZD in comparison with cereal additive from wheat at rest. Feed additives with use of SZD and SKD as ingredients of compoundings are approved in diets of pigs of milk sellers upon transition from dairy feeding to dry. It is established that their application increases a pure gain by 3,9 (±0,40) kg, or 17%, and 4,4 (±0,40) kg, or 19,2%, and profit - for 413,7 and 623,9 rubles for the head respectively.

References:

1. Glotova I. A., Galochkina N.A. // A method of obtaining multifunctional additives for selenium enrichment of food products// Patent of Russia № 2542123. 2015. Bull. No. 3.

Grant: Work is supported by Fund of development of small forms of the entity in the scientific and technical sphere according to the «U.M.N.I.K.» program «Development of biotechnology of enrichment by selenium of milk-containing products» (state. contract No. 748 ГУ 1/2013 вн. No. 0000289 of 27.10.2013; No. 5243 ГУ 2/2014 of 24.03.2015).

УДК 619:615.9

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОРЕЗЕРБИРУЕМЫХ ИМПЛАНТОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ

Галлямова С.Р., Валиуллин Л.Р., Лекишвили М.В., Никитин А.И.

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФЦТРБ-ВНИВИ), Казань, Россия 420075, Казань, Научный городок-2. e-mail: galliamova95@mail.ru

Аннотация: Работа направлена на сравнительное изучение токсикологической безопасности полученного высокоочищенного композитного материала, включающего деминерализованный костный имплант для замещения дефектов кости. Решение задачи осуществляется методами клеточных технологий: изучением жизнеспособности, пролиферативной активности, уровнем потребления кислорода клетками при воздействии в различных дозах высокоочищенным деминерализованным костным имплантом. **Ключевые слова**: сверхкритический флюид, очистка, трансплантология, пролиферация, клеточные технологии, деминерализованный костный имплант.

В настоящее время применение деминерализованных костных имплантов в мире для восстановления дефектов костной ткани и ускорения остеогенеза является общепризнанным фактом и одним из наиболее эффективных методов лечения многих заболеваний опорно-двигательного аппарата. Кроме того, компактность костной ткани в кортикальном слое с незначительным количеством перфораций, длительность резорбции, как костного импланта, а так же как наличие, а так и отсутствие биоактивных компонентов в имплантах значительно затягивают процессы его реваскуляризации и замещения собственной, полноценной костной тканью. Предполагается, что их стимулирующее действие опосредовано присутствием морфогенетических белков активно влияющих на каскад репаративных процессов в костной ткани на клеточном уровне, на митоз остеопрогениторных клеток и дифференцировку костных клеток. Эта способность усиливается в деминерализованных имплантатах. Разработанные и изученные очищенные деминерализованные костные импланты, явились эффективным материалом, который расширил возможности восстановительной хирургии (Меркулов В.Н. с соавт. 2000; Orti V. et. al., 2016) и нашли широкое применение в клинической практике и теоретической остеологии. Таким образом имеющиеся в настоящее время биорезорбируемые импланты имеют значительные недостатки, что требует дальнейших исследований по их устранению. В тоже время в России такие аналоги практически отсутствуют.

Целью настоящих исследований является проведение сравнительное изучение цитотоксического эффекта и биологической доступности деминерализованного костного импланта и разработанного высокоочищенного деминерализованного костного импланта на перевиваемых культурах клеток (эукариотах).

Для изучения биологических свойств полученного высокоочищенного костного импланта использовали иммортализованную культуру клеток легкого эмбриона крупного рогатого скота (ЛЭК), предоставленную специализированной коллекцией перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных РККК (ВИЭВ, РФ). Клетки культивировали в среде DMEM в присутствии 10% фетальной телячьей сыворотки при 37ОС и 5% СО2. В опыте участвовало 10 групп: первая группа среда DMEM в присутствии 10% фетальной телячьей сыворотки; вторая группа служила контролем с добавлением клеток ЛЭК и без добавления костной ткани; третья группа с добавлением клеток ЛЭК получала 100мг/л костной ткани; четвертая, пятая, шестая, седьмая, восьмая, девятая и десятая группы получали дополнительно к клеткам ЛЭК по 300, 500, 700,1000, 1500, 1700 и 2000 мг/л костной ткани соответственно.

Влияние исследуемого высокоочищенного костного импланта на клетки изучали методом культивирования клеток в присутствии препарата. После 24 часов культивирования клеточный слой с помощью инвертированного микроскопа (Nikon Eclipse TS 100) оценивали по следующим параметрам: процент покрытия поверхности, форма клеток, количество клеточных агрегатов, количество плавающих клеток. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева. Количество живых и мертвых клеток оценивали методом окраски трипановым синим (0,1% раствор) (Nabatov A.A. & Raginov I.S. 2015). Влияние исследуемых препаратов на культуральные и морфологические свойства клеток определяли с учетом вычисления процента гибели клеток – отношение числа мертвых клеток к общему числу клеток после экспозиции с препаратом (Дьяконов Л.П. 2009), коэффициента жизнеспособности; индекса пролиферации; индекса цитотоксичности (Тертичная М.В. 2005). Биохимический анализ проводили на автоматическом анализаторе Chem Well.

По результатам проведенных исследований видно, что высокоочищенный костный имплант при воздействии на линии клеток в различных дозах не значительно влияет на гибель клеток по сравнению с воздействием не очищенного костного импланта. Таким образом, по результатам проведенных исследований (процент гибели клеток, коэффициент жизнеспособности, пролиферативная активность, индекс цитотоксичности, митотический индекс, уровень потребления клетками глюкозы и др.) можно сделать вывод, что высокоочищенный костный имплант обладает низкой токсичностью для клеток млекопитающих, что указывает на возможность использования данной продукции медицинской практике для восстановления дефектов костной ткани. Финансирование по Договору целевого финансирования № 15/145/2016 от 10.08.2016 г.

Литература.

1. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н.Миронов, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев, О.Л. Верстакова, М.В. Журавлева, В.К. Лепахин, Н.В. Коробов, В.А.

Меркулов, С.Н. Орехов, И.В. Сакаева, Д.Б. Утешев, А.Н. Яворский. – Гриф и К, Москва 2012. – ISBN 978-5 – 944 с. 2. Меркулов В.Н., Лекишвили М.В., Дорохин А.И. Использование поверхностно-деминерализованных имплантатов в лечении посттравматических ложных суставов у детей// Вестн. травматол. ортопед.– 2000.– №4.– С. 22-25. 3. Тертичная М.В. «Методика» по определению цитотоксичности медицинских металлических изделий, утвержденная директором ФГНУ ВНИВИ и генеральным директором ГУП ВНИПИМИ. 2002. – 25с. 4. Дьяконов Л.П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / под. Ред. проф. Дьяконова Л.П. – М.: Издательство «Спутник+», 2009. – 656 с. . 5. Nabatov A.A. & Raginov I.S. The DC-SIGN-CD56 interaction inhibits the anti-dendritic cell cytotoxicity of CD56 expressing cells. Infect Agent Cancer. 2015 Dec 10;10:49. doi: 10.1186/s13027-015-0043.

6. Orti V., Bousquet P., Tramini P. et. al. Benefits of mineralized bone cortical allograft for immediate implant placement in extraction sites: an in vivo study in dogs // J Periodontal Implant Sci. 2016 Oct;46(5):291-302. Epub 2016 Oct 18.

UDC 619: 615.9

THE STUDY OF THE CYTOTOXIC PROPERTIES OFBIORESORBABLE IMPLANTS FOR THE RESTORATION OF BONE DEFECTS

Gallyamova S.R., Valiullin L.R., Lekishvili M., Nikitin A.I.

Federal center for toxicological, radiation and biological safety Scientific town-2, Kazan, 420075
e-mail: galliamova95@mail.ru

Annotation: The work is aimed at studying the Toxicological safety of the obtained high-purity composite material comprising demineralized bone matrix for replacement of bone defects. The problem solution is performed by the methods of cell technologies: a study of the viability, proliferative activity, oxygen consumption by the cells when exposed to different doses of a highly demineralized bone matrix. **Key words:**supercritical fluid, purification, transplantation, proliferation, cellular technology, demineralized bone matrix Currently, the use of demineralized bone implants in the world for the restoration of bone defects and accelerate bone formation is a recognized fact and one of the most effective treatments for many diseases of the musculoskeletal system. Furthermore, in the cortical bone cortical layer with few perforations, the duration of resorption as bone implant, as well as the presence and absence and the bioactive components in implants significantly delaying processes its own revascularization and substitution, complete bone. It is assumed that their stimulatory effect is mediated by the presence of active morphogenetic proteins affecting stage of reparative processes in the bone tissue at the cellular level, cells osteoprogenitornyh mitosis and differentiation of bone cells. This ability is enhanced in demineralized implants.Developed and studied purified demineralized bone implants were effective material, which expanded the possibilities of reconstructive surgery (Merkulov VN et al 2000;Orti V. et al, 2016) and widely used in clinical practice and theoretical osteology. Thus, currently available bioresorbable implants have significant shortcomings that require further research to address them. At the same time, such analogs are practically absent in Russia.

he aim of this research is to conduct a comparative study of cytotoxic effect and bioavailability of demineralized bone implants and developed high-purity demineralized bone implant in the continuous cell cultures (eukaryotes). To study the biological properties of the resulting highly purified bone implant used immortalized culture of fetal lung bovine cells (LEC) provided by a specialized collection of continuous somatic cell cultures of agricultural and trade animals RKKK (VIEV, Russia). Cells were cultured in DMEM medium with 10% fetal calf serum at 37C and 5% CO2.The experiment involved 10 groups: the first group of DMEM medium in the presence of 10% fetal calf serum; the second group served as a control with the addition of LEK cells and without the addition of bone tissue; the third group with the addition of LEK cells received 100 mg / l of bone; fourth, fifth, sixth, seventh, eighth, ninth and tenth group received in addition to the cells of LEK 300, 500, 700.1000, 1500, 1700 and 2000 mg / l of bone tissue, respectively. Effect of highly purified bone implant test on the cell was studied by culturing the cells in the presence of the drug. After 24 hours of culturing the cell layer with an inverted microscope (Nikon Eclipse TS 100) were evaluated by the following parameters: the percentage of surface coverage, cell shape, number of cell units, the number of floating cells. Cell counts were performed in Goryaeva chamber. The number of live and dead cells was assessed by trypan blue staining (0.1% solution) (Nabatov & Raginov A.A. OS 2015). Influence on culture study drugs and morphological properties of the cells was determined based on calculating the percentage of cell death - the ratio of dead cells to total number of cells after exposure to drug (Diakonov 2009 LP) coefficient viability; proliferation index; Cytotoxicity index (Tertichnaya MV 2005). Biochemical analysis was performed on an automated analyzer Chem Well.

The results of the research shows that high purity bone implant upon exposure to cell lines at various doses

did not significantly affect the cell death, compared with no influence of purified bone implant.Thus, the results of studies (percent cell death viability ratio proliferative activity, cytotoxicity index, mitotic index, cell consumption of glucose and al.) It can be concluded that highly purified bone implant has a low toxicity for mammalian cells, indicating that the the use of the practice of medicine products to restore bone defects.

References:
1. Mironov, A.N. Guidelines for conducting pre-clinical trials of medicinal products / A.N. Mironov, N.D. Bunyatyan, A.N. Vasilyev, O.L. Verstakov, M.V. Zhuravlev, V.K. Lepahin, N.V. Korobov, V.A. Merkulov, S.N. Orekhov, I.V. Sakaeva, D.B. Uteshev, A.N. Jaworski. - Grief and K, Moscow 2012. - ISBN 978-5 - 944 p. 2. Merkulov V.N., Lekishvili M.V., Dorokhin A.I. The use of surface-demineralized implants in the treatment of posttraumatic pseudoarthrosis in children // Vestn. trauma. ortoped. – 2000. – №4. –P.22-25. 3. Tertichnaya M.V. «Method» to determine the cytotoxicity of medical metal products, approved by the Director of the Federal State VNIVI and CEO SUE VNIPI. 2002. - 25 p. 4. Deacons L.P. Animal cells in culture (Methods and Application in biotechnology) / a. Ed. prof. Dyakonova LP - M .: «Sputnik +» Publishing House, 2009. – 656p. 5. Nabatov A.A. & Raginov I.S. The DC-SIGN-CD56 interaction inhibits the anti-dendritic cell cytotoxicity of CD56 expressing cells. Infect Agent Cancer. 2015 Dec 10;10:49. doi: 10.1186/s13027-015-0043. 6. Orti V., Bousquet P., Tramini P. et. al. Benefits of mineralized bone cortical allograft for immediate implant placement in extraction sites: an in vivo study in dogs // J Periodontal Implant Sci. 2016 Oct;46(5):291-302. Epub 2016 Oct 18.

УДК: 57.013, ББК:

СИНТЕЗ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ УГЛЕРОДНЫХ ТОЧЕК

А.А.Гвоздюк

НИ СГУ им. Н. Г. Чернышеского, Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83, alina.gvozdyuk@gmail.com, +79518861027

Полученные углеродные наночастицы (УНЧ) представляют собой относительно новый класс люминесцентных частиц. Одним из оптимальных способов синтеза данных структур является гидротермальный синтез. Нами найдены оптимальные условия получения углеродных наночастиц гидротермальным методом, показана необходимость разбавления получаемых растворов УНЧ из-за присутствия перепоглощения света.

Ключевые слова: углеродные точки, люминесцентные наночастицы, гидротермальный синтез, декстран сульфат натрия

Углеродные наночастицы- новое поколение «зеленых» люминесцентных наноматериалов, которые являются перспективными в качестве альтернативы люминесцентных полупроводниковых квантовых точек (КТ)1. Известно, что КТ включают токсичные тяжелые металлы, такие как кадмий, это может накладывать серьезные ограничения на применение данных систем. УНЧ имеют ряд преимуществ, так как в их основе могут быть различные органические вещества: глицерин, декстран сульфат, глюкоза, крахмал, сахароза, лимонная кислота и т.д. Потенциал биомедицинских применений УНЧ огромен, так как основным компонентом данных систем является нетоксичный углерод1. Существует множество способов синтеза УТ, таких как химическое окисление, лазерная абляция, пиролиз, электрохимический синтез и т.д.2 Подобные методы обычно включают сложные процессы организации синтеза, дорогостоящие исходные материалы и оборудование, тяжелые синтетические условия, что делает данные методы неудобными и не всегда доступными.

В нашей работе мы использовали один из наиболее удобных и простых методов синтеза УНЧ – гидротермальный синтез, который позволяет получать высоколюминесцентные наночастицы достаточно быстро и без использования опасных реагентов. Процесс синтеза происходит в водном растворе, что тоже является преимуществом данного метода.

В качестве источника углерода был выбран природный полимер – декстран сульфат натрия, он безвреден, его аналоги используются в медицине в качестве антитромботиков и для восполнения объема крови после кровопотерь.

Нами был исследован ряд температур для синтеза УНЧ (160-250˚С), в качестве оптимальной температуры синтеза была выбрана температура 220˚С, так как при таком температурном воздействии были получены УНЧ с максимальной интенсивностью люминесценции. УНЧ на основе декстран сульфата натрия имеют интенсивную люминесценцию в области от 400 до 550 нм и их максимум испускания зависит от длины волны возбуждения, что является их характерной особенностью.

Нами впервые были получены данные, ранее не описанные в литературе для углеродных наночастиц: разбавление растворов приводит не только к изменению интенсивности испускания (в нашем случае росту), но и к смещению спектров фотолюминесценции в коротковолновую область. Полученные эффекты объяснены перепоглощением, роль которого особенно высока из-за наличия большого количества неоднородных люминесцирующих центров.

УНЧ – интересные «новички» в мире наноматериалов, и они обладают значительными перспективами для применения в биомедицинских целях.

Финансирование: Работа выполена при поддержке Российского Научного Фонда (проект 16-13-10195).

SYNTHESIS OF HIGH LUMINESCENT CARBON DOTS

A.Gvozdyuk

Saratov State University named by N.G. Chernyshevsky, Russia, 410012, Saratov, Astrakhanskaya, 83

The obtained carbon dots (CD) are a relatively new class of high luminescent particles. One of the optimal synthesis methods for these structures is the hydrothermal synthesis. We have shown the optimal synthesis conditions of carbon nanoparticles using hydrothermal method and the necessity to dilute the resulting CD solution due to the presence of reabsorption effect was shown.

Key words: carbon dots, luminescent nanoparticles, hydrothermal synthesis, dextran sodium sulfate

Carbon nanoparticles (CDs) are a new generation of «green» luminescent nanomaterials, which are a prospective alternative to lumiscent semiconductor quantum dots (QDs)1. It is known that QDs consist of toxic heavy metals such as cadmium and this may impose serious limitations for application of these systems. CDs have many advantages, as they can be produced from various organic substances: glycerol, dextran sulfate, glucose, starch, sucrose, citric acid, etc. Potential of biomedical applications of CDs is huge, as the main component of these systems is non-toxic carbon1. There are variety of methods of the CDs synthesis , such as chemical oxidation, laser ablation, pyrolysis, electrochemical synthesis, etc2. Such methods generally involve complicated processes of synthesis organization, expensive raw materials and equipment, severe synthetic conditions, and that makes these methods difficult and not quite affordable.

In our work, we used one of the most convenient and simple methods of CDs synthesis – hydrothermal synthesis, which allows obtaining high luminescent nanoparticles fast and without hazardous reagents. The synthesis process takes place in an aqueous solution, which is also an advantage of this method.

As the carbon source, the natural polymer was selected – dextran sodium sulfate, it is harmless, its analogs are used in medicine as antithrombotic compounds and blood substitutes after hemorrhage.

We have examined a number of temperatures for the synthesis of CDs (160-250˚C) and as optimum 220˚C was established, since at this temperature the CDs with maximum luminescence intensity were obtained. CDs based on dextran sodium sulfate have intense luminescence in the range from 400 to 550 nm and their emission maximum depends on the excitation wavelength, which is their typical feature.

For the first time was obtained and has not been previously described in literature on CDs that solutions' dilution leads not only to a change in emission intensity (in this case it increases) but also to a shift in the photoluminescence spectra to shorter wavelengths. These effects are explained by reabsorption, the role of which is particularly high because of large number of heterogeneous luminescent centers.

CDs are interesting «newcomers» in the world of nanomaterials, and they have great prospects for use for biomedical applications.

References:
[1] Bhunia1 S. K., Saha A., Maity A.R., Ray S.C., Jana N.R. Carbon Nanoparticle-based Fluorescent Bioimaging Probes// Scientific reports. 2013. Vol. 3. № 1473. P. 1-2. [2] Baker N. S., Baker A. G. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. Angew. Chem. Int. Ed. 2010. Vol. 49, P. 6726 – 6728. [3] He X., Li H., Liu Y., Huang H., Kang Z., Lee S-T. Water-soluble carbon nanoparticles: Hydrothermal synthesis and excellent photoluminescence properties//Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2011. Vol. 87, P. 326– 332.

Grant: The work was supported by Russian Science foundation (project 16-13-10195).

УДК: 66-987:66-988:66-963, ББК:

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ ИЗ ВТОРИЧНОГО СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО СЫРЬЯ НА ОСНОВЕ ИННОВАЦИОННЫХ МЕТОДОВ

Н.В.Горбунова, А.В.Банникова

Саратовский ГАУ им. Н.И.Вавилова, Россия , 410005, Саратов, ул. Б. Садовая , 220, gelladriel@gmail.com, 89042437370

Представлено исследование по влиянию ультразвукового воздействия на экстракцию ценных пищевых веществ из свекольной ботвы. Показано, что благодаря этому методу ускоряется процесс экстракции, а также происходит более полное извлечение веществ обладающих антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: антиокиданты, ультразвуковое воздействие, бетанин, антоциаоны.

Развитие промышленности и сельского хозяйства в различных регионах нашей страны сопровождается образованием в больших объемах различных отходов сельскохозяйственного производства. В то же время многие виды нетоксичных отходов, имеющие в своей основе природное происхождение, могут использоваться как сырье для производства ценных профилактических витаминных премиксов для питания населения.

Свекольная ботва была известна с древних времен и использовалась лекарями древности как профилактическое средство от многих болезней. Она содержит в себе такие ценные вещества как аскорбиновую, фолиевую кислоты, так и комплекс веществ, обладающих яркими антиоксидантными свойствами (бетанины)[1]. Для получения ценных веществ из различного сельскохозяйственного сырья Широко применяются методы с максимальной динамизацией всех видов диффузии в процессе экстракции: вихревая экстракция, акустическая экстракция и др. Однако недостатки традиционных технологий экстракции, включают угрозу общей безопасности, высокие затраты на энергию, низкое качество продукции, опасность для окружающей среды и токсикологический эффект. В этой связи совершенствование методов выделения биологически активных веществ, а именно антиоксидантов, актуально.

Использование ультразвуковой кавитации для извлечения эссенциальных компонентов из растительных продуктов является новой производственной технологией, которая не только может применяться без какого-либо риска и быть экологически безопасной, при этом эффективной и экономичной. Ультразвуковой способ экстрагирования позволяет значительно сократить длительность процесса и обеспечить более полное извлечение веществ. Целью данной работы стало изучение влияния традиционного и ультразвукового методов на полноту экстракции комплекса антиоксидантов из продуктов комплексной переработки сельскохозяйственного сырья [2]. Для обобщенного количественного определения антиоксидантов и фенольных соединений был использован спектрофотометрический метод. В зависимости от способа подготовки исходного сырья к экстракции, навеску мелко измельченной ботвы свеклы (0,50 г) обрабатывали 2%-ным раствором муравьиной кислоты, 70% этиловым спиртом, дистиллированной водой, гидроксидом натрия pH = 10. Экстрагировали центрифугированием при 40 000 об/мин. – 60 мин, выпаривали под вакуумом при 40 °С. Также образцы подвергли ультразвуковому воздействию при 35 кГц, 450 Вт.

На основании полученных данных выявлена прямая зависимость как от вида экстрагента, так и от самого способа получения экстракта. Наиболее полное извлечение было отмечено у образцов, экстрагируемых с использованием растворов этилового спирта и щелочи. Следует отметить, что ультразвуковое воздействие позволяет повысить уровень экстракции на 20 - 45% в зависимости от используемого раствора. Полученные данные дают основание предполагать, что наилучшей раствор экстрагента является этиловый спирт, а способ ультразвуковой экстракции позволит обеспечить наиболее полное извлечения комплекса антиоксидантов из свекольной ботвы.

Исследования в данной области имеют большой научно – практический интерес, связанный с созданием пищевой добавки функционального назначения, которая позволит улучшить как пищевые, так и органолептические, технологические свойства продуктов. Тем самым разработанные технологии, содержащие подобную добавку, смогут относиться к технологиям здорового питания и значительно снизить показатели заболеваемости населения, связанные с неправильным питанием.

Литература.
1. Булдаков А.С. Пищевые добавки. Справочник 2-е издание переработанное и дополненное - М.:Дели принт,2003.-80 с. 2. Технология натуральных эфирных масел и синтетических душистых веществ. / И. И. Сидоров [и др.]. - М.: Легкая и пищевая пром-сть, 2001. - 368 с.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR ANTIOXIDANTS FROM RECYCLED AGRICULTURAL PRODUCTS BASED ON INNOVATIVE METHODS

N.Gorbunova, A.Bannikova

Saratov State Agrarian University. Saratov, Russia, Russia, 410005, Saratov, Bolshaya Sadovaya, 220

Presented study on the effect of ultrasonic treatment on the extraction of nutrients from beet tops. It has been shown that by this method accelerates the extraction process and also is more complete extraction of substances with antioxidant properties.

Key words: antiokidanty, sonication, betanin, antotsiaony.

The development of industry and agriculture in different regions of our country is accompanied by the formation of large quantities of various agricultural waste. At the same time, many types of non-toxic waste, having at its core a natural origin, can be used as raw material for the production of prophylactic vitamin premixes for the nutrition of the population.

Beet tops has been known since ancient times and was used by ancient healers as a prophylactic against many diseases. It contains such valuable substances such as ascorbic acid, folic acid, and complex substances with antioxidant properties bright (betanin) [1]. For obtaining valuable substances from various agricultural raw materials widely used methods maximum dynamization all types of diffusion in the extraction process: a vortex extraction, acoustic extraction etc. However, the disadvantages of conventional extraction techniques include a threat to the overall security and high energy costs, poor product quality, danger. environmental and toxicological effects. In this context, the improvement of methods for the isolation of biologically active substances, namely antioxidants, actually.

The use of ultrasonic cavitation for extraction of essential components of plant foods is a new production technology that not only can be used without any risk, and be environmentally friendly, with efficient and economical. Ultrasonic extraction method significantly reduces the processing time and provide a more complete extraction of substances. The aim of this work was to study the influence of traditional and ultrasonic methods to be complete extraction of the complex of antioxidants of the products of complex processing of agricultural products [2]. A spectrophotometric method was used to quantify generalized antioxidants and phenolic compounds. Depending on the method of preparation of the feedstock to extraction, weighed chopped finely beet topper (0.50 g) was treated with a 2% solution of formic acid, 70% ethanol, distilled water, sodium hydroxide, pH 10. Extracted with centrifugation at 40 000 rpm / min. - 60 min, evaporated in vacuo at 40°C. Samples were also subjected to ultrasonic treatment at 35 kHz and 450 Watts.

Based on the data obtained as the direct dependence on the type of extractant and the method of preparation of the extract. The most complete recovery was observed in samples extracted using solutions of ethyl alcohol and alkali. It should be noted that the ultrasonic treatment can increase the extraction rate of 20 - 45% depending on the solution used. These data suggest that the best solution is extracting ethanol and ultrasonic extraction method will provide the most complete set of extraction of antioxidants from beet tops.

Studies in this area have a great scientific - practical interest associated with the creation of a food additive functionality, which will improve both the nutritional and organoleptic and technological properties of the products. Thus developed technology containing such additive will refer to techniques of healthy eating and significantly reduce the morbidity of the population, associated with malnutrition.

References:
References: 1. Buldakov AS Nutritional supplements. Handbook 2nd edition revised and enlarged - M: Delhi print, 2003, 80 p. 2. The technology of natural essential oils and synthetic fragrances. / Ivan Sidorov [et al.]. - M .: Light and food prom-st, 2001. - 368 p.

.....

УДК: 576.54, ББК: 28.070

РАЗРАБОТКА ТРЁХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ СПИДРОИНОВ

С.С.Гурьева[1], И.А.Корниенко[2], К.В.Сидорук[3], Л.И.Давыдова[3], В.Г.Богуш[3], Е.В.Петерсен[4]

[1]Институт Регенеративной Медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Россия, 119048, Москва, Трубецкая, 8, svetlana_gureva@mail.ru, 89859276338

[2]Институт Регенеративной Медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Россия, 119048, Москва, Трубецкая, 8,
[3]ФГУП ГосНИИгенетика, Россия, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д., 1
[4]Институт Регенеративной Медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Россия, 119048, Москва, Трубецкая, 8

Проведены работы по исследованию структур пленочных и гидрогелевых матриксов на основе рекомбинантного спидроина и созданию трехмерных клеточных конструкций путем заселения различных типов матриксов клеточными культурами.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс; клеточная культура; клеточные конструкции; спидроин

В настоящий момент существует необходимость разработки тканеинженерных конструкций для тестирования лекарственных препаратов, моделирования патологических процессов, а также создания биоискусственных трансплантатов для восстановления тканей и органов пациентов [1]. Наиболее перспективными материалами для создания матриксов, имитирующих внеклеточный матрикс ткани, могут стать рекомбинантные спидроины, представляющие собой аналоги белков каркасной нити паутины. Из этих белков могут быть получены различные структуры – пленки, гидрогели, микрогели, микрокапсулы [2]. В данной работе были проведены исследования по созданию трехмерных клеточных конструкций путем заселения пленочных и гидрогелевых матриксов на основе рекомбинантного спидроина клеточными культурами.

В качестве субстратов для культивирования клеточных культур использовались чашки Петри, покрытые водным раствором белка спидроина 1F9 в концентрациях 0,7 мг/мл и 1 мг/мл, пленки, полученные методом электроспиннинга из раствора белка спидроина 1F9, и микрогель, полученный из 3% раствора гидрогеля белка спидроина 1F9. Структуры исследуемых матриксов наблюдались с помощью растрового электронного микроскопа FEI Quanta 200. На поверхности чашки Петри с пленочным покрытием наблюдался равномерный шероховатый белковый слой. Образцы, полученные методом электроспиннинга, имели сетчатое строение, толщина полученных волокон находилась в диапазоне от 0,5 мкм до 1 мкм, что делает данный вид матриксов пригодным для заселения клетками, способствует их адгезии и не препятствует диффузии питательных веществ. Образцы в виде микрогелей представляли собой гомогенные гранулы диаметром от 350 мкм до 450 мкм, имеющие шероховатую поверхность с порами.

Оценка влияния матриксов на адгезивные, пролиферативные и тканеспецифичные свойства клеточной культуры была проведена на первичной клеточной культуре кардиомиоцитов крыс. Клеточная культура кардиомиоцитов, культивируемая на пленочном покрытии на основе спидроина, обладала высоким уровнем пролиферации, высоким уровнем экспрессии тканеспецифичных маркеров (коннексин 43) и образовывала 3D клеточные структуры в сравнении с существующими субстратами для культивирования клеточных культур.

Были проведены исследования по созданию трехмерных клеточных конструкций путем заселения пленочных и гидрогелевых матриксов на основе спидроина различными типами клеток (мезенхимальные клетки и кардиомиоциты). Показано, что исследуемые типы матриксов обладают положительными адгезивными свойствами, обеспечивают пролиферацию клеточной культуры, в результате чего образуются физиологичные клеточные структуры.

Таким образом, было показано, что исследуемые матриксы являлись подходящими для заселения клеточными культурами, обладали положительными адгезивными свойствами, обеспечивали пролиферацию клеточной культуры. Клеточные культуры при культивировании на исследуемых матриксах сохраняли свои тканеспецифичные маркеры, образовывали 3D клеточные структуры. Разработанные трехмерные клеточные конструкции могут использоваться в различных сочетаниях внутри одной тканеинженерной клеточной конструкции, не препятствуя их росту и взаимной миграции.

Литература.
1. Laschke M.W., Menger M.D. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering // Trends Biotechnol. 2016.
2. Preda R.C. et al. Bioengineered Silk Proteins to Control Cell and Tissue Functions // Protein Nanotechnology. 2013. Vol. 996. P. 19–41.

DESIGN OF 3D CELLULAR CONSTRUCTS BASED ON RECOMBINANT SPIDROINS

S.Guryeva, I.Kornienko, K.Sidoruk, L.Davydova, V.Bogush, E.Petersen

[1]*Institute for Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University , Russia, 119048, Moscow, Trubetskaya, 8*

[2]Institute for Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University , Russia, 119048, Moscow, Trubetskaya, 8
[3]State Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Russia, 117545, Moscow, 1-st Dorozhniy pr., 1
[4]Institute for Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University , Russia, 119048, Moscow, Trubetskaya, 8

In this study, we investigated structures of films and hydrogels based on recombinant spidroin and designed 3D cellular constructs by seeding cells on these types of matrices.

Key words: extracellular matrix; cell culture; cellular construct; spidroin

At this moment, development of tissue-engineering constructs is needed for testing drugs, pathological processes modeling, and design of bioartificial transplants for tissue and organ regeneration [1]. Recombinant analogs of spidroins (dragline silk proteins of spider web) have great potential in generation of artificial matrix, mimicking extracellular matrix. Silk solutions can be formulated into a variety of biomaterial formats, including films, fibers, hydrogels, microgels, microspheres, and others [2]. The objective of this research is the design of 3D cellular constructs by seeding cells on films and hydrogels based on recombinant spidroins.

We used three types of substrates for cell culturing: Petri dishes covered by aqueous spidroin 1F9 (recombinant spidroin 1) solution (1 mg/ml and 0.7 mg/ml), films obtained by electrospinning, and spidroin based microgel. The structures of investigated substrates were observed by scanning electron microscope FEI Quanta 200. On the surface of Petri dish covered by aqueous spidroin solution the uniform rough protein layer was observed. Samples obtained by electrospinning have a mesh structure with fibers ranging from 0.5 to 1 μm in diameter which makes this type of matrix suitable for cell culturing, promotes the cell adhesion and does not prevent the diffusion of nutrients. Microgels consisted of homogeneous particles ranging from 350 to 450 μm in diameter with rough porous surface.

The influence of matrix on adhesion, proliferation and tissue-specific properties of cell culture was investigated on primary cell culture of rat cardiomyocytes. Cardiomyocytes cultured on spidroin films had the high proliferation rate and the high level of tissue-specific markers expression (connexin 43) and formed 3D cell structures unlike existing substrates for cell culture.

To design the 3D cellular constructs, different primary cell types (mesenchymal cells and cardiomyocytes) were cultured on films and hydrogels based on spidroin. The tested matrices exhibited positive adhesive properties, promoted cell proliferation, and maintained tissue-specific markers, resulting in physiological cell structure formation.

Taken together, the tested films and hydrogels based on spidroin were suitable for cell culturing, exhibited positive adhesive properties, and promoted cell proliferation. Primary cells cultured on tested matrices maintained tissue-specific markers and formed 3D cell structures. The developed 3D cellular constructs can be used in various combinations within the same tissue-engineering construct without prevention growth and migration.

References:
1. Laschke M.W., Menger M.D. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering // Trends Biotechnol. 2016.
2. Preda R.C. et al. Bioengineered Silk Proteins to Control Cell and Tissue Functions // Protein Nanotechnology. 2013. Vol. 996. P. 19–41.

УДК 577.214.622

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ ESCHERICHIA COLI – ПРОДУЦЕНТЫ L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Дербиков Д.Д., Новиков А.Д., Яненко А.С.

Государственный научный центр Российской Федерации ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, Россия, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1
e-mail: den_derb@mail.ru

Создан бесплазмидный штамм E. coli с высокой конститутивной аспартазной активностью. Сконструированы производные штамма E. coli с удаленными генами фумараз. Показано, что при использовании полученных штаммов в качестве биокатализаторов синтеза L-аспарагиновой кислоты наблюдается снижение в реакционной смеси содержания яблочной кислоты.

Ключевые слова: L-аспарагиновая кислота, биокатализ, аспартаза, фумараза.

L-аспарагиновая кислота является важной аминокислотой, находящей применение в различных областях промышленности [1]. Основным способом получения L-аспарагиновой кислоты в настоящее время является биокаталитический синтез из фумаровой кислоты и аммония с помощью фермента аспартазы. В этом процессе бактериальные клетки, имеющие аспартазную активность, иммобилизованы в геле для стабилизации активности фермента. Недостатком такой системы является наличие побочных продуктов: непреобразованной фумаровой кислоты и L-яблочной кислоты, которая образуется под воздействием фермента фумаразы [2]. Для преодоления этих недостатков, штамм для биосинтеза L-аспарагиновой кислоты должен иметь: 1) сильную конститутивную аспартазную активность; 2) низкий уровень побочной фумаразной активности.

В процессе работы был получен бесплазмидный штамм E. coli B-12466, имеющий в хромосоме ген аспартазы (aspA) под контролем сильного промотора pG25 [3]. Штамм обладает аспартазной активностью в 140 единиц, что в 5,5 раз выше по сравнению с активностью применяющегося в настоящее время в промышленности штамма E. coli B-11864 (Рисунок 1).

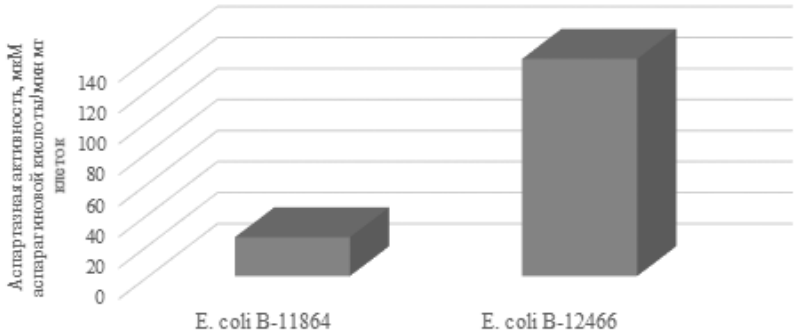


Рисунок 1. Удельная аспартазная активность полученного штамма E. coli B-12466 в сравнении с ближайшим аналогом.

Полученный штамм E. coli B-12466 обеспечивает сокращение времени синтеза L-аспарагиновой кислоты в 3-4 раза по сравнению с ближайшим аналогом за счет более высокой аспартазной активности биокатализатора.

В E. coli существуют 3 различных фумаразы, кодируемые генами fumA, fumB и fumC [3]. Нами было получено 5 штаммов E. coli с удаленными генами фумараз в различных сочетаниях [4]. Показано, что при использовании в качестве биокатализатора штамма с удаленными генами fumA и fumC выход аспарагиновой кислоты увеличивается на 20% (Рисунок 2). При этом также снижается содержание в смеси яблочной кислоты с 34 до 1,5 г/л.

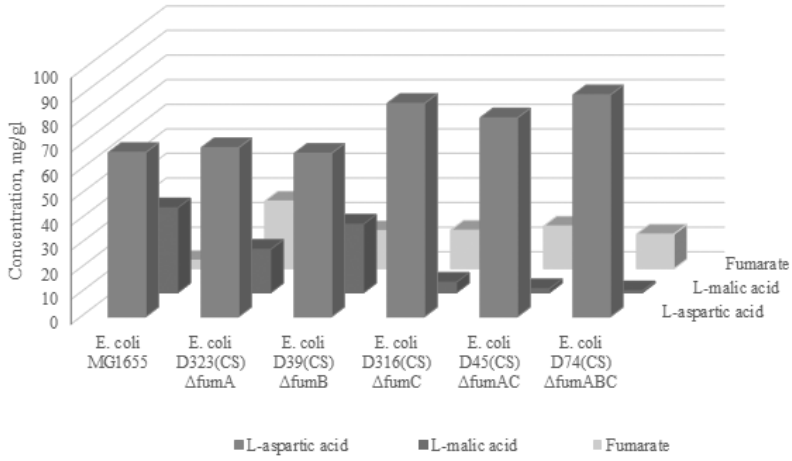


Рисунок 2. Состав реакционной смеси после трансформации фумарата аммония в аспарагиновую кислоту в присутствии различных биокатализаторов

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования полученных штаммов и могут быть использованы для создания новых, более эффективных биокатализаторов для синтеза L-аспарагиновой кислоты.

Литература.
1. Viola RE. L-Aspartase: New Tricks From An Old Enzyme // Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 2000;74:295-341.
2. Takahisa Tajima, Mai Hamada, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato. Efficient aspartic acid production by a psychrophile-based simple biocatalyst // J Ind Microbiol Biotechnol (2015) 42:1319–1324
3. Ching-Ping Tseng, Chin-Chu Yu, Hsiao-Hsien Lin, Chi-Yen Chang, Jong-Tar Kuo. Oxygen- and Growth Rate-Dependent Regulation of Escherichia coli Fumarase (FumA, FumB, and FumC) Activity // J Bacteriol. 2001 Jan;183(2):461-7.
4. Дербиков Д.Д., Новиков А.Д., Губанова Т.А., Тарутина М.Г., Гвилава И.Т, Бубнов Д.М., Яненко А.С. Синтез аспарагиновой кислоты с использованием в качестве биокатализаторов штаммов Escherichia coli с удаленными генами фумараз // Биотехнология, 2016, Т.32, №5, С.38-48.

UDC 577.214.622

RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI STRAINS PRODUCING HIGH LEVEL L-ASPARTIC ACID

Derbikov D.D., Novikov A.D., Yanenko A.S.

State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms
1-st Dorozhniy pr., 1, 117545 Moscow, Russia
e-mail: den_derb@mail.ru

E. coli strain with high constitutive aspartase activity has been constructed. Derivatives of the E. coli strain with deleted fumarases genes have been created. It was shown, that biocatalytic synthesis of L-aspartic acid with obtained strains leads to increase of aspartic acid synthesis and reduced amount of malic acid in reaction mixture.

Key words: L-aspartic acid, biocatalysis, aspartase, fumarase

L-aspartic acid is an important amino acid, which finds application in various industrial processes [1]. The basic method for producing L-aspartic acid is the biocatalytic synthesis from fumaric acid and ammonia using enzyme aspartase. In this process, bacteria cells possessing aspartase activity were immobilized in a gel matrix to stabilize the enzyme activity. The disadvantage of this system is that by-products are formed: unconverted fumaric acid and L-malic acid, which accumulates due to fumarase activity [2]. To overcome these disadvantages, strain for biosynthesis L-aspartic acid should have: 1) strong constitutive aspartase activity; 2) low level of fumarase activity.

In this work we created strain E. coli B-12466 , which have the gene aspartase (aspA) under strong promoter pG25 in the chromosome [3]. The strain has a 5.5 times higher aspartase activity compared with currently used industrial strain of E. coli B-11864 (Figure 1).

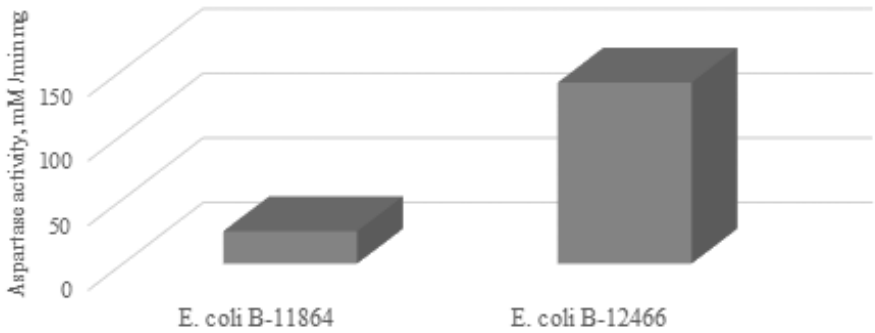


Figure 1. Specific aspartase activity E. coli B-12466 strain in comparison with the closest analog.

The resulting strain E. coli B-12466 provides a reduction in the time of synthesis of L-aspartic acid in 3-4 times in comparison with the closest analog due to the higher aspartase activity. In contrast to strain E. coli B-11864, we expected stability of high constitutive aspartic activity of strain E. coli B-12466 because the aspartase gene (aspA) is present in chromosome.

Escherichia coli contains three fumarases fumA, fumB and fumC genes [3]. We have constructed 5 E. coli strains with fumarase genes deletions in various combinations [4]. It was shown, that using strain E. coli with ΔfumA and ΔfumC yield L-aspartic acid increased by 20% (Figure 2). Also yield L-malic acid in the mixture reduced to 1,5-4 g/l.

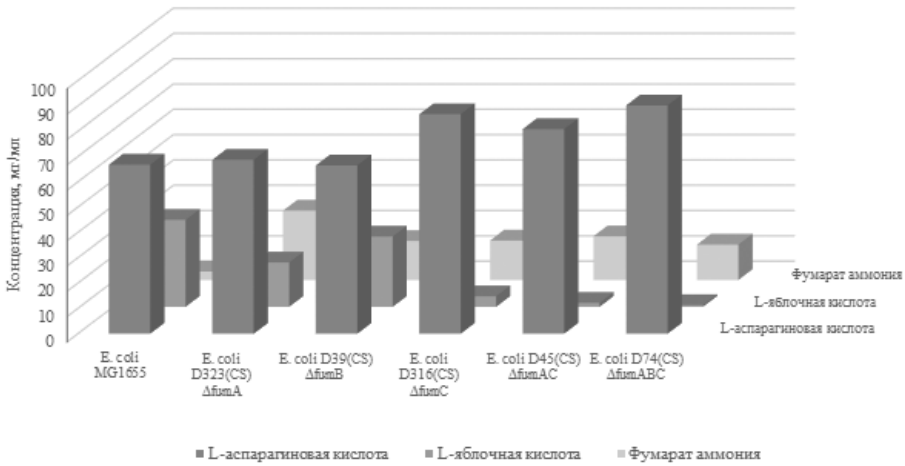


Figure 2. Composition of reaction mixture after ammonium fumarate transformation to aspartic acid in the presence of various biocatalysts.

The obtained results indicate that E. coli strains with high expression level of aspartase aspA and strains with deleted fumarase genes significantly improves the process for producing L-aspartic acid. Developed approaches to constructing of strains can be used to create new and more efficient biocatalysts for the synthesis of L-aspartic acid.

References:
1. Viola RE. L-Aspartase: New Tricks From An Old Enzyme // Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 2000;74:295-341.
2. Takahisa Tajima, Mai Hamada, Yutaka Nakashimada, Junichi Kato. Efficient aspartic acid production by a psychrophile based simple biocatalyst // J Ind Microbiol Biotechnol (2015) 42:1319–1324
3. Ching-Ping Tseng, Chin-Chu Yu, Hsiao-Hsien Lin, Chi-Yen Chang, Jong-Tar Kuo. Oxygen- and Growth Rate-Dependent Regulation of Escherichia coli Fumarase (FumA, FumB, and FumC) Activity // J Bacteriol. 2001 Jan;183(2):461-7.
4. Derbikov D.D., Novikov A.D., Gubanova T.A., Tarutina M.G., Gvilava I.T., Bubnov D.M., Yanenko A.S. Synthesis of Aspartic Acid using Escherichia coli Strains with Deleted Genes for Fumarases as Biocatalysts // Biotechnology, 2016, Vol.32, №5, 38-48

.....

УДК: 577.112.083+577.322.24+547.92+547.77, ББК:

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ВЫСОКОАФФИННЫХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ЛИГАНДОВ СТЕРОИД 7А-ГИДРОКСИЛАЗ ЧЕЛОВЕКА

Я.В.Диченко, Я.В.Фалетров

[1]Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Республика Беларусь, 220141, Минск, Академика В.Ф.Купревича, 5/2, yaroslavd@tut.by, +375293835201
[2]Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Республика Беларусь, 220030, Минск, Ленинградская , 14, fhp@bsu.by, +375172265141

Разработаны структуры новых флуоресцентных НБД-производных ДГЭА и прегненолона – потенциальных лигандов 7α-гидроксилаз человека. Показано, что сконструированные соединения, аналогично природным субстратам, способны с высокой аффинностью связываться в активном центре CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1, в результате чего могут образовываться продукты ферментативной реакции.

Ключевые слова: НБД-метка, стероид 7α-гидроксилаза, цитохром P450, ДГЭА, прегненолон.

В настоящее время методы исследования, основанные на использовании флуоресцентных лигандов, широко применяются в различных биохимических исследованиях. В частности, интерес представляют собой флуоресцентные лиганды цитохромов P450 (CYP) – суперсемейства ферментов, участвующих во множестве важнейших процессов в организме человека. Среди них стероид 7а-гидроксилазы (CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1) гидроксилируют стероидные гормоны и нейростероиды по 6 или 7 положению. Известно, что точечные аминокислотные замены в структуре CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1 приводят к возникновению различных тяжелых заболеваний, однако причины их возникновения на молекулярном уровне до настоящего времени детально не выяснены.

В качестве метки для дизайна новых флуоресцентных лигандов стероид 7а-гидроксилаз человека было предложено использовать 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазольную (НБД)-группу. Ретросинтетический анализ показал, что флуоресцирующие НБД-производные могут быть получены из кетостероидов с использованием стратегии восстановительного аминирования (ВА) через стадию получения аминостероидов. Именно поэтому базовыми структурами для синтеза новых лигандов были выбраны субстраты стероид 7?-гидроксилаз дегидроэпиандростерон (ДГЭА) и прегненолон (ПРЕГ), содержащие кето-группу в положениях 17- и 20-, соответственно. В качестве соединений для виртуального скрининга использовались НБД-производные стероидов, структуры которых приведены на рисунке 1.

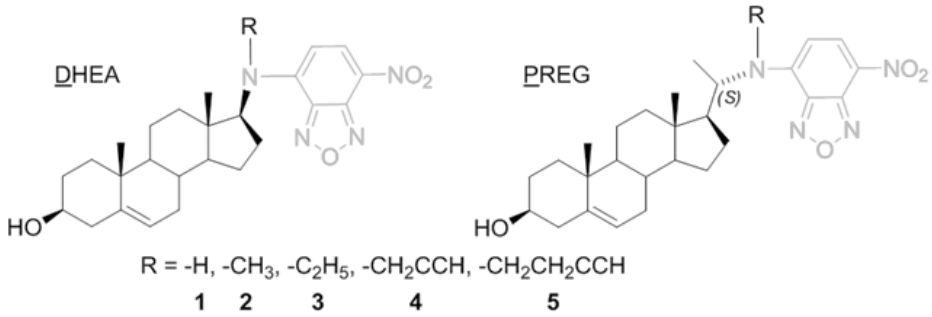


Рисунок 1. – Структуры исследуемых НБД-производных стероидов

Методом молекулярного докинга показано, что наибольшим сродством к исследуемым ферментам обладают флуоресцентные производные ДГЭА и ПРЕГ без заместителя в боковой цепи, либо с метильной или этильной группами. При этом аффинность данных соединений к исследуемым ферментам сравнима с результатами, полученными для модельных веществ (холестенон, ДГЭА и ПРЕГ) Установлено, что увеличение длины бокового заместителя приводит к резкому уменьшению сродства лигандов к соответствующим ферментам, что объясняется малым размером полости активного центра стероид 7а-гидроксилаз. Обнаружено, что во всех случаях положение молекулы лиганда в активном центре ферментов соответствует положению молекул известных субстратов стероид 7а-гидроксилаз человека (андростаны, прегнаны и холестаны). При этом плоскости стерана и гема практически параллельны, а расстояние от седьмого атома углерода до атома железа гема составляет порядка 5 А, что является оптимальным для гидроксилирования по этому положению, и свидетельствует о возможности образования продукта при реконструкции активности фермента.

Таким образом, разработаны новые флуоресцентные лиганды стероид 7α-гидроксилаз человека, которые могут быть использованы для установления влияния точечных мутаций на пространственную структуру и каталитические свойства данных ферментов.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (проект №Х16-085).

DEVELOPMENT OF NOVEL HIGH AFFINITY FLUORESCENT LIGANDS FOR HUMAN STEROID 7A-HYDROXYLASES

Y.Dzichenka[1], Y.Faletrov[2]

[1]*Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus, 220141, Minsk, academician V.F. Kuprevich, 5/2*
[2]*Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Republic of Belarus, 220030, Minsk, Leningradskaya, 14*

Structures of novel fluorescent NBD-derivatives of DHEA and pregnenolone – potential ligands of human sterol 7α-hydroxylases were designed. By molecular docking approach it was shown that designed compounds can bind in the active site of the enzymes with high affinity similarly to essential substrates of CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1.

Key words: NBD-label, sterol 7α-hydroxylase, cytochrome P450, DHEA, pregnenolone.

At present time different methods based on using of fluorescent ligands are widely used in biochemical research. Fluorescent ligands of cytochromes P450 (CYP) are of great interest. CYP is the superfamily of enzymes which take part in different important processes in human body. Sterol 7a-hydroxylases (CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1) is a small group of CYP which hydroxylate bile acids precursors, sterol hormones and neurosteroids at 6 or 7 position. It is well known that point mutations in CYP7A1, CYP7B1, and CYP39A1 are the main reasons of different serious diseases, but origin of their appearance on molecular level is still unknown.

In the present study 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD)-group was used for the construction of novel fluorescent ligands of human sterol 7a-hydroxylases. Retrosynthetic analysis showed that fluorescent NBD derivatives can be obtained from ketosterols by using of reductive alkylation strategy through the stage of aminosterols formation. For this reason dehydroepiandrosterone (DHEA) and pregnenolone (PREG) were used as base structures for synthesis as these compounds are substrates for sterol 7a-hydroxylases and contain keto- group in 17 and 20 position, respectively. Different derivatives of NBD-DHEA and NBD-PREG were used for virtual screening (figure 1).

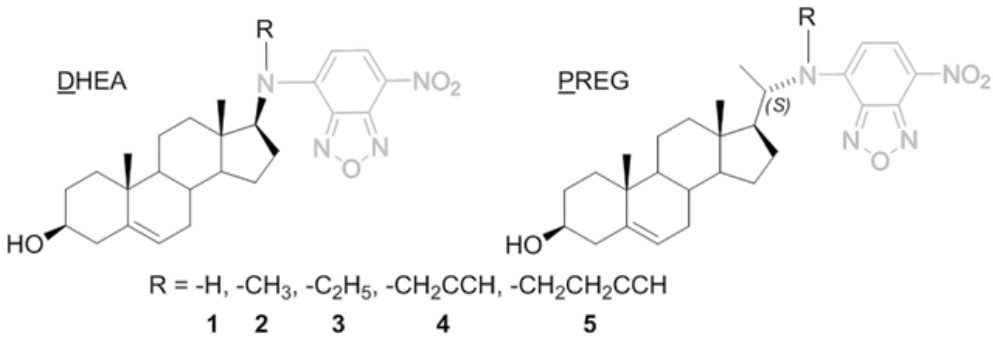


Figure 1. – Structures of sterol NBD derivatives

By method of molecular docking it was found out that fluorescent derivatives of DHEA and PREG without substituent in side chain or with methyl (ethyl) group, possess the highest affinity towards the investigated enzymes. It should be stressed that the affinity of these compounds to the enzymes is comparable to the affinity of model ligands (cholestenone, DHEA, PREG). It was shown that length increase of the side chain of substituent leads to a sharp decrease in the binding affinity. The main reason of it is a relatively small volume of sterol 7a-hydroxylases active site cavity. It also was found that in all cases the position of the ligand molecule in the enzyme active site corresponds to the position of known substrates of human sterol 7a-hydroxylases (androstanes, pregnanes and cholestanes). In these case sterane and heme planes are almost parallel and the distance between C7 and Fe is near 5 A which is appropriate and optimal for hydroxylation at this position. Thus is an evidence of the formation of the reaction product in reconstituted system.

Thus novel fluorescent ligands of human sterol 7α-hydroxylases were developed which can be used for determination of the influence of point mutations on spatial structure and catalytic properties of the enzymes.

Grant: The work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project X16-085).

УДК: УДК 577.322.23, ББК:

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОХРОМА B5 В КАЧЕСТВЕ БЕЛКА СЛИЯНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ АНТИТЕЛ С ЗАДАННЫМИ СВОЙСТВАМИ.

Д.О.Дормешкин

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141, Минск, Академика Купревича, 5/2, Dormeshkin@iboch.bas-net.by, +375259396787

В данной работе нами сконструирован новый сшитый белковый комплекс фрагментов антител с гемопротеином - цитохромом b5, который, благодаря характеристическому спектру поглощения, позволяет визуализировать процесс выделения и очистки антител, измерять их концентрацию спектрофотометрически в сложных смесях, а также оценивать значение окислительно-восстановительного потенциала их окружения.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, гетерологическая экспрессия, Escherichia coli, белок слияния

Несмотря на существование широкого разнообразие экспрессионных систем для получения фрагментов антител в бактериальной системе, данная задача по-прежнему остается актуальной, в виду отсутствия универсального подхода, позволяющего эффективно экспрессировать функционально-активные фрагменты антител различной природы, осуществлять мониторинг этого процесса в реальном времени и характеризовать полученные фрагменты антител в сложных смесях [1].

Целью данной работы являлось создание сшитого белкового комплекса, который бы позволял одновременно визуализировать процесс экспрессии фрагментов антител в бактериальной системе, и увеличить их выход за счёт повышения растворимости.

В качестве белка слияния нами был использован гемопротеин красного цвета - цитохром b5, который обладает высокой растворимостью, малым размером (14 кДа) и хорошо экспрессируется в бактериальной системе Escherichia coli [2].

Полученные белки слияния Fab и scFv фрагментов антител с цитохромом b5 имеют характеристический спектр поглощения с максимум на 413 нм в окисленной (Fe3+) форме при высоком значение коэффициента молярной экстинкции ε413=117 mM-1cm-1. Было отмечено троекратное увеличение выхода рекомбинантных антител (до 6 мг/л) в случае использования цитохрома b5 как белка слияния, по сравнению с экспрессией аналогичных фрагментов в тех же условиях. Полученные scFv-b5 и Fab-b5 белки слияния сохраняют антиген-связывающуюактивность.

Регистрация дифференциального спектра поглощения (A424-413) делает возможным количественно определять содержание белка слияния независимо от их природы и аминокислотного состава (рисунок 1).

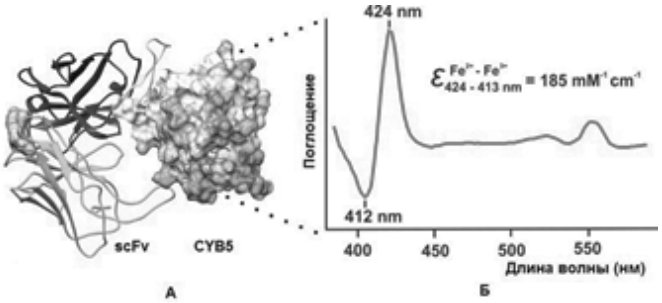


Рисунок 1 - Молекулярная модель scFv-b5 сшитого белка (А); разностный спектр поглощения – окисленный/восстановленный scFv-b5 (Б).

Измерение разностного спектра позволяет минимизировать вклад других хромофорных групп, которые могут поглощать в этом же регионе. Используя эту технику становится возможным определять концентрацию антител, независимо от их природы, в сложных смесях и мутных растворах – лизатах, мицеллах и даже живых клетках. Так как максимум поглощения в регионе Соре зависит от окислительно-восстановительного состояния гемопротеина в белке антитело-цитохром b5, использование данной системы позволяет оценивать относительной окислительно-восстановительный потенциал окружения фрагмента антитела измерением соотношения поглощения на 413 нм и 424 нм, что является принципиально важным для образования внутримолекулярных дисульфидных связей в антителах.

В данной работе был получен и характеризован новый белок слияния фрагментов антител с гемопротеином цитохромом b5 для получения и характеристики рекомбинантных антител. Цитохром b5 не влияет на антиген-связывающие свойства антител, увеличивает уровень периплазматической экспрессии, позволяет визуализировать процесс выделения и очистки, а также спектрофотометрически оценивать концентрацию белка, и его локализацию в E.coli (соотношение цитоплазматической и периплазматических фракций) [3].

Литература.
1. Binz, H.K., P. Amstutz, and A. Pluckthun, Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. Nat Biotechnol, 2005. 23(10): p. 1257-68. 2. Sergeev, G.V., et al., Expression of outer mitochondrial membrane cytochrome b5 in Escherichia coli. purification of the recombinant protein and studies of its interaction with electron-transfer partners.

Biochemistry (Mosc), 2006. 71(7): p. 790-9. 3. Dormeshkin, D., et al., Development of CYB5-fusion monitoring system for efficient periplasmic expression of multimeric proteins in Escherichia coli. Protein Expr Purif, 2016. 128: p. 60-6.

NOVEL CYTOCHROME B5 FUSION PROTEIN FOR ENGINEERING OF ANTIBODIES WITH DESIRED PROPERTIES

D.Dormeshkin

Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus, Belarus, 220141, Minsk, Academician Kuprevich, 5/2

We have developed a novel fusion protein composed of antibody fragment and a hemeprotein – cytochrome b5. Characteristic absorbance spectrum of cytochrome b5 allows us to monitor fusion protein expression and purification process, quantify them in reliable way in turbid solutions and evaluate the redox state of their environment.

Key words: Recombinant antibodies, heterologous expression, Escherichia coli, fusion protein

Despite all the developments for recombinant antibodies production in Escherichia coli , the problem of expression of functional active antibody fragments, which can be easily detectable, highly soluble and might be produced in high yields with low costs still exist. Another problem the scientists and the industry in general face is quantification of folded protein in complex mixtures by simple and fast methods [1].

We addressed the question whether a single tag could be found for enhancing solubility of recombinant antibodies in E.coli system and providing their detection and accurate quantification by rather simple method.

A promising candidate as a fusion tag is red-colored heme-binding domain of cytochrome b5. This 14 kDa hemeprotein possesses great solubility and could be expressed in E.coli with extremely high yield [2].

We performed expression and purification of Fab and scFv cytochrome b5 fusion proteins. It was revealed that they have characteristic absorbance spectrum of hemeprotein with high value of molar extinction coefficient (ε413=117.0 mM-1cm-1) in oxidized state (Fe3+). Cytochrome b5 also enhance expression yield of recombinant Fab antibodies (from 2 mg/L to 6 mg/L) and does not affect their antigen-binding properties.

Recording of difference spectrum of fusion protein (A424-413) gives the possibility of direct quantification of expressed fusion protein, irrespective of its nature and the amino acids composition (figure 1).

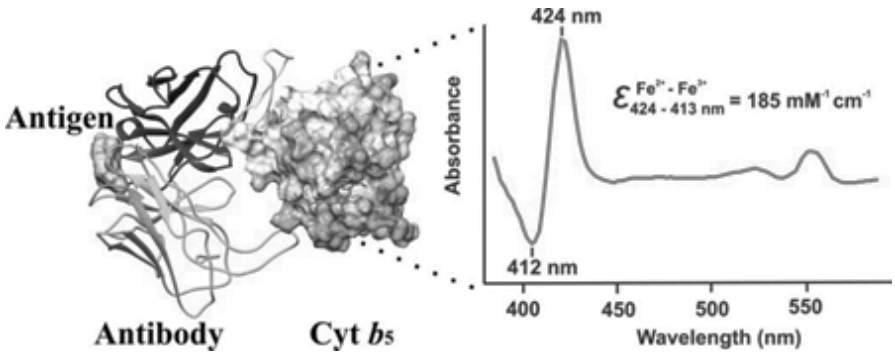


Figure 1 - scFv-b5 fusion protein in silico model (A); difference spectrum of oxidized/reduced scFv-b5 (B).

Difference spectrum measurement allows to minimize the contribution of other chromophores in the sample which could absorb in the same wavelength region. By using the proposed technique of difference spectrum registration, it became possible to estimate cytochrome b5 fusion protein concentration in extremely turbid solutions – lysates, micelles and even living cells. Since the maximum of absorbance in the Soret region depends on oxidation state of cytochrome b5 it became possible to evaluate relative redox potential of the antibody fusion protein enviroment by measuring 413/423 nm absorbance ratio.

We have developed and characterized a novel cytochrome b5 – antibody fuiosn protein. Cytochrome b5 fused to C-terminal end of antibody heavy chain region does not affect its affinity and specificity, enhance pericplasmic expression level more then three-fold. It also make it possible to vizualize antibody expressiona and purification process, determine its concentration in turbid solutions and to estimate the relative distribution of periplasmic and cytosolic localization of fusion protein in E.coli [3].

References:
1. Binz, H.K., P. Amstutz, and A. Pluckthun, Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. Nat Biotechnol, 2005. 23(10): p. 1257-68. 2. Sergeev, G.V., et al., Expression of outer mitochondrial membrane cytochrome b5 in Escherichia coli. purification of the recombinant protein and studies of its interaction with electron-transfer partners. Biochemistry (Mosc), 2006. 71(7): p. 790-9. 3. Dormeshkin, D., et al., Development of CYB5-fusion monitoring system for efficient periplasmic expression of multimeric proteins in Escherichia coli. Protein Expr Purif, 2016. 128: p. 60-6.

УДК: 579.695; 579.242; 577.151.4, ББК: 28.4

ПОКОЯЩИЕСЯ КЛЕТКИ АКТИНОБАКТЕРИЙ КАК ОСНОВА СТАБИЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ

Н.С.Егозарьян[1, 2], И.П.Соляникова[1], Н.Е.Сузина [1], Е.В.Емельянова[1], В.Н.Поливцева[1], А.Л.Мулюкин [3], Г.И.Эль-Регистан[3], Л.А.Головлёва[1]

[1]ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, Россия. 142290, Пущино, Проспект Науки, 5, natae05@yandex.ru
[2]ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 3ФГБУН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия, Россия, 119071, Москва, Ленинский Проспект, 33, корп.2, natae05@yandex.ru, 89255338098

Проведено исследование жизнеспособности неспорообразующих актинобактерий в стрессовых условиях. Отработаны способы получения покоящихся форм штаммов-деструкторов хлорфенолов. Показана эффективность хранения клеток бактерий, иммобилизованных на синтетические носители, и возможность их использования в качестве основы стабильных препаратов для биоремедиации среды от промышленных загрязнений.

Ключевые слова: актинобактерии, цистоподобные покоящиеся клетки (ЦПК), жизнеспособность, биодеградативный потенциал, биоремедиация, биопрепараты.

В современном мире актуальна проблема очистки окружающей среды от последствий промышленной деятельности человека [1]. Известно, что важная роль в конверсии токсичных «загрязнителей», к числу которых относятся галогенированные производные ароматических углеводородов, принадлежит микроорганизмам-деструкторам, способным использовать в качестве источника углерода и энергии различные устойчивые токсичные соединения [2]. Однако зачастую неблагоприятные для роста факторы окружающей среды вызывают изменение «стратегии роста» бактерий на «стратегию переживания и перехода в состояние покоя» [3]. Исследования жизнеспособности, метаболической активности и биодеградативного потенциала бактерий в стрессовых условиях, занимают особое место не только в фундаментальной микробиологии, но и в области биотехнологического использования штаммов.

Цель работы - поиск новых подходов получения жизнеспособных цистоподобных клеток штаммов-деструкторов неспорообразующих актинобактерий и оптимизация методов их хранения.

Исследования проводили на модельных неспорообразующих штаммах актинобактерий: Rhodococcus opacus 1CP, Arthrobacter agilis Lush13 и Microbacterium foliorum BN52.

Для получения препаратов покоящихся клеток (ПК) бактериальные культуры выращивали на богатой среде при перемешивании и хранили в статических условиях. В качестве основного подхода исследования жизнеспособности штаммов в стрессовых условиях вегетативные клетки хранили в условиях голодания, а также культивировали длительное время на средах, содержащих токсиканты - хлорфенолы. Показано, что данные условия могут спровоцировать переход клеток в цистоподобное покоящееся состояние (ЦПС).

Бактериальные культуры при хранении характеризовались хорошей выживаемостью. Наблюдалась положительная корреляция между сохранением высокой способности образования колоний (КОЕ) и обилием неповрежденных клеток. Хранение культур ПК в течение 6 мес.- 2 лет не сказывалось отрицательно на их способности к возобновлению роста, в том числе в присутствии ксенобиотиков. Культивирование ПК в минеральной среде с фенолом (100 мг/л), 4-хлорфенолом и 2,4,6-трихлорфенолом (50 мг/л) приводило к разложению субстратов за 48-72 ч.

Методом RT-PCR была подтверждена биодеградативная активность штаммов: показана индукция ферментов, отвечающих за разложение токсичных ароматических соединений. Охарактеризована субстратная специфичность моно- и диоксигеназ, катализирующих ключевые этапы деструкции.

Иммобилизация ПК штамма R. opacus 1CP на поликапроамидное волокно позволяла получать активные в отношении фенола прорастающие бактериальные клетки. Препараты клеток, иммобилизованных на волокне, были активны против фенола после 6-9 мес хранения.

В ходе исследования для модельных штаммов актинобактерий были подобраны условия, способствующие получению популяций с высоким (до 90%) содержанием покоящихся жизнеспособных клеток. Показана эффективность хранения и использования клеток бактерий-деструкторов, иммобилизованных на синтетические носители. Полученные данные могут быть использованы при оптимизации процессов биодеградации токсичных соединений. Разработанные методы длительного хранения бактериальных клеток с сохранением их жизнеспособности могут быть рекомендованы в качестве основы стабильных биопрепаратов.

Литература.
1. Golovleva L.A., Finkelstein Z.I., Golovlev E.L., Moisseeva O., Baskunov B.P., Solyanikova I.P. Bacterial degradation of chloroaromatic compounds. Abstracts of the conference "Biotechnology-2000". Pushchino, September 2000. P. 39. 2. Маркушева Т. В., Журенко Е. Ю., Кусова И. В. Бактерии-деструкторы фенола и его хлорированных производных. - Уфа: Гилем, 2002. 108 с. 3. Мулюкин А.Л. Покоящиеся формы неспорообразующих бактерий: Автореф. дис. док. биол. наук. — Москва, 2010.—349 с. 4. Solyanikova I.P., Emelyanova E.V., Borzova O.V., Golovleva L.A. Benzoate degradation by Rhodococcus opacus 1CP after a dormancy: characterization of dioxygenases involved in the process // J. Environm. Sci. Health. 2016. Part B. V. 51. No 3. P. 182-191.

Финансирование: Работа поддержана Российским Научным Фондом (РНФ, грант № 14-14-00368).

RESTING CELLS OF ACTINOBACTERIA AS THE BASIS OF STABLE PREPARATIONS FOR THE BIOREMEDIATION

N.Egozarian[1, 2], I.Solyanikova[1], N.Suzina[1], E.Emelyanova[1], V.Polivtseva[1], A.Mulyukin[3], G.El-Registan[3], L.Golovleva[1]

[1]G.K. Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms, RAS, Pushchino, Moscow region, Russia. 142290, Pushchino, Moscow region, Prospect nauki, 5, 5
[2]M.V. Lomonosov Moscow state University, Moscow, Russia, Russia , 142290, Pushchino, Moscow region, Prospekt nauki, 5, 5
[3]S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology, Federal research centre «Fundamentals of biotechnology», RAS, Moscow, Russia, Russia , 119071, Moscow, Leninsky Prospekt, 33, bld. 2

A study of the viability of nonspore actinobacteria at stress conditions has been conducted. Methods for chlorophenol strain-destructor resting forms production have been elaborated. The effectiveness of storage of bacterial cells immobilized on synthetic carriers was proven. Preparations of immobilized cells was shown can be used as the basis of stable products for the bioremediation of environment from industrial pollution.

Key words: actinobacteria, cyst-like resting cells, viability, biodegradation potential, bioremediation, biopreparations.

The problem of environmental pollution is one of the most actual in the modern world [1]. It is known that an important role in the conversion of toxic «pollutants», including halogenated derivatives of aromatic hydrocarbons, belongs to microorganisms-destructors, capable to use various synthetic compounds as a source of carbon and energy [2]. Often, however, environmental factors unfavorable for cell growth initiate a quick change of «growth strategies» of bacteria on the «strategy of surviving and transition into the resting state» [3]. Research the viability, metabolic activity and biodegradation potential of bacteria under stress conditions is important not only in basic Microbiology, but also in field of applied microbial biotechnology.

The purpose - to search for new approaches of obtaining viable biopreparations of cyst cells of strains-destructors and optimization of storage methods.

Investigation was performed on model strains of nonspore actinobacteria: Rhodococcus opacus 1CP, Arthrobacter agilis Lush13 and Microbacterium foliorum BN52.

Bacterial cultures were grown in rich medium and stored at room temperature in static conditions to obtain preparations of resting cells (RC). Two approaches were used to study the viability of the asporogenous strains under stress conditions. 1) The technique of long-term storage of vegetative bacterial cells in starvation conditions. 2) The technique of long-term storage of vegetative bacterial cells in the presence of toxic pollutants, chlorophenols. These conditions were shown can cause a shift of vegetative cells into a resting state (CRS).

Actinobacterial cells were characterized by high viability upon storage. There was a positive correlation between maintaining a high capability of formation of colonies (CFU) and the abundance of undamaged cells. Storage of resting cells (RC) preparations within 6 months - 2 years period had not affected the ability for the resumption of growth. Cultivation of RC in mineral medium with phenol (100 mg/l), 4-chlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol (50 mg/l) led to disappearance of substrates in 48-72 hours.

Biodegradation activity of strains was confirmed by RT-PCR: the induction of enzymes responsible for the degradation of toxic aromatic compounds was shown. Substrate specificity of mono- and dioxygenase, catalyzing key steps of (chloro)phenol destruction was characterized.

Immobilization of the RC on polycaproamide fiber allowed to obtain preparation of germinating bacterial cells active towards phenol. Cells immobilized on polycaproamide fiber store its activity toward phenol after storage during 6-9 month.

Thus, as a result of the study,conditions for obtaining of populations with high viability of dormant cells were developed. The efficiency of storage and usage of the cells of bacteria-destructors immobilized on synthetic media was demonstrated. The data obtained can be used in the optimization process of biodegradation of toxic compounds. The developed methods for long-term storage of viable bacterial cells can be recommended as a basis for stable biopreparations production.

References:
1. Golovleva L.A., Finkelstein Z.I., Golovlev E.L., Moisseeva O., Baskunov B.P., Solyanikova I.P. Bacterial degradation of chloroaromatic compounds. Abstracts of the conference "Biotechnology-2000". Pushchino, September 2000. P. 39. 2. Markusheva, T.V., Gurenko E.J., Kusova I.V. Bacteria-degraders of phenol and its chlorinated derivatives - Ufa: Gilem, 2002. 108 p. 3. Mulyukin A. L. Resting stage asporogenous bacteria: abstract. dis. Doc. Biol. Sciences. — Moscow 2010.- 349 p. 4. Solyanikova I.P., Emelyanova E.V., Borzova O.V., Golovleva L.A. Benzoate degradation by Rhodococcus opacus 1CP after a dormancy: characterization of dioxygenases involved in the process // J. Environm. Sci. Health. 2016. Part B. V. 51. No 3. P. 182-191.

Grant: This work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 14-14-00368).

УДК: 669.213.3, ББК:

РАЗРАБОТКА БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЗОЛОТА ИЗ ПЕРВИЧНЫХ РУД ЗОЛОТОИЗВЛЕКАТЕЛЬНОЙ ФАБРИКИ

Д.М.Есимова, А.К.Койжанова , Э.М.Камалов, Н.А.Усенов, Д.Р.Магомедов

Акционерное общество «Институт металлургии и обогащения», Республика Казахстан , 050010, Алматы, ул.Шевченко , 29/133, dina-28@inbox.ru, +7 747 840-73-87, раб.: +7 (727) 298-45-30

Приведены результаты биоокисления первичных руд с последующим цианированием флотоконцентратов с целью извлечения золота, ассоциированного с сульфидами. Осуществлен отбор представительных проб и изучен фазовый состав технологической пробы (ТП) 5 и (ТП) 6 золотоизвлекательной фабрики месторождения Карьерное. В результате фазового анализа установлено, что золото присутствует в виде тонкодисперсного, самородного и покрытого кварцем. В оптимальном режиме цианирования остатков биоокисления за 24 ч извлекается золото из флотоконцентратов ТП 5 – 94,2% и ТП 6 - 94,5%.

Ключевые слова: руда, флотоконцентрат, биоокисление, цианирование, золото

Целью работы являлось проведение исследований и разработка биогидрометаллургической технологии извлечения золота из первичных руд золотоизвлекательной фабрики. Для достаточно полного извлечения золота из сульфидных минералов производится разрушение их кристаллической решетки с целью большей доступности золота для цианистых растворов. Наиболее перспективным способом подготовки сульфидных концентратов к цианированию является их биоокисление (БО) с использованием микроорганизмов, способных окислять сульфидные минералы[1,2]. Данный способ успешно применяется для извлечения золота из сульфидного сырья, в котором золото тесно ассоциировано с таким минералом как арсенопирит.

Для изучения технологических свойств флотационных концентратов выполнены тесты по их выщелачиванию с использованием биоокисления и последующим цианированием. Все исследования по выщелачиванию проводили в прямом режиме на исходной крупности материала (90% -0,071 мм). pH пульпы при выполнении тестов поддерживали на уровне 10-11 добавкой извести.

Результаты тестов свидетельствуют о том, что технологические пробы ТП – 5 и ТП – 6 являются упорными для переработки их методами агитационного цианирования. Извлечение золота при выщелачивании с концентрацией цианида 0,2% составляет 24,5 и 23,5%.

Для определения возможности повышения извлечения золота было проведено биоокисление флотоконцентратов. В качестве биоокислительных агентов был использован лабораторный штамм Acidithiobacillus ferrooxidans с концентрацией клеток 107 кл/мл. После проведения биоокисления флотоконцентратов для определения возможности повышения извлечения золота проведены тесты по цианированию кеков после биоокисления. Результаты теста показывают, что процесс биоокисления повышает степень извлечения золота из флотоконцентратов ТП-5, ТП-6 на 69,7% и 71% соответственно. Это указывает на то, что для извлечения золота из первичной сульфидной пробы ТП-5 ТП-6 необходимо проведение предварительного биоокисления.

Таким образом, результаты тестов по цианированию флотационных концентратов показали, что данный продукт ТП-5 и ТП-6, является упорным для переработки его гидрометаллургическими методами. Поэтому ее изучение целесообразно продолжить в направлении оптимизации флотации (оптимальная крупность измельчения, реагентный режим), а также применения специальных методов подготовки исходной руды и продуктов ее обогащения перед гидрометаллургической переработкой (бактериальное окисление, атмосферное окисление и т.д.).

Литература.
1.Седельникова Г.В. Сравнение автоклавного и бактериального выщелачивания // Золото и технологии. - 2014. - №2 (24). - С. 110-115. 2.Седельникова Г.В., Ким Д.Х., Ибрагимова Н.В. Сравнение современной технологии кучного бактериального выщелачивания с традиционной флотационно-цианистой переработкой упорной золотосульфидной медно-цинковой рудой // Руды и металлы. – 2015. - №3. – С. 59-69.

Финансирование: Разработка биохимической технологии извлечения золота из хвостов сорбции золотоизвлекательной фабрики ТОО «Altyntau Kokshetau» № 183/27

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY BIOHYDROMETALLURGICAL EXTRACTION GOLD FROM PRIMARY ORE GOLD RECOVERY PLANT

D.Esimova , A.Koizhanova , E.Kamalov, N.Usenov , D.Magomedov

Joint-stock company «Institute of Metallurgy and Ore Benefication», Republic of Kazakhstan, 050010, Almaty, Shevchenko St. , 29/133

The results of the bio-oxidation of primary ore flotation concentrate followed by cyanidation to recover gold associated with sulphides. It carried out the selection of representative samples and studied the phase composition of the sample processing TP 5 and TP 6 gold recovery plant Karjernoe field. The resulting phase analysis revealed that the gold is present as a fine, native and coated quartz. The bio-oxidation cyanidation optimally balances for 24 h extracted gold from flotation concentrates TP 5 - 94.2% and TP 6 - 94.5%.

Key words: ore flotation concentrate, bio-oxidation, cyanidation, gold

The purpose of work is research and development Biohydrometallurgical technology to extract gold from the primary ores of gold recovery plant. For sufficiently complete gold recovery from sulfide minerals produced the destruction of the crystal lattice with a view to greater availability of gold to cyanide solutions. The most promising way to prepare for cyanidation of sulphide concentrates is their bio-oxidation (BW) using microorganisms capable of oxidizing sulfide minerals. This method is successfully used to extract gold from the sulfide raw materials in which gold is closely associated with a mineral arsenopyrite.

To study the technological properties of flotation concentrates are made by their leaching tests using bio-oxidation and subsequent cyanidation. All studies were performed by leaching in direct mode on the original size of the material (90% -0.071 mm). The pH of the pulp when the test was maintained at 10-11 addition of lime.

Test results indicate that the technological tests of TP - 5 and TP - 6 are resistant to their processing methods of agitation cyanidation. Gold extraction by leaching with cyanide concentration of 24.5 0.2% and 23.5%.

To determine the possibility of increasing gold extraction was carried out flotation concentrate bio-oxidation. As bio-oxidation agents laboratory strain of Acidithiobacillus ferrooxidans was used with a cell concentration 107 cells / ml.

After the flotation concentrate bio-oxidation to determine the possibility of increasing the recovery of gold by cyanidation tests conducted cakes after biooxidation.

The test results show that bio-oxidation process increases the degree of gold extraction from flotation concentrates TP-5, TP-6 at 69.7% and 71%, respectively. This indicates that for the extraction of gold from primary sulphide sample TP-5, TP-6 is necessary to conduct a preliminary bio-oxidation.

Thus, the results of tests by cyanidation of flotation concentrates showed that the product TP-5 and TS-6 is resistant to processing its hydrometallurgical methods. Therefore, it is advisable to continue the study in the direction of flotation optimization (optimal grind size, reagent regime), as well as the use of special methods of preparation of the initial ore and products of their enrichment before hydrometallurgical processing (bacterial oxidation, air oxidation, etc.).

References:
1.Sedelnikova GV Compare autoclave and bacterial leaching // Gold and technology. - 2014. - №2 (24). - S. 110-115.
2.Sedelnikova GV, Kim DH, Ibragimova NV Comparison of modern technology of heap leaching with traditional bacterial Flotation and cyanide processing of hard gold-copper-zinc ore // Ores and metals. - 2015. - №3. - S. 59-69.

Grant: The development of biochemical techniques to extract gold from tailings sorption of gold processing plant LLP «Altyntau Kokshetau» № 183/27

.....

УДК: 577.113, 577.21, ББК: 28.07

ВЛИЯНИЕ НЕКАНОНИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ЭКЗОГЕННЫХ АНАЛОГОВ МАЛЫХ ЯДЕРНЫХ И МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК

Е.С.Журавлев[1], Г.А.Степанов[2], В.О.Шендер[3], В.А.Рихтер[4], Д.В.Семенов[5]

[1]ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8, evgenijur@gmail.com, 89095330315
[2]ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8, stepanovga@niboch.nsc.ru,
[3]ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, shender_vika@mail.ru ,
[4]ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8, richter@niboch.nsc.ru,
[5]ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8, semenov@niboch.nsc.ru,

Ранее в пуле коротких циркулирующих РНК крови человека выявлены фрагменты и полноразмерные формы различных нкРНК. В работе синтезированы in vitro аналоги ряда коротких нкРНК человека, содержащие в своей структуре неканонические нуклеотиды. Показано, что наличие модифицированных мономеров позволяет снизить неспецифические эффекты РНК на клетки человека.

Ключевые слова: малые ядрышковые РНК (мяоРНК/snoRNA); малые ядерные РНК (мяРНК/snRNA); неканонические мономеры РНК; псевдоуридин; 5-метилцитидин.

Благодаря развитию методов секвенирования нового поколения непрерывно увеличивается объем данных, описывающих разнообразие форм некодирующих РНК (нкРНК), циркулирующих во внеклеточном пространстве в составе мембранных везикул и свободных рибонуклеопротеидов [1, 2]. Одним из подходов к изучению свойств внеклеточных РНК является создание их синтетических аналогов с последующей трансфекцией в клетки [3, 4]. В то же время известно, что зрелые формы многих классов нкРНК содержат в своей структуре неканонические нуклеотиды. В частности, в природных формах РНК наиболее часто встречаются нуклеотиды, метилированные по остатку рибозы или основанию, а также псевдоуридины (Ψ). Поэтому актуальной на сегодняшний день задачей является изучение влияния неканонических нуклеотидов на функционирование аналогов нкРНК как в клетках человека, так и во внеклеточном пространстве.

В данной работе в качестве модели для исследования были выбраны хорошо изученные представители коротких нкРНК: малые ядерные и малые ядрышковые РНК (мяРНК, мяоРНК) – ключевые транс-факторы пост-транскрипционного созревания мРНК и рРНК, соответственно. С помощью транскрипции invitroбыли получены искусственные РНК с последовательностью U25, U35a и U74 C/D-бокс-мяоРНК, а также U6atac и U12 мяРНК человека. РНК-конструкции содержали остатки природных неканонических мономеров N6-метиладенозина (m6A), 5-метилцитидина (m5C) и псевдоуридина (Ψ), а также кэпированный 5’-концевой

нуклеотид (m7G(5')ppp(5')GpN либо m32,2,7G(5')ppp(5')GpN). Содержание неканонических мономеров в структуре полученных РНК оценивали с помощью оптимизированного подхода, включающего исчерпывающий ферментативный гидролиз РНК до нуклеозидов с последующей ВЭЖХ с УФ- либо масс-спектрометрической детекцией. В ходе трансфекции аналогов в клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231 было установлено, введение в структуру синтетических РНК Ψ и m5Ссущественно снижают уровень активации транскрипции ключевых генов РНК-зависимого врожденного иммунного ответа и цитотоксическое воздействие синтетических РНК-конструкций на клетки. Наиболее значимый эффект наблюдали при полном замещении U на Ψ и одновременном формировании кэпированного 5'-конца. С помощью флуоресцентно- и радиоактивно-меченных мяоРНК/мяРНК-конструкций удалось подтвердить стабильность и цитоплазматическое накопление аналогов нкРНК в клетках человека. Методом термической денатурации с оптической детекцией было показано, что остатки Ψ значительно стабилизируют пространственную структуру полученных РНК-конструкций, что указывает на возможное влияние модифицированных оснований на взаимодействие экзогенных РНК с внутриклеточными рецепторами типа Rig-1. С применением подхода полнотранскриптомного массового параллельного секвенирования на платформе Illumina был проанализирован профиль транскрипционной активности генов в клетках человека, трансфицированных РНК-конструкциями, содержащими неканонические мономеры. Установлено, что Ψ и m5C обеспечивают схожий эффект в подавлении иммунностимулирующей активности экзогенных РНК.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что введение неканонических мономеров в структуру аналогов коротких нкРНК позволяет снизить неспецифические эффекты на клетки человека. Стратегия синтеза искусственных РНК-конструкций, включающих структуры природных неканонических мономеров РНК, может быть использована при создании направленных, терапевтически значимых регуляторов экспрессии генов.

Литература.
1. Savelyeva A.V. et al. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions // BioMed Research International. 2017. Vol. 2017. 2. Semenov D.V. et al. Unbiased approach to profile the variety of small non-coding RNA of human blood plasma with massively parallel sequencing technology // Expert opinion on biological therapy. 2012. Vol. 12. P. S43-S51. 3. Stepanov G. A. et al. Artificial box C/D RNAs affect pre-mRNA maturation in human cells // BioMed research international. 2013. Vol. 2013. 4. Stepanov G.A. et al. Artificial Analogues of Circulating Box C/D RNAs Induce Strong Innate Immune Response and MicroRNA Activation in Human Adenocarcinoma Cells // Adv Exp Med Biol. 2016. Vol. 924. P. 121-125.

Финансирование: Работа поддержана Грантами РФФИ 16-04- 01414, 16-34- 60136, 16-04-01457 и Стипендией Президента РФ молодым ученым (2063.2015.4)

INFLUENCE OF NON-CANONICAL NUCLEOTIDES ON THE FUNCTION OF EXOGENIC ANALOGUES OF SMALL NUCLEAR AND SMALL NUCLEOLAR RNA IN HUMAN CELLS

E.Juravlev[1], G.Stepanov[2], V.Shender[3], V.Richter[4], D.Semenov[5]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Russian Federation, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 8
[2]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Russian Federation, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 8
[3]Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Russian Federation, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10
[4]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Russian Federation, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 8
[5]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Russian Federation, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 8

Previously, fragments and full-length forms of various ncRNAs have been identified in the pool of small RNAs circulating in human blood. We have synthesized analogues of a series of human small ncRNAs containing non-canonical nucleotides in vitro. It has been demonstrated that the presence of modified monomers allows reducing non-specific effects of RNA on human cells.

Key words: small nucleolar RNA (snoRNA); small nuclear RNA (snRNA); non-canonical RNA monomers; pseudouridine; 5-methylcytosine.

Due to the development of next-generation sequencing methods, the scope of data describing a variety of non-coding RNA (ncRNA) forms circulating in the extracellular space as part of membrane vesicles and free ribonucleoproteins is continuously increasing [1, 2]. One of the approaches to study the properties of extracellular RNAs is the development of their artificial analogues with further transfection into cells [3, 4]. At the same time, mature forms of many classes of ncRNA are known to have non-canonical nucleotides in their structure that contain chemical modifications. In particular, nucleotides methylated at ribose moiety or base, as well as pseudouridines (Ψ), are most widespread in naturally occurring RNA forms. Therefore, it is important to study the influence of non-canonical nucleotides on the function of ncRNA analogues both in human cells and in the extracellular space.

In the current work, well-studied representatives of ncRNA: small nuclear and small nucleolar RNA (snRNA, snoRNA), the key trans-factors of post-transcriptional maturation of mRNA and rRNA, respectively, have been chosen as the model. Artificial RNAs with the sequence of U25, U35a and U74 human box C/D snoRNAs as well as U6atac and U12 human snRNAs were obtained using in vitro transcription. RNA constructs contained residues of native non-canonical monomers N6-methyladenosine (m6A), 5-methylcytosine (m5C) and pseudouridine (Ψ), as well as a capped 5'-terminal nucleotide (m7G(5')ppp(5')GpN or m32,2,7G(5')ppp(5')GpN). The content of non-canonical monomers in the structure of the resulted RNAs was assessed using an optimized approach, which included complete enzymatic hydrolysis of RNA to nucleosides followed by HPLC with either UV or mass spectrometric detection. Transfection of human breast adenocarcinoma MCF-7 and MDA-MB-231 cells with the analogues demonstrated that introduction of Ψ and m5C in the structure of artificial RNAs significantly reduce transcription activation level of the key genes of RNA-dependent innate immune response and cytotoxic effects of synthetic RNA constructs on the cells. The most significant effect was observed upon total replacement of U with Ψ and simultaneous formation of the capped 5'-end. We managed to prove the stability and cytoplasmic accumulation of ncRNA analogues in human cells using fluorescently and radioactively labeled snoRNA/snRNA constructs. The method of thermal denaturation with optical detection has demonstrated that Ψ residues significantly stabilize spatial structure of the obtained RNA constructs indicating the possible influence of modified bases on the interaction of exogenous RNAs with intracellular Rig-1-like receptors. Using massively parallel whole transcriptome sequencing on an Illumina platform, we have analyzed the profile of gene transcriptional activity in human cells transfected with RNA constructs containing non-canonical monomers. The obtained results indicated that Ψ and m5C provide a similar effect in suppressing the immune-stimulating activity of exogenous RNAs.

Thus, the obtained results indicate that introduction of non-canonical monomers in the structure of small ncRNA analogues allows reducing non-specific effects on human cells. The strategy of the synthesis of artificial RNA constructs including structures of natural non-canonical RNA monomers can be used for development of targeted therapeutically relevant regulators of gene expression.

References:
1. Savelyeva A.V. et al. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions // BioMed Research International. 2017. T. 2017. 2. Semenov D.V. et al. Unbiased approach to profile the variety of small non-coding RNA of human blood plasma with massively parallel sequencing technology // Expert opinion on biological therapy. 2012. T. 12. №. sup1. P. S43-S51. 3. Stepanov G. A. et al. Artificial box C/D RNAs affect pre-mRNA maturation in human cells // BioMed research international. 2013. T. 2013. 4. Stepanov G.A. et al. Artificial Analogues of Circulating Box C/D RNAs Induce Strong Innate Immune Response and MicroRNA Activation in Human Adenocarcinoma Cells // Adv Exp Med Biol. 2016. Vol. 924. P. 121-125.

Grant: This work was supported by RFBR grants 16-04-01414, 16-34-60136, 16-04-01457 and grant of the President of the Russian Federation for young scientists (2063.2015.4).

УДК 544.481.1

ДИМЕРИЗОВАННЫЕ ФОРМЫ ПОЛЛЮТАНТОВ, КАК УЧАСТНИКИ ОКИСЛЕНИЯ ХЛОРФЕНОЛОВ НА ТИТАНОВЫХ ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗАТОРАХ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Заев Д.А.,Салех Мохаммед Мокбель, Михаленко И.И.

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.
e-mail: FyodorovD1994@yandex.ru

Стокгольмская Конвенция 2009 г. требует полного уничтожения двенадцати стойких органических загрязни-

телей, в число которых входят и хлорароматические вещества. В современных технологиях очистки бытовой сточной жидкости применяютсябиологические и химические методы.Хлорфенолы (ХФ) отличаются высокой устойчивостью к биодеградации и токсичностью к микроорганизмам, что затрудняет применение микробиологических технологий для их быстрой и эффективной нейтрализации ХФ. Химические методы очистки позволяют частично или полностью разлагать вредные хлорорганические вещества или переводить их в формы, способные к дальнейшей биодеградации. Комбинированные окислительные процессы (AOP – AdvancedOxidationProcesses) называют «процессами обработки воды XXI века». В них образование активных в деструкции органических молекул ·OH радикаловинициируется использованиемУФ облученияв присутствии диоксида титана, а также систем Фентонас пероксидом водорода [1].Электроокисление может быть включено в комплекс AOP.

В данной работе исследовали и анализировали кинетику электроокисления фенола и хлорфенолов на анодах с титановой подложкой, содержащих и не содержащих платину. Методом циклической вольтамперометрии были получены зависимости скорости окисления в кислом и щелочном фоновом растворе от концентрации вещества, которые все оказались нелинейными и соответствовали дробному порядку (0,3-0,5), что объяснено участием в электрокатализе молекулярных ассоциатов – димеров и тримеров[2]. Значения эффективной константы скорости окисленияK½зависели от покрытия анода и соответствовали ряду фенол < 3-хлорфенол(3ХФ)< 4-хлорфенол(4ХФ) < 2,4-дихлорфенол(2,4ДХФ) > 2,4,6-трихлорфенол(2,4,6ТХФ). Имели место корреляции между K½ и характеристиками молекул, такими как дипольный момент, электрофильность, энергия водородной связи в ассоциате и изменение её длины при «растворении» ХФ.

Ключевые слова: хлорфенолы, димеры, электроокисление, титан, платина.

Цель работы – сравнить активности фенола и хлорфенолов в электроокислениина анодах Pt/Ti, оксид/Tiи проанализировать данные потенциодинамических опытов с учетом образования комплексов ассоциированных молекули их свойств.

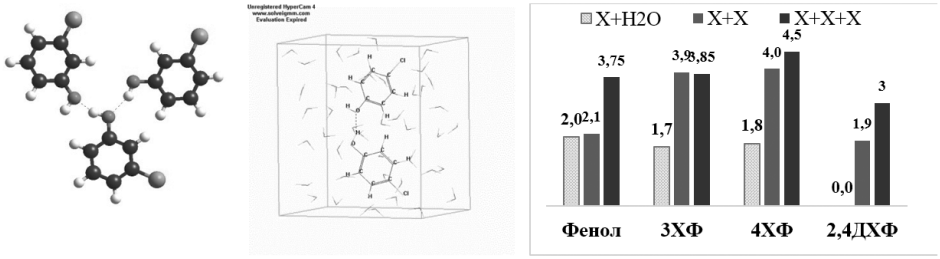


Рис.1. Тример 3ХФ, димер 4ХФ в водяном кубе и энергии водородной связи (ккал/моль)

Квантово-химические расчёты (HyperChem 8.0.8) показали, что ассоциаты молекул–стабильные структуры, водородная связь в них прочнее, чем связь с водой, что видно из гистограммы рис.1. Превращения ХФ на аноде начинается с адсорбции ассоциатов и их последующей диссоциации Xm(раствор) ↔Xm(электрод) →mXадс→окисление.

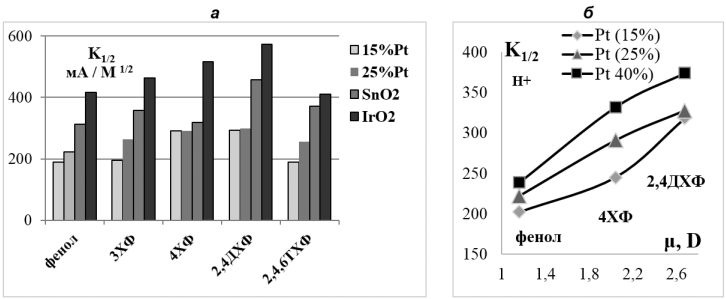


Рис.2. Влияние состава анода на K½ с анодами Pt/Tiв кислой среде (а) ис анодами Ox/Ti в щелочной среде и корреляцииK½с дипольным моментом молекул D(б).

Таким образом, при электролизе хлорорганических молекул окислению предшествует диссоциативная адсорбция комплексов субстрата, кинетические параметры которой определяются природой анода, средой, количества атомов хлора, что отражают корреляции константы скорости электроокисления с ха-

рактеристиками молекул ХФ, например, дипольным моментом (рис.2).

Литература.
1. Pera-Titus M. Degradation of chlorophenols by meance of advanced oxidation processes: A general rewiew // Applied Catalysis B: Enviromental.- 2004.-V.47.- P.219-256.
2. Saleh M.M., Zaev D.A., Mikhalenko I.I. Dimers intermediates in chlorophenols oxidation over Ti supported electrocatalysts// X International Conference "Mechanisms of Catalytic Reactions" (Kaliningrad, Russia) on 2-6 Oct, 2016.P.201.

UDC544.481.1

DIMERIZED FORMS OF POLLUTANTS AS PARTICIPANTS IN THE OXIDATION OF CHLOROPHENOLS ON TITANIUM ELECTROCATALYSTSIN WATER

Zaev D., Saleh Mohammed Mokbel, Mikhalenko I.

Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia
117198, Moscow, Miklouho-Maclay St, 6.
e-mail: FyodorovD1994@yandex.ru

Stockholm Convention of 2009 requires the complete forbiddance of the twelve persistent organic pollutants including chlor-aromatics compounds. The modern technologies of household cleaning use biological and chemical methods. Chlorophenols (CP) are highly resistant to biodegradation and toxic to microorganisms, that complicates the use of microbiological techniques for quick and effective neutralization of CP. Chemical cleaning methods allow to partially or completely decompose harmful organochlorine substances or to transfer them to the form, capable of further biodegradation. Combined oxidation processes (AOP - Advanced Oxidation Processes) referred to as «water treatment processes of the XXI century». They are active in the formation of active in degradation of organic molecules ·OH radicals due to UV irradiation in the presence of titanium dioxide, and Fenton's systems with hydrogen peroxide. Electrooxidation may be inserted into the complex AOP.

In this article we investigated and analyzed the kinetics of phenol and chlorophenols electrooxidation on anodes, prepared on titanium substrate with and without platinum. By cyclic voltammetry method the dependences of anodic current from speed of potential of CP oxidation in acidic and alkaline solutions and concentration of the substance were obtained. The latter were nonlinear and fractional order (0.3-0.5) was explained by the participation in electrocatalysis associated PC moleculs - dimers and trimers of [1, 2]. The values of the effective constant oxidation rate K½ depended on the anode surface and increases in the row phenol < 3 chlorophenol< 4-chlorophenol < 2,4-dichlorophenol > 2,4,6-trichlorophenol. There were found the correlations between K½ and calculated by quantum chemical methods the molecular characteristics, such as dipole moment, electrophilicity, the energy of the hydrogen bond in the associate and change its length at «dissolution.»

Key words: chlorophenols, dimers, electrooxidation, titanium and platinum.

The aim is to compare the characteristics of the electrochemical activity of phenol and chlorophenols on of Pt / Ti anodes, oxide / Ti and analyze data potentiometer-dynamic tests, taking into account the formation of molecules and their associated properties.

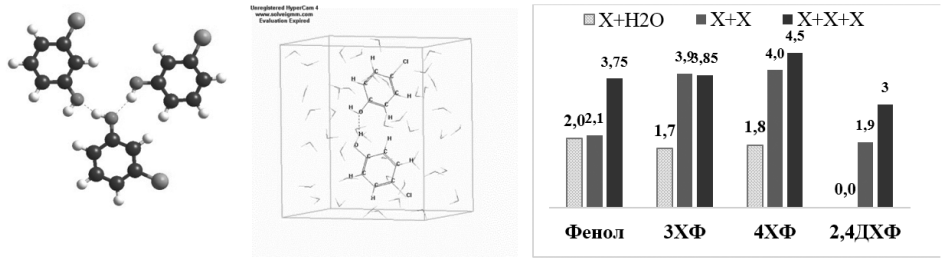


Fig.1. 3-chlorophenol trimer and 4-chlorophenol dimer in water cubeand the energy of hydrogen bond in kcal/mol.

Calculations have shown that associates (X+X dimers and trimers X+X+X) chlorinated phenolic molecules are a stable structure's. The hydrogen bond energy in associates X+X is stronger compared to water X + H2O. Chain

reactions can be written as Xm (solution) ↔ Xm (electrode) →mXads→oxidation where m is association number.

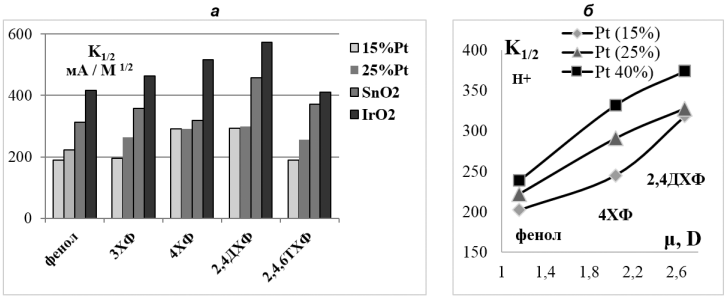


Fig.2. Influence of anode compositionon K½ and on a Pt / Ti anode with varying amounts of Pt in acid medium and the correlation of the dipole moment of the molecule D with the K½ (b).

Thus, in electrolysis processes the dissociative adsorption of molecular complexes is preceded the stage of CP oxidation and its kinetic parameters depend on the nature of anode, medium, and PC, namely the amount of chlorine atoms, that is demonstrated by the correlation between the rate constant of the electrochemical oxidation and CP molecules` characteristics, for example, the dipole moment of oxidizing molecule (fig.2).

1. Pera-Titus M. Degradation of chlorophenols by meance of advanced oxidation processes: A general rewiew // Applied Catalysis B: Enviromental.- 2004.-V.47.- P.219-256.

2. Saleh M.M., Zaev D.A., Mikhalenko I.I. Dimers intermediates in chlorophenols oxidation over Ti supported electrocatalysts// X International Conference "Mechanisms of Catalytic Reactions" (Kaliningrad, Russia) on 2-6 Oct, 2016.P.201.

УДК: 602.4:628.35:664, ББК: 24.5

БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗ В СИСТЕМАХ «СУБСТРАТ-КЛЕТКИ-МЕДИАТОР-ЭЛЕКТРОД» КАК ОСНОВА МЕДИАТОРНЫХ БИОСЕНСОРОВ И БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

А.С.Зайцева, В.А.Алферов

Тульский государственный университе, Россия, 300012, Тула, пр. Ленина, 92, Anyuta_Zaytseva@mail.ru, 8-915-780-52-55

Найдены константы скорости взаимодействия медиатора с бактериальными и дрожжевыми клетками и выявлены системы «клетки-медиатор», в которых медиатор успешно конкурирует с естественным акцептором электронов – кислородом.

Ключевые слова: медиатор, бактерии Gluconobacter oxydans, дрожжи Debaryamyces hansenii

Медиаторный перенос широко используется в биоэлектрохимии для разработки биосенсоров на основе целых клеток микроорганизмов для мониторинга индекса БПК [1,2], интегральной токсичности [3], а также при разработке биотопливых элементов [4]. Целью данной работы явилось нахождение количественных характеристик медиаторного переноса электронов при окислении субстрата – глюкозы различными микроорганизмами.

В качестве микроорганизмов были использованы дрожжи Debaryamyces hansenii ВКМ Y-2482, бактерии Gluconobacter oxydans ВКМ В-1280 и бактерии, выделенные из активного ила, а в качестве медиаторов были выбраны следующие соединения: ферроцен, тионин, метиленовый синий, нейтральный красный и 2,6-дихлорфенолиндофенол, поскольку данные вещества нетоксичны и находят широкое применение в качестве переносчиков электронов от активного центра ферментов клеток к поверхности электрода.

Скорость восстановления медиаторов в присутствии избытка окисляемого субстрата - глюкозы измеряли с помощью спектрофотометра СФ-104 (ООО «Аквилон», Россия). Установлено, что восстановление медиаторов при концентрациях ниже константы Михаэлиса является реакцией первого порядка и подчиняется механизму «пинг-понг». С учетом полученных констант скорости восстановления выявлен наиболее перспективный медиатор для дрожжей D. hansenii - нейтральный красный, и для бактерий G. oxydans - 2,6-дихлорфенолиндофенол. Константы скорости восстановления медиаторов составили 0,018±0,003 и

0,27±0,03 дм3/(г×с) соответственно.

Исследована кинетика восстановления естественного акцептора электронов – кислорода микроорганизмами с помощью БПК–термооксиметра «Эксперт-001» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия). Установлено, что восстановление кислорода является реакцией нулевого порядка. Для установления конкуренции медиатора и кислорода находили относительные скорости восстановления акцепторов электрона клетками, в результате были выявлены системы «клетки-медиатор», в которых медиатор успешно конкурирует с естественным акцептором электронов – кислородом, что позволяет использовать такие системы в биоэлектрокатализе без необходимости деаэрации, существенно сокращая эксплуатационные затраты биосенсоров и биотопливных элементов.

Методом циклической вольтамперометрии с помощью анализатора «Экотест–ВА» (ООО «Эконикс–Эксперт», Россия) было исследовано анодное окисление медиатора ферроцена на угольно-пастовом электроде. Несмотря на наличие анодного и катодного пиков на вольтамперограмме, процесс окисления медиатора необратим. Показано, что большое различие в скоростях прямой и обратной реакции обусловлено существенным анодным перенапряжением (более 118 мВ). Из Тафелевских зависимостей был найден коэффициент переноса αnα, окисления ферроцена, который составил 0.41 ± 0,01. При иммобилизации электродов микроорганизмами установлено, что процесс переноса электронов осложнён протеканием последующей химической необратимой реакцией взаимодействия медиатора и клеток микроорганизмов, что подтверждает биоэлектрокатализ.

Полученные характеристики позволят целенаправленно выбирать медиатор электронного транспорта при разработке биосенсоров и биотопливных элементов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ и Правительства Тульской области № 16-48-710959 р_а (договор ДС/44) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, договор № 14.Z56.16.5425-МК.

На основе спектрофотометрических и амперометрических исследований кинетики восстановления медиаторов и кислорода микроорганизмами и на основе данных циклической вольтаметрометрии были сделаны следующие выводы: 1. С учетом полученных констант скорости восстановления медиаторов установлено, что наиболее перспективным медиатором для дрожжей является нейтральный красный, а для бактерий G. oxydans 2,6-дихлорфенолиндофенол (Константа скорости первого порядка восстановления медиаторов суспензией клеток составила 0,018±0,003 и 0,27±0,03 дм3/(г×с) соответственно). 2. По относительным скоростям восстановления акцепторов электрона было установлено, что скорость восстановления медиаторов выше, чем скорость восстановления кислорода. В таких системах медиатор успешно конкурирует с кислородом, что позволяет использовать найденные комбинации «клетки-медиатор» в биоэлектрокатализе без необходимости деаэрации. 3. Выявлено, электродная реакция с участием медиаторов на угольно-пастовом электроде необратима, из-за различия коэффициентов переноса катодного и анодного процессов, что характерно для окислительного биоэлектрокатализа. После адсорбции клеток на электроде установлено, что перенос электрона осложнен взаимодействием медиатора и клеток микроорганизмов, что указывает на использование окисленной формы медиатора клетками в качестве субстрата и акцептора электронов.

Литература.
1. Hu J., Gao G., Xia S. A Mediated BOD Microsensor Based on Poly (Neutral Red) and Bacteria Modified Interdigited Ultramicroelectrode Array // International journal of electrochemical science. 2016. V. 11. I. 7. P. 6387-6402. 2. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue / Niyomdecha S. Limbut W., Numnuam A. et al. //Sensors and Actuators B: Chemical. 2017. V. 241. P. 473-481. 3. Development of a mediated whole cell-based electrochemical biosensor for joint toxicity assessment of multi-pollutants using a mixed microbial consortium / G. Gao, J. Qiana, D. Fang et al. // Analytica chimica acta. 2016. V. 924. P. 21-28. 4. Hubenova Y., Mitov M. Extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cells: A review // Bioelectrochemistry. 2015. V. 106. P. 177-185.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ и Правительства Тульской области № 16-48-710959 р_а (договор ДС/44) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, договор № 14.Z56.16.5425-МК.

BIOELECTROCATALYSIS IN THE SYSTEMS «SUBSTRATE-CELL-MEDIATOR-ELECTRODE» AS THE BASIS OF MEDIATOR BIOSENSORS AND BIOFUEL CELLS

A.Zaitseva, V.Afverov

Tula State University, Russia, 300012, Tula, Lenin Avenue, 92

Rate constant of the reaction of mediator with Debaryamyces hansenii yeast and Gluconobacter oxydans bacteria were obtained and it was identified the system of «mediator-cells» in which the mediator competes well with the natural electron acceptor - oxygen.

Key words: mediator, bacteria Gluconobacter oxydans, yeast Debaryamyces hansenii

Electron mediator transfer is widely used in bioelectrochemistry for development of biosensors based on whole cells of microorganisms for monitoring BOD index [1,2] joint toxicity [3] and the development of biofuel cells [4]. The aim of this study was to find the quantitative characteristics of the electron mediator transfer in the oxidation of a substrate - glucose by various microorganisms.

Debaryamyces hansenii yeast VKM Y-2482, Gluconobacter oxydans VKM B-1280 bacteria and bacterium isolated from activated sludge were used as microorganisms, as mediators were selected following compounds: ferrocene, thionine, methylene blue, neutral red and 2,6 -dihlorfenolindofenol because these compounds are non-toxic and are widely used as carriers of electrons from the active center of the cell enzymes to surface of the electrode.

Rate of mediators reduction in the presence of an excess of oxidized substrate - glucose was measured using a spectrophotometer SF-104 («Aquilon», Russia). It was established that mediators' reduction at a concentration lower than the Michaelis constant is the reaction of the first order and occurs by the mechanism of «ping-pong». Based on rate constants of mediators such as thionin, neutral red, 2.6-dichlorophenolindophenol, methylene blue, there was identified the most promising mediator for the D. hansenii yeast - neutral red, and G. oxydans bacteria - 2,6-dichlorophenolindophenol. Reduction rate constants of mediators were 0.018 ± 0.003 and 0.27 ± 0.03 dm3/(g×s), respectively.

By using EKSPERT-001-4.01 BOD thermooximeter (Ekoniks-ekspert, Russia) the kinetics of microorganisms reduction of the natural electron acceptor - oxygen was studes. It is found that the oxygen reduction is reaction of zero order. To establish the competitive mediator and the oxygen it was found the relative rate of the electron acceptors reduction by cells, resulting «mediator cells» systems was identified, in which the mediator competes well with the natural electron acceptor - oxygen, it allows to use such systems in bioelectrocatalysis without deaeration, substantially reducing operating costs of biosensors and biofuel cells.

It was investigated anodic oxidation of ferrocene mediator on carbon-paste electrode by cyclic voltammetry using the analyzer Ecotest-VA (Ekoniks-Expert, Russia). In spite of existence of anodic and cathodic peaks in the voltammogram, the oxidation of the mediator is irreversible. It is shown that a large difference in the rates of the forward and counter reactions caused significant anode over-voltage (more than 118 mV). From Tafel dependency was found transfer coefficient αna, oxidation of ferrocene, which amounted to 0.41 ± 0,01. After immobilization of microorganisms on the electrodes it was found that the electron transfer process is complicated by the irreversible chemical reaction and interaction between microorganisms and mediator that confirms bioelectrocatalysis.

These characteristics will allow purposefully choose a mediator of electron transport in the development of biosensors and biofuel cells.

This work was supported by by the grant of the Russian Foundation for Basic Research (contract № 16-48-710959 p_a) and Tula Region Government (contract DC/44) and the grant of the President of the Russian Federation (contract № 14.Z56.16.5425-MK).

On the basis of spectrophotometric and amperometric studies of the kinetics of mediators reduction and oxygen by micro-organisms and on the basis of the cyclic voltametrometrii data the following conclusions were made: 1. Based on rate constants of mediators such as thionin, neutral red, 2.6-dichlorophenolindophenol, methylene blue, there was identified the most promising mediator for the D. hansenii yeast - neutral red, and G. oxydans bacteria - 2,6-dichlorophenolindophenol. Reduction rate constants of mediators were 0.018 ± 0.003 and 0.27 ± 0.03 dm3/(g×s), respectively. 2. According to the relative rate of the electron acceptors it was shown that mediator reduction more than oxygen reduction rate. In such system the mediator successfully competes with oxygen, that property allows using of «mediator-cell» system for bioelectrocatalysis without de-aeration. 3. It was found that mediator electrode reaction on on carbon-paste electrode is irreversible, because of the difference of the cathode and anode of the transport coefficients of processes, which is typical for oxidative bioelectrocatalysis. After adsorption to the cell electrode shown that electron transfer mediator is complicated by the interaction of microorganisms with mediator, that indicating that microorganisms using of the oxidized form of the mediator as a substrate and an electron acceptor.

References:

1. Hu J., Gao G., Xia S. A Mediated BOD Microsensor Based on Poly (Neutral Red) and Bacteria Modified Interdigited Ultramicroelectrode Array // International journal of electrochemical science. 2016. V. 11. I. 7. P. 6387-6402. 2. A novel BOD biosensor based on entrapped activated sludge in a porous chitosan-albumin cryogel incorporated with graphene and methylene blue / Niyomdecha S. Limbut W., Numnuam A. et al. //Sensors and Actuators B: Chemical. 2017. V. 241.

P. 473-481. 3. Development of a mediated whole cell-based electrochemical biosensor for joint toxicity assessment of multi-pollutants using a mixed microbial consortium / G. Gao, J. Qiana, D. Fang et al. // Analytica chimica acta. 2016. V. 924. P. 21-28. 4. Hubenova Y., Mitov M. Extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cells: A review // Bioelectrochemistry. 2015. V. 106. P. 177-185.

Grant: This work was supported by by the grant of the Russian Foundation for Basic Research (contract № 16-48-710959 p_a) and Tula Region Government (contract DC/44) and the grant of the President of the Russian Federation (contract № 14.Z56.16.5425-MK).

.....

УДК: 577.15.1

ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ: ЭКСПРЕССИЯ В E.COLI, ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА

С.А.Зарубина, А.А.Пометун, С.С.Савин, В.И.Тишков

ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Россия, 109559, Москва, ул. Цимлянская, 16, innotech.msu@gmail.com, +7(495)514-7909

Ген формиатдегидрогезы из дрожжей Ogataea parapolymorpha (OpaFDH) был экспрессирован в клетках E.coli. Рекомбинантная OpaFDH была очищена и охарактеризована. Показано, что OpaFDH обладает высокими кинетическими параметрами и демонстрирует высокую температурную стабильность, уступая только FDH из бактерий Pseudomonas sp.101 и Staphylococcus aureus.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа, термотолерантные дрожжи, экспрессия в E.coli, каталитические свойства, очистка, температурная стабильность

Формиатдегидрогеназа (EC 1.2.1.2, FDH) широко используется в биокаталитических процессах для регенерации кофермента NADH или NADPH. Например, компания Degussa (Evonik) разработала процесс получения L-tert-лейцина с использованием FDH для регенерации NADH. Данный процесс вплоть до настоящего времени является самым крупномасштабным процессом хирального синтеза с использованием очищенных ферментов [1].

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования FDH из различных источников [2]. Недавно нами был клонирован ген новой NAD+-зависимой формиатдегидроненазы из термотолерантных метилотрофных дрожжей OgataeaparapolymorphaDL-1 (OpaFDH) (идентификатор в базе данных GenBank: GCA_000187245.3).

В рамках настоящей работы проведена экспрессия, очистка и функциональная характеристика wt-OpaFDH. Был достигнут выход целевого фермента более 1 г с литра среды. Были определены кинетические параметры. Температурная стабильность была изучена с помощью двух подходов: 1) по кинетике термоинактивации при различных температурах, концентрациях фосфатного буфера, значениях pH и 2) дифференциальной сканирующей калориметрии. Было показано, что OpaFDH имеет самые низкие значения констант Михаэлиса (KM) по обоим субстратам среди всех известных в настоящее время FDHиз бактерий и дрожжей. Фермент демонстрирует высокую температурную стабильность, уступая только FDH из бактерий Pseudomonassp.101 и Staphylococcusaureus.

Синтетический ген OpaFDHтакже был клонирован в работе [3]. Отличительной особенностью этого рекомбинантного фермента является наличие дополнительной последовательности из шести остатков гистидинов на C-конце. Сравнение полученных нами данных и результатов YuS. и соавторов [3] показало, что наличие гистидинов приводит к увеличению KM по NAD+ в 6 раз, уменьшает величины kcatв 2 раза и KMпо формиату в 2 раза. Поскольку наиболее важными параметрами для практического использования FDHявляются kcatи KM по NAD+, то фермент китайских авторов по своим свойствам значительно уступает наши препаратам OpaFDH.

В рамках настоящей работы проведена экспрессия, очистка и функциональная характеристика wt-OpaFDH. Показано, что OpaFDH обладает высокими кинетическими параметрами и демонстрирует высокую температурную стабильность, уступая только FDH из бактерий Pseudomonas sp.101 и Staphylococcus aureus.

Литература.
1. Bommarius A.S., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K., Drauz K. Synthesis and use of enantiometrically pure tert-leucine // Tetrahedron Asymm. 1995. Vol. 6, P. 2851–2888. 2. Tishkov V.I., Popov V.O. Protein engineering of formate dehydrogenase // Biomol Eng. 2006. Vol. 23, P. 89-110. 3. Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W. Promising properties of a formate dehydrogenase from a methanol-assimilating yeast Ogataea parapolymorpha DL-1 in His-tagged form // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. Vol. 98 N 4. P. 1621-1630.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 17-04-01469-а). Авторы выражают благодарность академику О.А. Донцовой за предоставление хромосомной ДНК O.parapolymorpha DL-1.

FORMATE DEHYDROGENASE FROM THE THERMOTOLERANT YEAST: EXPRESSION IN E.COLI, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

S.Zarubina, A.Pometun, S.Savin, V.Tishkov

Innovations and High Technologies MSU Ltd, Russian Federation, 109559, Moscow, Tsymlyanskya Str., 16

Gene of formate dehydrogenase from the yeast Ogataea parapolymorpha (OpaFDH) was expressed in E.coli. Recombinant OpaFDH was purified and characterized. OpaFDH showed high kinetic parameters and demonstrated high thermal stability which is comparable with FDHs from bacteria Pseudomonas sp.101 and Staphylococcus aureus.

Key words: formate dehydrogenase, thermotolerant yeast, expression in E.coli, kinetic properties, purification, thermal stability

Formate dehydrogenase (EC 1.2.1.2, FDH) is widely used for coenzyme regeneration of NADH or NADPH in different biocatalytic processes. Company Degussa (now Evonik) developed and introduced biocatalytic process of L-tert-leucine preparation with FDH reduced coenzyme regeneration. Till now this process if the is the largest scale process of chiral synthesis with purified enzymes till now [1].

The research in our laboratory is focused on the systematic study of formate dehydrogenases from different sources [2]. Recently the gene of a novel NAD+-dependent formate dehydrogenase from the thermotolerant methylotrophic yeast Ogataea parapolymorpha DL-1 was cloned (GenBank assembly accession: GCA_000187245.3).

In this work wild-type OpaFDH was overexpressed, purified and characterized. Kinetic parameters were determined. Thermal stability of enzyme was studied 1) through thermal inactivation kinetics at different temperatures, pH values, phosphate buffer concentrations and 2) with differential scanning calorimetry. OpaFDH showed the lowest values of Michaelis constants (KM) both for NAD+ and formate among all described FDHs from yeast and bacteria. The enzyme also demonstrated high thermal stability, which was lower only in comparison with the FDHs from bacteria Pseudomonas sp.101 and Staphylococcus aureus.

A synthetic gene of OpaFDH was also cloned in work [3]. Distinctive feature of this enzyme was a presence of additional six histidines at C-terminus of enzyme. Comparison of our data with results of Yu S. and co-workers shows that the presence of additional histidines results in increase of KM for NAD+ 6-fold, decrease of kcat 2-fold and decrease of KM for formate 2-fold.

In this work wild-type OpaFDH was overexpressed, purified and characterized. OpaFDH showed high kinetic parameters and demonstrated high thermal stability which is comparable with FDHs from bacteria Pseudomonas sp.101 and Staphylococcus aureus.

References:
1. Bommarius A.S., Schwarm M., Stingl K., Kottenhahn M., Huthmacher K., Drauz K. Synthesis and use of enantiometrically pure tert-leucine // Tetrahedron Asymm. 1995. Vol. 6, P. 2851–2888. 2. Tishkov V.I., Popov V.O. Protein engineering of formate dehydrogenase // Biomol Eng. 2006. Vol. 23, P. 89-110. 3. Yu S., Zhu L., Zhou C., An T., Zhang T., Jiang B., Mu W. Promising properties of a formate dehydrogenase from a methanol-assimilating yeast Ogataea parapolymorpha DL-1 in His-tagged form // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. Vol. 98 N 4. P. 1621-1630.

Grant: This work was supported by grant of Russian Foundation for Basic Research (grants 17-04-01469-a). Authors also express special thanks to Academician O.A. Dontsova for kind supplement of O.parapolymorpha DL-1chromosomal DNA.

УДК: 620.3, ББК: 52.81

ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ФАРМАКОКИНЕТИКУ НАНОЧАСТИЦ

И.В.Зелепукин[1], М.П.Никитин[2], П.И.Никитин[3], С.М.Деев[4]

[1]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; 2 – Московский физико-технический институт (Государственный университет), Долгопрудный, Россия, РФ, 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16\10, zelepukin@phystech.edu, 89163193850
[2]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия; 2 – Московский физико-технический институт (Государственный университет), Долгопрудный, Россия; 3 – Институт общей физики им А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия ,
[3]Институт общей физики им А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия ,
[4]Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

С использованием высокочувствительного метода количественной детекции магнитных наночастиц было изучено влияние различных факторов на поведение наноагентов в организме животного. С высоким разрешением по времени было показано изменение динамик циркуляции наночастиц в кровотоке после блокировки макрофагов организма. Было обнаружено значительное продление времени циркуляции наночастиц в кровотоке и изменение их биораспределения после осуществляемой блокировки.

Ключевые слова: наночастицы, фармакокинетика, магнитная детекция

В настоящее время различные наноагенты находят широкое применение в медицине и биотехнологии, как для диагностики различных заболеваний, таких как рак, так и для улучшения доставки лекарственных средств. Однако, часто наночастицы (НЧ), обладающие перспективными свойствами in vitro имеют плохой фармакокинетический профиль in vivo. [1] В данной работе с использованием высокочувствительного метода регистрации нелинейных магнитных материалов в реальном времени по их специфичному отклику на комбинаторных частотах (метод MPQ от англ. – magnetic particle quantification) [2] мы изучили, как различные факторы могут влиять на фармакокинетические параметры наночастиц: скорость их выведения из кровотока и биораспределение.

Нами были определены физико-химические свойства наночастиц и параметры их введения в кровоток, имеющие наибольшее влияние на фармакокинетику НЧ. Например, было показано, что крупные наночастицы быстрее малых выводятся из кровотока. Кроме того, мы обнаружили, что предварительное введение высоких доз частиц приводит к блокировке макрофагов и существенному увеличению времени циркуляции последующих вводимых малых доз наноагентов. Также было изучено влияние блокировки макрофагов на биораспределение наночастиц и обнаружено уменьшение их накопления в печени и увеличение их содержания в других органах для большинства изученных наноагентов.

Результаты исследования могут быть использованы для прогнозирования и улучшения фармакокинетических параметров диагностических или терапевтических наноагентов.

Литература.
1. Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery // Nature biotechnology, 2015. Vol.33 №9. P.941-951. 2. Никитин П.И., Ветошко П.М. Измеритель магнитной восприимчивости // Патент России № RU2177611, 2000.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда в рамках проектов №14-24-00106 (изучение биораспределения частиц) и № 16-19-00131 (изучение времени циркуляции частиц в кровотоке).

IDENTIFICATION OF FACTORS CONTROLLING NANOPARTICLES PHARMACOKINETIC

I.Zelepukin[1], M.Nikitin [2], P.Nikitin[3], S.Deyev[4]

[1]M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; 2 – Moscow Institute of Physics & Technology, Dolgoprudny, Russia, Russia, 117997, Moscow, Mikluho-Maklaya , 16\10
[2]M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; 2 – Moscow Institute of Physics & Technology, Dolgoprudny, Russia; 3 – Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia ,
[3]Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia ,
[4]M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia ,

Using a highly sensitive magnetic particle quantification (MPQ) technique, we investigated the influence of various factors on in vivo behavior of nanoagents. We showed with high temporal resolution the changes in nanoparticle

blood circulation dynamics upon blockade of macrophages, which significantly prolongs nanoparticle circulation in blood and alters their biodistribution.

Key words: nanoparticles, pharmacokinetics, magnetic detection

Nowadays, various types of nanoagents are widely used in medicine and biotechnology, for example, for enhancing diagnosis of various diseases such as cancer as well as for advanced drug delivery. However, often nanoparticles (NPs) with promising properties in vitro have inadequate pharmacokinetic profile in vivo. [1] Here, using a highly sensitive MPQ technique that features high temporal resolution of magnetic particle detection on combinatorial frequencies [2], we investigated the influence of different factors on pharmacokinetic properties of nanoparticles: their biodistribution and rate of elimination from the bloodstream.

We identified the physic-chemical properties of nanoparticles as well as the administration parameters that have the most significant effect on pharmacokinetics of nanoparticles. Specifically we have shown the faster elimination of larger NPs from the bloodstream. In addition, we showed that injection of large doses of nanoagents blocks the macrophages and eventually leads to significant prolongation of the subsequently administered doses of NPs. Biodistribution changes after macrophage blockade were also investigated. Reduced accumulation in liver and increased quantity in other organs were observed for the majority of the studied particles.

The results of the study could be used for prediction and improvement of pharmacokinetic parameters of nanoagents with diagnostic or therapeutic functions.

References:
1. Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery // Nature biotechnology, 2015. Vol.33 №9. P.941-951. 2. Nikitin P. I., Vetoshko P. M. Meter of magnetic susceptibility. Russian patent no. RU2177611, 2000.

Grant: The work was supported by the Russian Science Foundation grants №14-24-00106 (biodistribution studies) и № 16-19-00131 (blood circulation studies)

.....

УДК: 663.253.41, ББК:

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ УГЛЕРОДА 13С/12С В ВИНОГРАДЕ (VITIS VINIFERA L.), ПРОИЗРАСТАЮЩЕМ В ЮЖНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ РЕГИОНАХ РОССИИ, И ЭТАНОЛЕ, ОБРАЗУЮЩЕМСЯ В ХОДЕ БРОЖЕНИЯ ВИНОГРАДНЫХ УГЛЕВОДОВ

М.А.Зенина[1], А. .Колеснов [2], .И.Гугучкина[3], М.В.Антоненко [4], А.В.Прах [5]

[1]Лаборатория фундаментальных и прикладных исследований качества и технологий пищевых продуктов (ПНИЛ) Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра) Российского университета дружбы народов (РУДН), Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8/2, zenina-r@mail.ru, 89163745187
[2]Лаборатория фундаментальных и прикладных исследований качества и технологий пищевых продуктов (ПНИЛ) Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра) Российского университета дружбы народов (РУДН), Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8/2, zenina-r@mail.ru, +7 (495) 787-38-03
[3]Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства (СКЗНИИСиВ), Россия, 350901, Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39, guguchkina@mail.ru, +7 (861) 257-57-04
[4]Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства (СКЗНИИСиВ), Россия, 350901, Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39, antonenko84@bk.ru, 89163745187
[5]Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства (СКЗНИИСиВ), Россия, 350901, Краснодар, ул. им. 40-летия Победы, 39, aprakh@yandex.ru, 89163745187

Получены научные знания об особенностях биологического фракционирования стабильных изотопов углерода в углеводах зрелых ягод красного винограда сорта «Каберне Совиньон», произрастающего в четырёх районах Краснодарского края. Исследованы изменения состава изотопов углерода в этаноле, происходящие при сбраживании виноградных углеводов.

Ключевые слова: виноград; углеводы; сухой виноматериал; этанол; стабильные изотопы углерода; масс-спектрометрия изотопных отношений; IRMS/SIRA

Целью научно-исследовательской работы являлось изучение особенностей биологическогофракционирования стабильных изотопов углерода 13C/12C в углеводах красного винограда сорта «Каберне Совиньон» (урожай 2016 года), произрастающего в южных климатических условиях четырёх районов Краснодарского края, а также исследование состава изотопов углерода в сухих виноматериалах. Исследования проводили с использованием метода масс-спектрометрии изотопных отношений в потоке гелия (метод IRMS/SIRA) на аналитическом комплексе Лаборатории фундаментальных и прикладных исследований качества и технологий пищевых продуктов (ПНИЛ) ЦКП (НОЦ) РУДН на образцах виноградного сусла и сухих виноматериалов, полученных в СКЗНИИСиВ из образцов зрелого винограда. Для исследования состава изотопов углерода 13C/12C в виноградных углеводах последние предварительно выделяли из сусла и подвергали очистке физико-химическим способом, описанным в [1]. Состав изотопов углерода в этаноле сухих виноматериалов исследовали после его выделения дистилляцией согласно условиям метода IRMS/SIRA. Результаты НИР показали, что уровень биологического фракционирования изотопов углерода 13C/12C, характеризуемый показателем δ13CVPDB, в углеводах зрелого винограда варьирует от -27,27 до -22,77 ‰. При этом углеводы двух образцов винограда из ряда районов Краснодарского края были обогащены «тяжёлым» изотопом углерода 13C (δ13CVPDB = -22,77 ‰ и δ13CVPDB = -23,10 ‰), что указывает на условия водного дефицита, вызванного незначительным количеством атмосферных осадков и отсутствием искусственного орошения виноградников. Установлено, что водный дефицит влияет на качество изотопного обмена между растением и окружающей средой через частичное снижение интенсивности транспирации и фотосинтеза, который в винограде протекает по циклу Кальвина. Водный дефицит приводит к обогащению компонентов винограда, например, углеводов, «тяжёлыми» изотопами углерода 13C. Значения показателя δ13CVPDB для этанола сухих виноматериалов лежат в интервале от -29,06 до -24,96 ‰, что на 1,8-3,2 ‰ меньше уровня δ13CVPDB углеводов сусел, из которых были изготовлены данные виноматериалы. Полученные результаты указывают на неэквивалентность уровней обогащения изотопом углерода 13C молекул виноградных углеводов и образовавшихся из них при брожении молекул этанола.

Результаты НИР впервые представляют научные сведения о составе изотопов углерода в углеводах винограда сорта «Каберне Совиньон», произрастающего в четырёх географических районах Краснодарского края, дополняют базу научных знаний об особенностях фракционирования изотопов углерода в растениях группы С3-пути фотосинтеза, а также коррелируют с результатами зарубежных исследований, например, [2-3].

Литература.
1. ГОСТ 31714-2012 «Соки и соковая продукция. Идентификация. Определение стабильных изотопов углерода методом масс-спектрометрии». 2. Rossmann A., Schmidt, H.-L., Reniero, F., Versini, G., Moussa, I., Merle, M.H. Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany // Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung, 1996.- vol. 203.- P. 293-301. 3. Van Leeuwen C., Tregoat O., Choné X., Bois B., Pernet D., Gaudillère J.-P. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? // Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 2009.- vol. 43.- № 3.- P. 121-134.

PECULIARITIES OF BIOLOGICAL FRACTIONATION OF STABLE CARBON ISOTOPES 13C/12C IN GRAPES (VITIS VINIFERA L.), GROWING IN SOUTHERN CLIMATIC REGIONS OF RUSSIA, AND ETHANOL PRODUCED BY FERMENTATION OF GRAPE'S CARBOHYDRATES

M.Zenina[1], A.Kolesnov[2], T.Guguchkina[3], M.Antonenko[4], A.Prah[5]

[1]Russian University of Peoples' Friendship (RUDN), Russia, 117198, Moscow, Mikluho-Maklaya, 8/2
[2]Russian University of Peoples' Friendship (RUDN), Russia, 117198, Moscow, Mikluho-Maklaya, 8/2
[3]North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture (SKZNIISiV), Russia, 350901, Krasnodar, 40-letiya Victory , 39
[4]North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture (SKZNIISiV), Russia, 350901, Krasnodar, 40-letiya Victory , 39
[5]North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture (SKZNIISiV), Russia, 350901, Krasnodar, 40-letiya Victory , 39

New knowledges about the peculiarities of biological fractionation of stable carbon isotopes in carbohydrates of

the grape variety «Cabernet Sauvignon», grown in the four districts of the Krasnodar region, were obtained within the scientific study. The changes in the composition of the carbon isotopes in ethanol, derived by the fermentation of grape carbohydrates, were studied.

Key words: grapes; carbohydrates; dry wine; ethanol; stable carbon isotopes; isotope ratio mass spectrometry; IRMS/SIRA

The purpose of the scientific research was to study the peculiarities of the biological fractionation of stable carbon isotopes 13C/12Cin carbohydrates of red grape variety «Cabernet Sauvignon» (vintage 2016), which grows in four southern climates districts of the Krasnodar region, and also in its processed products - dry wines.The research was conducted using the mass spectrometry IRMS/SIRA method for measuring of isotope ratios in continuous helium flow by using the analytical equipment of the Research Laboratory of Food Quality & Technology (PNIL) of Scientific & Research Center of the People's Friendship University (RUDN) in samples of musts and dry wines obtained in North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture (SKZNIISiV)from mature grapes. Grape's carbohydrates were previously isolated from musts and purified by physical-chemical method described in [1] in order to study the composition of carbon isotopes 13C/12C. The composition of the carbon isotopes in ethanol of dry wines was measured after separation by distillation according to the conditions of the IRMS/SIRA method. The results of the show as that the level of biological fractionation of the 13C/12Ccarbon isotopes 13C/12C, which is characterized by the δ13CVPDB value, in carbohydrates of mature grapes ranges from -27.27 to -22.77 ‰. At the same time carbohydrates of two grape samples were enriched by «heavy» carbon isotope 13C (δ13CVPDB = -22,77 ‰ and δ13CVPDB = -23,10 ‰), that indicates the conditions of the water deficit caused by a minor amount of rainfall and absence of the irrigation of the vineyards. It is found that water deficit affects the quality of the isotopic exchange between plants and environment through the partial reduction of the intensity of transpiration and photosynthesis that occurs in grapes according to the Calvin's cycle. The water deficit leads to the enrichment of grape components, such as carbohydrates, by «heavy» carbon isotope 13C. The δ13CVPDB values of ethanol from dry wines range from -29,06 to -24,96 ‰. They are 1,8-3,2 ‰ less than the δ13CVPDB value of carbohydrates in musts, from which the studied dry wines are obtained. The study indicates non-equivalence of 13C enrichment levels of molecules of grape carbohydrates and ethanol produced from them by a fermentation.

The results of the study provide for the first time the scientific information about the composition of the carbon isotopes in carbohydrates of grapes of the Cabernet Sauvignon variety, which grows in four geographical areas of the Krasnodar region, and can supplement the base of scientific knowledge about peculiarities of the biological fractionation of carbon isotopes in plants of the C3-pathway of photosynthesis and also they correlate well with the results from international studies [e.g. 2-3].

References:
1. GOST 31714-2012 «Juices and juice products. Identification. Determination of stable carbon isotopes by mass spectrometry». 2. Rossmann A., Schmidt, H.-L., Reniero, F., Versini, G., Moussa, I., Merle, M.H. Stablecarbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany // Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung, 1996.- vol. 203.- P. 293-301. 3. Van Leeuwen C., Tregoat O., Choné X., Bois B., Pernet D., Gaudillère J.-P. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? // Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 2009.- vol. 43.- № 3.- P. 121-134.

УДК: 616.832-001, ББК: 56.12

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННОЙ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА У КРЫС

А.А.Измайлов, М.Е.Соколов, Ф.О.Фадеев, В.А.Маркосян, М.С.Кузнецов, А.Н.Лисюков, Р.Р.Гарифулин

Казанский государственный медицинский университет, Российская Федерация, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49, gostev.andrei@mail.ru, +79503223976

В настоящем исследования для стимулирования нейрорегенерации после контузионной травмы спинного мозга у крыс аденовирусные векторы, несущие терапевтические гены, были доставлены в спинной мозг непосредственно (прямая генная терапия), или на клеточных носителях — мононуклеарных клетках крови пуповины человека (клеточно-опосредованная генная терапия) — с помощью интратекальной инъекции. Животные были разделены на семь экспериментальных групп: 0,9% NaCl группа — после моделирования контузионной травмы интратекально вводили физиологический раствор (n = 4); Ad-GFP группа — аденовирусы, несущие зелёный флуоресцентный белок GFP

(n = 8); Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM группа — аденовирусы, несущие терапевтические гены VEGF, GDNF и NCAM (n = 5); Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM группа — аденовирусы, несущие VEGF, Angiogenin, NCAM (n = 4); МККП+Ad-GFP группа — мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные Ad-GFP (n = 6); МККП+Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM группа — мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM (n = 6); МККП+Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM группа — мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM (n = 7). Положительный терапевтический эффект установлен, как при прямой генной терапии, так и клеточно-опосредованной генной терапии при проведении поведенческих тестов, электрофизиологических исследований, иммунофлуоресцентного анализа экспрессии терапевтических генов, морфометрического метода оценки сохранности серого и белого вещества, иммунотипирования мотонейронов, астроцитов, олигодендроцитов и клеток микроглии.

Ключевые слова: мононуклеарные клетки крови пуповины, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), нейрональная молекула адгезии (NCAM), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), ангиогенин, травма спинного мозга.

Введение. Неспособность ЦНС к полноценному восстановлению после травматического повреждения, ишемии, при нейродегенеративных и демиелинизирующих заболеваниях диктует необходимость поиска новых эффективных подходов к их лечению. В настоящем исследования для стимулирования нейрорегенерации после контузионной травмы спинного мозга у крыс аденовирусные векторы, несущие терапевтические гены, были доставлены в спинной мозг непосредственно (прямая генная терапия), или на клеточных носителях — мононуклеарных клетках крови пуповины человека (клеточно-опосредованная генная терапия) — с помощью интратекальной инъекции.

Материалы и методы. Для доставки терапевтических генов были созданы рекомбинантные репликативно-дефектные вирусные векторы на базе аденовируса человека 5 серотипа (Ad5), кодирующих: ген зелёного флюоресцирующего белка (Ad5-GFP); ген ангиогенина человека (Ad5-ANG); ген нейрональной молекулы адгезии (Ad5-NCAM); ген сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad5-VEGF); ген глиального нейротрофического фактора (Ad5-GDNF).

Полученные аденовирусные векторы были использованы для прямой генной терапии и для генетической модификации мононуклеарных клеток крови пуповины человека (МККП). В результате трансдукции МККП аденовирусами в различных комбинациях были созданы следующие генно-клеточные конструкции: МККП+Ad5-GFP; МККП+ Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM; МККП+ Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-NCAM.

Животные были разделены на семь экспериментальных групп: 0,9% NaCl группа — после моделирования контузионной травмы интратекально вводили физиологический раствор (n = 4); Ad-GFP группа — аденовирусы, несущие зелёный флуоресцентный белок GFP (n = 8); Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM группа — аденовирусы, несущие терапевтические гены VEGF, GDNF и NCAM (n = 5); Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM группа — аденовирусы, несущие VEGF, Angiogenin, NCAM (n = 4); МККП+Ad-GFP группа — мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные Ad-GFP (n = 6); МККП+Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM группа — мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM (n = 6); МККП+Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM группа — мононуклеарные клетки крови пуповины человека, трансдуцированные Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM (n = 7).

Результаты. Терапевтическая эффективность прямой генной терапии и клеточно-опосредованной терапии при различных сочетаниях терапевтических генов установлена с помощью поведенческих тестов (BBB и Ротарод). На 30 сутки эксперимента положительный действие терапии выявлено во всех терапевтических группах: Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM, МККП+Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM, Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM, МККП+Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM, при сравнении с контролем (0,9% NaCl), $p<0,05$.

При магнитной стимуляции шейно-грудного отдела спинного мозга уровень порога возникновения моторного ответа в группах МККП+Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM и МККП+Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM приближается к значениям интактных животных и отличается от значений контрольной группы (0,9% NaCl) с уровнем значимости $p<0,05$.

В настоящем исследовании с помощью иммунофлуоресцентного метода получены результаты иммуноэкспрессии белков-маркёров нервных клеток и клеток нейроглии на 30 сутки эксперимента, свидетельствующие о снижении количества реактивных астроцитов, экспрессирущих GFAP и виментин, об увеличении количества миелинобразующих клеток и их предшественников, экспрессирующих белки OSP, Olig2 и NG2, о повышении флуоресцентной плотности белка Cx47 щелевых контактов между астроцитами и олигодендритами, об уменьшении реактивного микроглиоза после прямой и клеточно-опосредованной терапии. В зоне локализации мотонейронов в вентральных рогах обнаружено снижение экспрессии белка теплого шока Hsp27 и увеличение

белков синаптической пластичности/контактов (PSD95, synaptophysin). По данным критериям генно-клеточные конструкции МККП+Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM и МККП+Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM имели преимущество над прямой генной терапией в группах Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM и Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM.

Через 30 суток после нейротрансплантации в спинном мозге крыс группы МККП+Ad-VEGF+Ad-ANG+Ad-NCAM были обнаружены HuAN -позитивные клетки, экспрессирующие VEGF, ANG и NCAM, а в группе МККП+Ad-VEGF+Ad-GDNF+Ad-NCAM были выявлены МККП, экспрессирующие VEGF, GDNF и NCAM.

Положительный терапевтический эффект установлен, как при прямой генной терапии, так и клеточно-опосредованной генной терапии. Однако генетически модифицированные МККП показали более значимые результаты по восстановлению двигательных функций и стимулированию регенерации спинного мозга.

Литература.
1. Мухамедьяров М.А., Ризванов А.А., Сафиуллов З.З., Измайлов А.А. Анализ эффективности генно-клеточной терапии у трансгенных мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза// Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2012. – № 4. – С. 215-219. 2. Мухамедшина Я.О., Соловьева В.В., Салафутдинов И.И., Черенкова Е.Е., Федотова В.Ю., Сафиуллов З.З., Измайлов А.А. Анализ экспрессии рекомбинантного гена vegf генетически модифицированными мононуклеарными клетками пуповинной крови в эксперименте in vivo// Гены и клетки. – 2012. – Т. 7. № 3. – С. 130-134. 3. Исламов Р.Р., Ризванов А.А., Черенкова Е.Е., Мухамедшина Я.О., Салафутдинов И.И., Сафиуллов З.З., Измайлов А.А. Исследование экспрессии рекомбинантных терапевтических генов в мононуклеарных клетках крови пуповины, трансдуцированных тремя аденовирусными векторами, кодирующими нейротрофические факторы GDNF и VEGF и молекулу нейрональной адгезии NCAM// Гены и клетки. – 2014. – Т. IX. № 3. – С. 35-39. 4. Islamov R.R., Mukhamedyarov M.A., Safiullov Z.Z., Izmailov A.A. Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of human umbilical cord blood cells genetically modified with adenoviral vectors expressing a neuro-protective factor and a neural cell adhesion molecule // Current Gene Therapy. 2015. T. 15. № 2. C. 266-276.

Финансирование: Данная работы была поддержана грантом Российского Научного Фонда №16-15-00010.

PRECLINICAL TRIAL OF GENE-CELL THERAPY FOR SPINAL CORD INJURY IN RATS

A.Izmailov, .Sokolov, F.Fadeev, V.Markosyan, M.Kuznecov, A.Lisucov, R.Garifulin

Kazan State Medical University, Russian Federation, 420012, Kazan, Butlerova street, 49

In this study adenoviral vectors carrying therapeutic genes were delivered naturally (direct gene therapy) or based on human umbilical cord blood mononuclear cells (cell-mediated gene therapy) via intrathecal injection were used for stimulation of neuroregeneration in rat model of spinal cord injury. According to the injected substances the animals were divided into seven experimental groups: 0,9% NaCl group – saline (n = 4); Ad-GFP group – adenoviruses encoding green fluorescent protein GFP (n = 8); Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM group – adenoviruses encoding VEGF, GDNF and NCAM (n = 5); Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM group – adenoviruses encoding VEGF, Angiogenin, NCAM (n = 4); UCBMC + Ad-GFP group – human umbilical cord blood mononuclear cells transduced with Ad-GFP (n = 6); UCBMC + Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM group – human umbilical cord blood mononuclear cells transduced with Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM (n = 6); UCBMC + Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM group – human umbilical cord blood mononuclear cells transduced with Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM (n = 7). The positive therapeutic effect was shown both in the direct gene therapy and in the cell-mediated gene therapy by behavioral tests; electrophysiological study following the electrical stimulation of the sciatic nerve and magnetic stimulation of the cervical-thoracic spinal cord; immunofluorescent analysis of motor neurons, glial cells (astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells), transplanted UCBMC and therapeutic genes expression; morphometric evaluation of grey and white matter preservation.

Key words: human umbilical cord blood mononuclear cells, vascular endothelial growth factor (VEGF), neural cell adhesion molecule (NCAM), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), angiogenin, spinal cord injury.

Introduction. The inability of the central nervous system to a sufficient recovery from traumatic injury, ischemia, in neurodegenerative and demyelinating diseases necessitates the search for new effective approaches to their treatment. In this study adenoviral vectors carrying therapeutic genes were delivered naturally (direct gene therapy) or based on human umbilical cord blood mononuclear cells (cell-mediated gene therapy) via intrathecal injection were used for stimulation of neuroregeneration in rat model of spinal cord injury.

Materials and methods. For the therapeutic genes delivery recombinant replication-defective viral vectors were created based on the human adenovirus serotype 5 (Ad5) carrying the following genes: Green fluorescent protein gene (Ad5-GFP); Human angiogenin gene (Ad5-ANG); Neural cell adhesion molecule gene (Ad5-NCAM); Vascular endothelial growth factor gene (VEGF-Ad5); Glial-derived neurotrophic factor gene (Ad5-GDNF).

The adenoviral vectors were used for the genetic modification of human umbilical cord blood mononuclear cells (UCBMC). As a result of UCBMC transduction with adenoviruses in various combinations following gene-cell constructs were created: UCBMC +Ad5-GFP; UCBMC + Ad5-VEGF+Ad5-GDNF+Ad5-NCAM; UCBMC + Ad5-VEGF+Ad5-ANG+Ad5-NCAM.

The therapeutic efficacy of the recombinant genes tandems and gene-cell constructs was evaluated on animal model with dosage contusion injury of spinal cord at T8-T9 level.

During four hours after surgery rats were injected intrathecally with: (1) 20 ul of saline; (2) 2 × 107 virus particles in 20 ul of saline; (3) human umbilical cord blood mononuclear cells transduced with adenoviral vectors (2 million cells in 20 ul of saline). According to the injected substances the animals were divided into seven experimental groups: 0,9% NaCl group – saline (n = 4); Ad-GFP group – adenoviruses encoding green fluorescent protein GFP (n = 8); Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM group – adenoviruses encoding VEGF, GDNF and NCAM (n = 5); Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM group – adenoviruses encoding VEGF, Angiogenin, NCAM (n = 4); UCBMC + Ad-GFP group – human umbilical cord blood mononuclear cells transduced with Ad-GFP (n = 6); UCBMC + Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM group – human umbilical cord blood mononuclear cells transduced with Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM (n = 6); UCBMC + Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM group – human umbilical cord blood mononuclear cells transduced with Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM (n = 7).

Results. The therapeutic efficacy of direct gene therapy and cell-mediated gene therapy with various combinations of recombinant genes was evaluated using behavioral tests (BBB and Rotarod). On 30th day of the experiment the positive effect of gene therapy was revealed in all therapeutic groups: Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM, UCBMC+ Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM, Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad -NCAM,UCBMC+ Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM in compare with control (0,9% NaCl), $p < 0,05$.

At magnetic stimulation of the cervical-thoracic spinal cord the threshold of motor response in groups UCBMC + Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM and UCBMC + Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM returned to the values of intact animals and was different from the control group (0,9% NaCl) with $p < 0,05$.

Immunofluorescent analysis of motor neurons and neuroglia proteins markers 30 days after SCI have found: a decrease in the number of reactive astrocytes expressing GFAP and vimentin; an increase the number of myelin producing cells and their progenitors expressing OSP, Olig2 and NG2; an increase in the density of fluorescent protein Cx47 (gap junctions between astrocytes and oligodendrites); a reduction of reactive microgliosis after direct and cell-mediated gene therapy. The reduced of heat shock protein Hsp27 immunoexpression and increased immunoexpression of synaptic plasticity/contacts (PSD95, synaptophysin) proteins were discovered in the motor neurons of ventral horns. According to these criteria the cell-gene structures UCBMC + Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM and UCBMC + Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM had an advantage over the direct gene therapy in groups Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM and Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM.

HuAN-positive cells expressing VEGF, ANG and NCAM were detected in spinal cord of rats in group UCBMC+ Ad-VEGF + Ad-ANG + Ad-NCAM and VEGF, GDNF and NCAM were identified in group UCBMC+ Ad-VEGF + Ad-GDNF + Ad-NCAM on 30th days after neurotransplantation.

The positive therapeutic effect was shown both in the direct gene therapy and in the cell-mediated gene therapy. However, genetically modified UCBMC showed more significant stimulating effect on spinal cord regeneration.

References:

1. Muhamedyarov M.A., Rizvanov A.A., Safiullov Z.Z., Izmaylov A.A. Analiz effektivnosti genno-kletochnoy terapii u transgennyih myishey s fenotipom bokovogo amiotroficheskogo skleroza// Kletochnyie tehnologii v biologii i meditsine. – 2012. – # 4. – S. 215-219. 2. Muhamedshina Ya.O., Soloveva V.V., Salafutdinov I.I., Cherenkova E.E., Fedotova V.Yu., Safiullov Z.Z., Izmaylov A.A. Analiz ekspressii rekombinantnogo gena vegf geneticheski modifitsirovannyimi mononuklearnyimi kletkami pupovinnoy krovi v eksperimente in vivo// Genyi i kletki. – 2012. – T. 7. # 3. – S. 130-134. 3. Islamov R.R., Rizvanov A.A., Cherenkova E.E., Muhamedshina Ya.O., Salafutdinov I.I., Safiullov Z.Z., Izmaylov A.A. Issledovanie ekspressii rekombinantnyih terapevticheskih genov v mononuklearnyih kletkah krovi pupovinyi, transdutsirovannyih tremya adenovirusnyimi vektorami, kodiruyuschimi neyrotroficheskie faktoryi GDNF i VEGF i molekulu neyronalnoy adgezii NCAM// Genyi i kletki. – 2014. – T. IX. # 3. – S. 35-39. 4. Islamov R.R., Mukhamedyarov M.A., Safiullov Z.Z., Izmailov A.A. Symptomatic improvement, increased life-span and sustained cell homing in amyotrophic lateral sclerosis after transplantation of human umbilical cord blood cells genetically modified with adenoviral vectors expressing a neuro-protective factor and a neural cell adhesion molecule // Current Gene Therapy. 2015. T. 15. № 2. C. 266-276.

УДК: УДК [581.557+577.355]:635.65-152, ББК:

ИЗУЧЕНИЕ ФОТОЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И СИМБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛОВ ЗЕРНОБОБОВЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ СОЗДАНИЯ АДАПТИВНЫХ СОРТОВ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЯЮЩЕГОСЯ КЛИМАТА

И.Г.Кадермас, Н.А.Поползухина

Омский государственный агарарный университ им. П.А. Столыпина, Россия, 644008, Омск, Институтская площадь, 1, kadermasirina@mail.ru, 8-965-976-7696

На основе многолетних исследований выделены сортообразцы с высокой фото-энергетической и симбиотической эффективностью, формирующие стабильную урожайность зерна и сбор белка с гектара. Выделен адаптивный сортообразец Л 37/03 (Омский 18), который успешно проходит Государственное сортоиспытание.

Ключевые слова: горох посевной, фотосинтез, симбиотическая азотфиксация, адаптивность

В условиях импортозамещения производство высококачественной сельскохозяйственной продукции является приоритетным. Однако сохранение почвенного плодородия, поддержание экологической чистоты, ресурсосбережение являются главными задачами отрасли растениеводства 21 века. Для достижения данных целей необходимо усиливать биологическое земледелие. Таким образом, для дальнейшего прогресса сельского хозяйства следует искать селекционные источники, которые способны реализовывать свой биологический, а именно, фотоэнергетический потенциал.

По мнению А.А. Жученко, повышение эффективности использования неисчерпаемых ресурсов – солнечной радиации через управление фотосинтезом, позволит создать не только эффективное, но и адаптивное земледелие [1].

Зернобобовые культуры являются одним из основных источников полноценного растительного белка, при этом они обладают значительной средообразующей функцией, способны произрастать в разных климатических и вступать в симбиотические отношения с клубеньковыми бактериями, которые фиксируют азот воздуха. Западно-Сибирский регион обладает резко континентальным климатом, в последние годы наблюдается повышение среднесуточных температур воздуха, а также превышение нормы осадков.

В связи с этим необходимо создание сортов зернобобовых культур с высокими интегральными показателями фотосинтеза и симбиотической эффективностью для дальнейшего использования в условиях региона.

Исследования проводились на полях лаборатории селекции зернобобовых культур ФГБНУ СибНИИСХ в 2010 – 2012 гг. в четырехкратной повторности.

В качестве объекта исследований использовали 5 сортообразцов гороха посевного: Омский 9, Омский 7, Благовест, Демос, Л 37/03.

Выявлено, что величина фотосинтетического аппарата растений гороха в значительной мере определяется морфобиологическими особенностями генотипов и гидротермическими условиями выращивания. Наибольшая величина фотосинтетического потенциала отмечена у сорта Омский 7 и линии Л 37/03, причем последняя характеризовалась стабильной работой ассимиляционного аппарата и продолжительной сохранностью листьев.

В целом наиболее мощный фотосинтетический аппарат у растений гороха сформировался в условиях 2010 года, наибольшей его величиной и эффективностью характеризовались сортообразцы Демос, Л 37/03, Омский 7.

В результате исследований, кроме фотосинтетических показателей, определена эффективность симбиотической азотфиксации, а также вклад этих процессов в продуктивность гороха посевного.

Установлена высокодостоверная положительная связь между продуктивностью растений и фотосинтетическими показателями (r= +0,97 с площадью листьев; r= +0,84 с ФП; r= +0,52 с ЧПФ), а также с признаками клубенькообразования (r= +0,96 – с количеством клубеньков; r = +0,54 – с массой клубеньков).

В результате проведенных исследований выделена линия Л 37/03, которая характеризуется комплексом хозяйственно-ценных признаков, симбиотических и фотосинтетических показателей. С 2013 г. она под названием «сорт Омский 18» успешно проходит Государственное сортоиспытание [2].

В результате проведенных исследований выделена линия Л 37/03, которая характеризуется комплексом хозяйственно-ценных признаков, симбиотических и фотосинтетических показателей. С 2013 г. она под названием «сорт Омский 18» успешно проходит Государственное сортоиспытание.

Литература.
1.Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические и экономические основы) // Селекция и семеноводство сельскохозяйственных куль-тур в России в рыночных условиях. – М.: ЭкоНива, 2001. – С. 52–61. 2. Поползухина Н.А., Озякова Е.Н., Кадермас И.Г., Асанов А.М. Оценка симбио-тической и фотосинтетической эффективности зернобобовых культур в различ-ных агроэкологических условиях // Труды Кубанского государственного аграрно-го университета. – 2016. – № 3. – С. 223-231

STUDY PHOTOVOLTAIC AND SYMBIOTIC POTENTIAL LEGUMES TO CREATE ADAPTIVE VARIETIES IN A CHANGING CLIMATE

I.Kadermas, N.Popolzuhina

Omsk State Agrarian University named after P.A Stolypin, Russia, 644008, Omsk, Institutskay ploshad, 1

Based on years of research highlighted accessions with high photoenergy and symbiotic efficiency of forming a stable grain yield and protein collection per hectare. Isolated фdaptive sortoobrazets L 37/03 (Omsk 18), which passes the state variety testing
Key words: pea, photosynthesis, symbiotic nitrogen fixation, adaptability

In terms of import substitution production of high quality agricultural products is a priority. However, the preservation of soil fertility, maintenance of environmental cleanliness, resource conservation are the main tasks of the plant growing branch of the 21st century. In order to achieve biological farming is necessary to strengthen these objectives. Thus, we look for sources of selection, which are capable of realizing their biology, namely, photovoltaic potential for further progress of agriculture.

According to A.A Zhuchenko, more efficient use of inexhaustible resources - solar radiation management through photosynthesis, will create not only effective, but also adaptable farming [1].

Legumes are a major source of high-grade vegetable protein, and they have significant habitat functions, able to grow in different climatic and enter into a symbiotic relationship with rhizobia, which fix nitrogen from the air. West Siberian region has sharply continental climate, in recent years there has been an increase of daily average air temperatures and above normal precipitation.

In this regard, it is necessary the creation of varieties of legumes with high performance integrated photosynthesis and symbiotic efficiency for further use in the region.

Studies conducted on laboratory breeding crop legumes FGBNU SibNIISKH in 2010 – 2012 years in four replications.

As an object of research used 5 accessions of pea: Omsk 9, Omsk 7, Blagovest, Demos, L 37/03.

It was found that the value of the photosynthetic apparatus of pea plants is largely determined morfobiologichesky features genotypes and hydrothermal conditions of cultivation. The greatest value of photosynthetic potential was observed in grade Omsk 7 and line L 37/03, the latter characterized by stable performance and long-term assimilation apparatus safety leaves.

In general, the most powerful in the photosynthetic apparatus of pea plants was formed under the conditions of 2010, most of its value and effectiveness of accessions characterized Demos, L 37/03, Omsk 7.

As a result of investigations, in addition to the photosynthetic parameters, determined the effectiveness of symbiotic nitrogen fixation, as well as the contribution of these processes in the productivity of pea seed.

Very close established a positive relationship between the productivity of plants and photosynthetic performance (r = +0,97 area with leaves; r = +0,84 FP; r = +0,52 with CHPF), as well as signs of klubenkoobrazovaniya (r = +0 96 - to the number of nodules; r = +0,54 - weighing nodules).

The studies highlighted line L 37/03, which is characterized by complex agronomic traits, symbiotic and photosynthetic parameters. Since 2013, she called «Omsk 18» has successfully passed the State Cultivar Tests [2].

The studies highlighted line L 37/03, which is characterized by complex agronomic traits, symbiotic and photosynthetic parameters. Since 2013, she called «Omsk 18» has successfully passed the State Cultivar Tests.

References:
1. Zhuchenko A.A. Adaptive plant breeding (genetic and ecological and economic ba-sis)// Selection and seed crops in Russia in market conditions. – M.: EcoNiva, 2001. – P. 52–61. 2. Popolzuhina N.A., Ozyakova E.N., Kadermas I.G., Asanov A.M. Evaluation of sym-biotic and photosynthetic efficiency of leguminous crops in different agro-ecological conditions // Proceedings of the Kuban State Agrarian University. –2016. – № 3. – P. 223–231

УДК: 602.4:547.455.623:007.573.6, ББК: 24.46/48

БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ПЕЧАТНОГО ЭЛЕКТРОДА, МОДИФИЦИРОВАННОГО БАКТЕРИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ, ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ В ПРОВОДЯЩИЙ БЕЛКОВЫЙ ГИДРОГЕЛЬ

С.С.Каманин, В.А.Арляпов

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Россия, 300012, Тула, пр-т Ленина, 92, s.s.kamanin@gmail.com, +79534216868

Графитовые печатные электроды модифицировали проводящим белковым гидрогелем, содержащим бактериальные клетки Gluconobacter oxydans и использовали как основу биосенсора для определения уровня биохимического потребления кислорода. Биосенсор апробирован на образцах сточных вод очистных предприятий.

Ключевые слова: биосенсор, печатный электрод, проводящий гидрогель

Одним из направлений развития биосенсорных технологий является разработка биодатчиков и их миниатюризация, что представляет новые возможности для создания портативных биоаналитических устройств, широко доступных и позволяющих быстро выполнять анализы на месте. Большинство лабораторных моделей электрохимических биосенсоров на основе печатных электродов содержит в своем составе ферменты. Вместе с тем для решения экологических задач востребованы биосенсоры на основе целых клеток микроорганизмов. Например, для оценки интегральных показателей анализируемой среды - суммарного содержания легкоокисляемых веществ в пробе (индекс биохимического потребления кислорода - БПК). Для ускорения внедрения и коммерциализации биосенсора на основе модифицированных печатных электродов важны такие их характеристики, как стабильность сигнала биосенсора в течение длительного времени функционирования и прочное закрепление медиатора и микроорганизмов на электроде. В данной работе исследована биоэлектрохимическая модификация графитового печатного электрода биосенсора белковым гидрогелем, содержащим бактериальные клетки Gluconobacter oxydans. Гидрогель получали поперечной сшивкой бычьего сывороточного альбумина (БСА), ковалентно связанного с ферроценальдегидом.

Проведено определение БПК сточных вод с использованием биосенсора на основе печатного электрода, модифицированного бактериями G. oxydans и проводящей белковой матрицей. Использование проводящей белковой матрицы для формирования печатного электрода позволяет получать данные, имеющие высокую корреляцию с данными стандартного метода, что делает возможным применение данной конструкции биосенсора для оценки БПК в отходах спиртовых и аналогичных бродильных производств.

В результате выполнения работы установлена возможность сопряжения окислительно-восстановительных реакций в клетках бактерий Gluconobacter oxydans с электрохимическими процессами на электроде с помощью гидрогеля поперечно-сшитого бычьего сывороточного альбумина, ковалентно связанного с остатком ферроценальдегида. Показано значительное увеличение стабильности биосенсоров на основе синтезированного проводящего гидрогеля, что открывает перспективу их практического применения. Таким образом, впервые показана возможность модификации белка медиатором ферроценового ряда для создания стабильных микробных биосенсоров на основе печатных электродов.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, договор № 14.Z56.16.5425-МК и гранта РФФИ № 16-48-710959 р_а.

BIOSENSOR BASED ON SCREEN-PRINTED ELECTRODE MODIFIED WITH BACTERIAL CELLS IMMOBILIZED IN THE PROTEIN CONDUCTIVE HYDROGEL

S.Kamanin, V.Arlyapov

Tula State University, Russia, 300012, Tula, pr-t Lenina, 92

Graphite screen-printed electrodes were modified with conductive protein hydrogel containing bacterial cells

Gluconobacter oxydans and used as the basis of the biosensor for determining of biochemical oxygen demand. The biosensor was tested on sewage samples of water-treatment facilities

Key words: biosensor, screen-printed electrode, conductive hydrogel

Miniaturization is one of biosensor development directions. It provides new possibilities for bioanalytical portable devices, widely available and allows to carry out short tests on the spot. Most laboratory models of electrochemical biosensors based on screen-printed electrodes contain enzymes in its composition. However, solving the environmental problems demands apply of biosensors based on whole microorganism cells. For example, they are good in determining of the total content of easily oxidized substances in the sample (biochemical oxygen demand or BOD). To speed up the introduction and commercialization of screen-printed biosensors improving of their important characteristics such as stability operation time, is needed. In this work we investigated the modification of biosensor screen-printed electrode with electroconductive protein hydrogel containing bacterial cells Gluconobacter oxydans. The hydrogel was prepared by cross-linking of bovine serum albumin (BSA) with glutar aldehyde and ferrocene aldehyde.

Determination of the waste water sample BOD was carried out using the biosensor based on screen-printed electrode, modified with G. oxydans cells immobilized into protein conductive matrix. Using of biosensor based on developed electrodes provides data with high correlation to the standard method. making it possible to use biosensor of this design for assessing BOD in biotechnological facility waste waters.

The possibility of conjugation of redox reactions in Gluconobacter oxydans cells with electrochemical processes at the electrode via the conductive hydrogel was demonstrated. It was shown, that using the synthesized conductive hydrogel in electrode modification results in significant increase in stability of biosensors which opens up the prospect of their practical application. Thus, for the first time demonstrated the possibility of protein modification with mediator of ferrocene series to create a stable microbial biosensor based on screen-printed electrode.

Grant: The work was supported by a grant of President of Russian Federation for state support of young Russian scientists - PhD, contract № 14.Z56.16.5425-MK and the RFBR grant 16-48-710959 r_a.

.....

УДК: 543.9:57.044, ББК:

ЗАЩИТА КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ОТ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПУТЕМ ИХ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ ТЕХНОЛОГИЙ

О.А.Каманина, О.Н.Понаморева

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Россия, 300012, Тула, проспект Ленина, 92, o.a.kamanina@gmail.com, +79534194848

Разработаны подходы для формирования биогибридов «клетка в защитной оболочке» на примере метилотрофных дрожжей с использованием золь-гель технологии, которые можно применять для получения гетерогенных биокатализаторов.

Ключевые слова: инкапсулирование микроорганизмов, гетерогенный биокатализатор, золь-гель технологии, ОРМОСИЛ

Инкапсулирование живых клеток микроорганизмов в инертную биологически совместимую матрицу силикагеля может обеспечить значительное преимущество при разработке гетерогенных биокатализаторов для различных биотехнологических процессов. В природе примерами таких структур являются силикатные оболочки диатомовых водорослей. Важнейшая функция таких систем — защита генетического материала своего вида от неблагоприятных условий. Ранее нам удалось показать, что в определенных условиях золь-гель синтеза возможно образование силикатной оболочки вокруг клеток дрожжей [1]. Настоящая работа является продолжением этих исследований. Выявлено влияние условий реакции на 3D-структуру биоматериалов на основе дрожжевых клеток, иммобилизованных в органосиликатные матрицы. На основе этого разработан подход, который позволяет целенаправленно получать клетки дрожжей в оболочке с сохранением дыхательной активности инкапсулированных клеток. Дыхательную активность дрожжей, покрытых органосиликатной оболочкой, не зависит от присутствия ионов тяжелых металлов,

изменения кислотности среды и УФ-облучения (λ=254 нм, 5ч), в то время как дыхание не инкапсулированных микроорганизмов снижается в несколько раз.

Эти результаты указывают на уникальные защитные функции органосиликатной капсулы, что следует учитывать при разработке гетерогенных биокатализаторов на основе иммобилизованных микроорганизмов.

Литература.
1. Ponamoreva O.N. et al. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol–gels for the design of biosensors: Journal Article // Biosens. Bioelectron. 2015. Vol. 67, № 0. P. 321–326.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке РФФИ №16-38-00700

YEAST CELL PROTECTION FROM HARMFUL ENVIRONMENTAL FACTORS THROUGH ENCAPSULATION USING A SOL-GEL TECHNOLOGY

O.Kamanina, O.Ponamoreva

Tula State University, Russia, 300012, Tula, pr. Lenina, 92

The new approaches to formation of "cell-in-shell" biohybrids using sol-gel technology were developed in the example of methylotrophic yeast encapsulation. This approaches could be used for obtaining of heterogeneous biocatalysts.

Key words: encapsulation of microorganism, heterogeneous biocatalyst, sol-gel technology, ORMOSIL

Encapsulation of living cells into the inert biocompatible silica matrix could provide significant benefit in heterogeneous biocatalysts development. Silicate shells of diatoms are the natural examples of such structures. The main function of that systems is the protection of genetic material from adverse conditions. Previously, we showed that under certain conditions of sol-gel synthesis formation of silica shell around yeast cells is possible. [1]. This work continues our investigations. Impact of reaction conditions on 3D structure of biomaterials based on encapsulated in organosilicate matrixes yeast was revealed. Based on this the approach to targeted obtaining of yeast cells-in-shell was developed. The approach provides maintaining of immobilized cell respiratory activity. Respiratory activity of the organosilicate coated yeast is almost independent of the presence of toxins and UV irradiation (λ = 254 nm, 5h), whereas respiration of non-encapsulated microorganisms is reduced by several times.

These results indicate unprecedented protective function of organosilicate capsules that should be considered in the development of heterogeneous biocatalysts based on immobilized microorganisms.

References:
1. Ponamoreva O.N. et al. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol–gels for the design of biosensors: Journal Article // Biosens. Bioelectron. 2015. Vol. 67, № 0. P. 321–326.

Grant: The reported study was funded by RFBR according to the research project №.16-38-00700

УДК 620.22: 620.193.4: 669: 666.3-127: 546.41

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СЛОИСТОГО КОМПОЗИЦИОННОГО БИОМАТЕРИАЛА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ.

Насакина Е.О., Каплан М.А., Баикин А.С., Конушкин С.В., Сергиенко К.В., Серегин А.В., Леонов А.В., Леонова Ю.О., Ковалева Е.Д., Колмакова А.А., Севостьянов М.А., Колмаков А.Г., Симаков С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия
119334, Москва, Ленинский проспект, 49
nacakina@mail.ru

Получены композиционные материалы медицинского назначения с градиентной структурой «TiNi – тантал – хитозан с лекарственным средством», предназначенные для производства имплантационных изделий типа «стент». Показана возможность объединения и улучшение в одном материале желаемых эксплуатационных характеристик компонентов.

Ключевые слова: никелид титана, тантал, хитозан, стент, биосовместимость

Никелид титана (TiNi) обладает механическими свойствами, подобными поведению живых тканей, что при установке и эксплуатации производных изделий в организме обеспечивает меньшие разрушения их самих и меньшее повреждение тканей. Особенно он интересен при создании имплантатов типа «стент» самораскрывающегося дизайна, за счет наличия у него эффекта памяти формы, что способствует меньшим габаритам имплантатов в состоянии доставки, устранению необходимости в дополнительных средствах их развертывания и т.д., что в конечном счете приводит к менее травматическому эффекту операций. Но материал в значительной степени содержит токсичный никель, способный влиять на окружающие ткани прямо с поверхности имплантата или выделяться в агрессивные физиологические среды в результате коррозии [1-2]. Наилучшим решением этой проблемы может являться создание на основе TiNi композиционных материалов с высоко коррозионностойкой и биосовместимой поверхностью. Например, из тантала, также обладающего высокой рентгеноконтрастностью, что способствует отслеживанию состояния и положения изделия в организме. А формирование биодеградируемых полимерных поверхностных слоев способствует возможности внесения лекарственных средств непосредственно в структуру изделия и позволяет осуществлять контролируемый и локальный выход препарата.

Для формирования материала были использованы методы магнетронного напыления в вакууме (металлический поверхностный слой) [3] и литья полимерного раствора. Были проведены исследования фазового состава (рентгеновский дифрактометр «Ultima IV» в CuKα – излучении, с программным комплексом PDXL с использованием базы данных ICDD), морфологии и послойного элементного состава поверхности и фрактографические (на растровом электронном микроскопе TESCAN VEGA II SBU, снабженном приставкой для энергодисперсионного анализа INCA Energy, и электронном Оже-спектрометре JAMP-9500F фирмы JEOL). Относительно компонентов и их сочетаний были исследованы механические, коррозионные и биологические свойства, а также биодеградация полимера и кинетика высвобождения лекарственного средства.

Работа выполнена при поддержке программы РФФИ № 15-33-70006 «мол_а_мос» и 14-29-10208 «офи_м».

Литература.
1. Nasakina E.O., Sevostyanov M.A., Golberg M.A., ect. LongTerm Corrosion Tests of Nanostructural Nitinol of (55.91 wt% Ni, 44.03 wt% Ti) Composition under Static Conditions: Composition and Structure before and after Corrosion // Inorg. Mater. Appl. Res. 2015. Vol. 6, No. 1. P. 53–58.
2. Nasakina E.O., Sevostyanov M.A., ect. LongTerm Corrosion Tests of Nanostructural Nitinol of (55.91 wt% Ni, 44.03 wt% Ti) Composition under Static Conditions: Ion release // Inorg. Mater. Appl. Res. 2015. Vol. 6, No. 1. P. 59–66.
3. Nasakina E.O., Sevost'yanov M.A., Mikhailova A.B., ect. Preparation of a nanostructured shape memory composite material for biomedical applications // Inorg. Mater. 2015. Vol. 51, No. 4. P. 400-404

RECEIVING TECHNOLOGY FOR LAYERED COMPOSITE BIOMATERIAL FOR MEDICINE.

Nasakina E.O., Kaplan M.A., Baikin A.S., Konushkin S.V., Sergienko K.V., Seryogin A.V., Leonov A.V., Leonova Yu.O., Kovalyova E.D., Kolmakova A.A., Sevostyanov M.A., Kolmakov A.G., Simakov S.V.

Institution of Russian Academy of Sciences A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Material Science RAS, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 119334, Moscow, Leninsky prospekt, 49
nacakina@mail.ru

Composite materials of medical appointment with gradient structure «TiNi – tantalum – chitosan with medicine», intended for production of implant products of «stent» type are received. The possibility of consolidation and improvement in one material of desirable operational characteristics of components is shown.

Key words: nitinol, tantalum, chitosan, stent, biocompatibility

Nitinol (TiNi) possesses mechanical properties, similar to behavior of living tissues that in case of installation and operation of its products in an organism provides smaller destructions of them and smaller damage of fabrics. Especially it is interesting during creation of implants of «stent» type of self-revealing design, due to presence of a shape memory effect which promotes smaller dimensions of implants in a

delivery condition, elimination of need for additional resources for their expansion, etc. that eventually results in less traumatic effect of operation. But material substantially contains the toxic nickel capable to influence surrounding fabrics directly from a surface of an implant or to be allocated on physiological environment as a result of corrosion [1-2]. Creation on the basis of TiNi of composite materials with highly corrosion-resistant and biocompatible surface can be the best solution of this problem. For example, tantalum which also have high radiopacity that promotes tracking of a condition and position of a device in an organism. And forming of the biodegraded polymeric surface layers promotes a possibility of introduction of medicines directly in structure of a device and allows to realize a controlled and local exit of medicine.

For forming of material methods of a magnetron sputtering in vacuum (a metal surface layer) [3] and casting of polymeric solution were used. Researches of phase structure (the x-ray diffractometer «Ultima IV» in CuKα – radiation, with the program PDXL complex with use of the ICDD database), morphology and layer-by-layer element structure of a surface and fractography were conducted (on the raster electronic microscope TESCAN VEGA II SBU supplied with a prefix for the energy dispersive analysis INCA Energy and electronic Auger spectrometer JAMP-9500F JEOL). Mechanical, corrosion and biological properties of components and their combinations and also biodegradation of polymer and kinetics of release of medicine were researched.

This work was supported by RFBR program number 15-33-70006 «mol_a_mos» and 14-29-10208 «ofi_m».

References:
1. Nasakina E.O., Sevostyanov M.A., Golberg M.A., ect. LongTerm Corrosion Tests of Nanostructural Nitinol of (55.91 wt% Ni, 44.03 wt% Ti) Composition under Static Conditions: Composition and Structure before and after Corrosion // Inorg. Mater. Appl. Res. 2015. Vol. 6, No. 1. P. 53–58.
2. Nasakina E.O., Sevostyanov M.A., ect. LongTerm Corrosion Tests of Nanostructural Nitinol of (55.91 wt% Ni, 44.03 wt% Ti) Composition under Static Conditions: Ion release // Inorg. Mater. Appl. Res. 2015. Vol. 6, No. 1. P. 59–66.
3. Nasakina E.O., Sevost'yanov M.A., Mikhailova A.B., ect. Preparation of a nanostructured shape memory composite material for biomedical applications // Inorg. Mater. 2015. Vol. 51, No. 4. P. 400-404

.....

УДК: 619:579.882.11.636.7, ББК:

ИННОВАЦИОННАЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНАЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ОЛИГОПЕПТИДА

А.С.Карамян[1], А.Ю.Савочкина[2]

[1]Российский университет дружбы народов, Россия, 121357, Москва, Аминьевское шоссе, 28 к 2, arfenya@mail.ru, 89262664334
[2]Российский университет дружбы народов, Россия, 117198, Москва, Миклухо-маклая, 10 к 2, arfenya@mail.ru, 89262664334

Инновационные терапевтические трансдермальные системы доставки позволяют назначать лекарства с большими размерами молекул, которые на сегодняшний день могут вводиться в организм только с помощью болезненных инъекций, а также уменьшить объем и дозу вводимого вещества.

Ключевые слова: **Ключевые слова**: Трансдермальные терапевтические системы, суббукальные пленки, Седатин

Среди многих лекарственных форм всё большее внимание привлекают такие формы лекарственных средств, которые позволяют создать в поражённых тканях наибольшую концентрацию лекарственного вещества с наименьшим нежелательным воздействием на организм в целом. Одной из таких лекарственных форм является лекарственная желатиновая плёнка, разработанная в ЦКП(НОЦ) РУДН.

Инновационные терапевтические трансдермальные системы доставки позволяют назначать лекарства с большими размерами молекул, которые на сегодняшний день могут вводиться в организм только с помощью болезненных инъекций, а также уменьшить объем и дозу вводимого вещества. Лекарственная пленка готовится на желатиновой основе и представляет собой пластинку прямоугольной формы и заданного размера, которая может применяться суббукально (защечно), сублингвально (подъязычно), интраназально (в нос), иногда ректально (через прямую кишку). На желатиновую основу пленки наносятся различные лекарственные вещества, проявляется адгезивное действие желатина, что обеспечивает прочную фиксацию пленки в заданной зоне. Реализуется направленная доставка лекарственных веществ в патологический очаг, что позволяет достичь терапевтический эффект дозами, составляющими 1/10 или 1/20 средней терапевтической дозы [1-3].

Основными преимуществами лекарственных желатиновых плёнок являются:

1. Доступность относительно большой площади поверхности слизистой оболочки ротовой полости, способствует быстрому растворению пленки и всасыванию активного компонента в кровоток,

2. Активное вещество, попадая непосредственно в кровоток, не подвергается разрушению в ЖКТ под воздействием кислоты и пищеварительных ферментов,

3. Высокая биодоступность и ускоренное наступление терапевтического эффекта позволяет использовать минимальные дозы действующего вещества, снизить проявление побочных эффектов,

4. Точное дозирование действующего вещества в пленке, по сравнению с жидкими формами лекарственных средств.

В настоящее время, в свете растущего пагубного воздействия техногенных и стрессорных факторов, все большую медико-социальную значимость приобретают препараты, способные снизить развитие тревожных расстройств, в том числе у пациентов с расстройством адаптации, что обуславливает актуальность разработки новых лекарственных средств с анксиолитическим действием. Представляется, что наилучший терапевтический эффект при лечении расстройств адаптации с преобладанием тревожной симптоматики можно получить при использовании препаратов, обладающих одновременно анксиолитическим и антидепрессантным действием, а также стресс-протективной или стресс-корректирующей активностью. Важная роль в механизмах тревоги, депрессии и защиты от стресса отводится регуляторным пептидам. Одним из перспективных направлений создания инновационных препаратов мультинаправленного действия является их разработка на основе биологически активных пептидов [4-7]. Данные представления основаны на том, что пептиды являются родственными организму эндогенными соединениями [8], которые выполняя важные нейромедиаторные, модулирующие и интегративные задачи, формируют единый функциональный континуум, регулирующий многие аспекты гомеостаза и высшей нервной деятельности. Эндогенные пептиды являются также связующим звеном основных систем, опосредующих реактивность организма к внешним факторам.

В начале 80-х годов особый интерес у исследователей вызывал природный пептид Дерморфин (Tyr-(D-Ala)-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser), впервые выделенный из кожи лягушек рода Phyllomedusa, и позже из мозга и желудка млекопитающих [9]. В исследованиях было показано высокое сродство Дерморфина к μ- и δ-опиатным рецепторам, а также продемонстрированы анальгетические свойства в десятки раз превышающие таковые у морфина и энкефалина. Пентапептид СЕДАТИН (Arg-Tyr-(D-Ala)-Phe-Gly), обладающий измененной направленностью на опиатные рецепторы (высокоселективный антагонист опиатных μ-рецепторов) и устойчивый к протеолитической деградации в организме. Также было продемонстрировано, что добавление концевой аминокислоты L-Arg в структуру придает пептиду в доклинических моделях антиоксидантные, стресс-протекторные свойства [10]. Проведенные доклинические фармакологические исследования показали, что препарат СЕДАТИН демонстрирует выраженную анксиолитическую, антидепрессивную и стресс-протекторную активности при минимально выраженных негативных эффектах. Поэтому разработчиком было предложено применение препарата СЕДАТИН для лечения тревожных состояний и депрессий, развивающихся, в частности, при расстройствах адаптации, а также для купирования острых и хронических стрессорных состояний организма.

В наших экспериментах на лабораторных животных изучена острая и хроническая токсичность препарата Седатин пленка быстрорастворимая 0,2мг, разработанная ЦКП (НОЦ) РУДН.В доклинических исследованиях токсичности установлено, что Седатин малотоксичен. ЛД50 для самок и самцов белых мышей при однократном внутрибрюшинном введении составляет соответственно 1440 и 1580 мг/кг. При однократном и хроническом введении препарат не оказывает также выраженного местно-раздражающего действия на слизистые, кожу и подкожную клетчатку ротовой полости белых крыс. Выраженная анксиолитическая, антидепрессивная и стресс-протекторная активность препарата, продемонстрированная в доклинических исследованиях, позволяет рассматривать препарат Седатин как перспективное лекарственное средство для лечения тревожных состояний и депрессий, развивающихся, в частности, при расстройствах адаптации, а также для купирования острых и хронических стрессорных состояний организма.

При введении СЕДАТИН в течение 1 месяца крысам исследуемый препарат не вызывал токсических поражений основных органов и систем организма подопытных животных. При однократном и хроническом введении препарат не оказывал также выраженного местно-раздражающего действия на слизистые, кожу и подкожную клетчатку.Препарат фармакологически активен. Применение тестируемого препарата Седатин пленка быстрорастворимая 0,2 мг является перспективным с точки зрения коррекции психоэмоциональных состояний.

Литература.

1.Карамян А.С., Обидченко Ю.А. Современные неинвазивные терапевтические системы // Ветпрактик.-2012г.-С.24-27 2.Ананьев В.Н., Новиков Ю.Т., Фурин В.А. Новая адресная иммобилизованная лекарственная

форма - лекарственные желатиновые плёнки //Медицинская книга.- 2004. – С. 216 . 3. Балабанов В.И. Нанотехнологии// Наука будущего.-2009. –С. 256. 4. Andreeva L.A., et al. Ex vivo screening of prospective peptide drugs: new approaches. Dokl Biol Sci, 2010. 434: p. 300-3. 5. Brain S.D. and H.M. Cox. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. Br J Pharmacol, 2006. 147 Suppl 1: p. S202-11. 6. Fernandes E.S., S.M. Schmidhuber and S.D. Brain. Sensory-nerve-derived neuropeptides: possible therapeutic targets. Handb Exp Pharmacol, 2009(194): p. 393-416. 7. Mangoni M.L. Host-defense peptides: from biology to therapeutic strategies// Cell Mol Life Sci.- 2011. 68(13): p. 2157-9. 8. Ashmarin I.P. and M.F. Obukhova. Current state of the hypothesis on functional continuum of regulatory peptides// Vestn Ross Akad Med Nauk.- 1994.-№ 10.- p. 28-34. 9.DeiginV.I., YarovaE.P. Synt hesisofdermorphinanditsanalogs.Peptides, 1984: p.325-328. 10.FleishmanM.Y. etal. Effect of the arginine-containing mu,delta-opiate receptor agonist sedatin on DNA synthesis in the epithelium of the gastric fundus in albino rats//.Bull Exp Biol Med.- 2004.-№ 137(3).- p. 235-7.

Финансирование: оплата с карты

INNOVATIVE TRANSDERMAL THERAPEUTIC SYSTEM BASED ON DOMESTIC OLIGOPEPTIDE

A.Karamyan[1], A.Savochkina[2]

[1] *Peoples' Friendship University of Russian, Russia, 121357, Moscow, Aminevskoe highway, 28/2*
[2] *Peoples' Friendship University of Russian, Russia, 117198, Moscow, Mikluho-Maklaya str, 10/2*

Innovative therapeutic transdermal delivery systems can prescribe medication with large molecular size, which to date can only be administered via painful injections and reduce the volume and the dose of the substance.

Key words: Key words: Transdermal therapeutic systems, subbukal films Sedatin

Among the many formulations more and more attention is drawn to forms of drugs that allow the affected tissues to create the greatest concentration of the drug with the least adverse effect on the body as a whole. One such drug dosage forms is a gelatin film, developed in CCU (ERC) People's Friendship University.

Innovative therapeutic transdermal delivery systems can prescribe medication with large molecular size, which to date can only be administered via painful injections and reduce the volume and the dose of the substance. Dosage film prepared on gelatin-based and is a plate of a rectangular shape and a predetermined size, which can be applied subbukalno (buccally), sublingual (sublingually), nasally (nasal), rectal sometimes (through the rectum). On the basis of the gelatin films applied various medicinal substance is manifested adhesive action of gelatin that provides a strong fixation of the film in a predetermined zone. Implemented directed delivery of drugs into the pathological hearth that allows doses to achieve a therapeutic effect, 1/10 or 1/20 constituents average therapeutic doses of [1-3].

The main advantages of medicinal gelatin films are:

1. Availability of relatively large surface area of the oral mucosa, the film promotes rapid dissolution and absorption of active ingredient into the blood stream,

2. Active substance falling directly into the bloodstream without being destroyed in the digestive tract under the influence of the digestive enzymes and acid,

3. High bioavailability and rapid onset of therapeutic effect allows the use of the minimum dose of active ingredient and reduce the side effects,

4. Precise metering of the active substance in the film, compared to liquid forms of drugs.

At the present time, in the light of the increasing adverse effects of anthropogenic and stress factors, increasing medical and social significance of acquiring drugs that can reduce the development of anxiety disorders, including patients with adjustment disorder, which leads to the development of relevant new drugs with anxiolytic effects. It appears that the best therapeutic effect in the treatment of disorders with prevalence adaptation anxiety symptoms can be prepared using preparations having both anxiolytic and antidepressant activity, as well as the protective stress or stress-correcting activity. An important role in the mechanisms of anxiety, depression and stress protection given to regulatory peptides. One promising area of creating innovative products multidirectional action is their development on the basis of biologically active peptides [4-7]. These representations are based on the fact that the peptides are related to the body endogenous compounds [8], which perform an important neurotransmitter, modulating and integrative tasks, form a single functional continuum that regulates many aspects of homeostasis and higher nervous activity. Endogenous peptides are also link the main systems mediating reactivity to external factors.

In the early 80-ies of particular interest to researchers called natural peptide dermorfina (Tyr- (D-Ala) -Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser), first isolated from the skin of frogs genus Phyllomedusa, and later from mammalian brain and stomach [9]. Studies

have shown a high affinity dermorfina to the μ- and δ-opioid receptors, as well as demonstrated analgesic properties in dozens of times higher than those of morphine and enkephalin. Pentapeptide SEDATIN (Arg-Tyr- (D-Ala) -Phe-Gly), having a change of direction on the opiate receptors (highly selective antagonist of opioid μ-receptor) and resistant to proteolytic degradation in the body. It was also demonstrated that the addition of amino terminal L-Arg in a peptide structure attached preclinical models antioxidant, stress-protective properties [10]. Preclinical pharmacological studies conducted have shown that the drug exhibits SEDATIN pronounced anxiolytic, antidepressant and stress-protective activity when expressed by the minimum negative effects. Therefore, the gaphandler was asked to use the drug SEDATIN to treat anxiety disorders and depression, developing, in particular, with adjustment disorders, as well as for the relief of acute and chronic stress conditions organizma.V our experiments on laboratory animals studied acute and chronic toxicity of the drug Sedatin fast-dissolving film of 0, 2mg, developed by MSC (REC) RUDN.V preclinical toxicity studies found that Sedatin low toxicity. LD50 for male and female white mice after a single intraperitoneal injection of respectively 1440 and 1580 mg / kg. In single and chronic administration of the drug does not have as pronounced locally irritating to the mucous membranes, skin and subcutaneous tissue of the mouth of white rats. Pronounced anxiolytic, antidepressant and stress-protective activity of the drug demonstrated in preclinical studies, allows us to consider the drug Sedatin as a promising drug for the treatment of anxiety disorders and depression, developing, in particular, with adjustment disorders, as well as for the relief of acute and chronic stress states of the organism .

With the introduction of SEDATIN within 1 month of the study drug to rats did not cause toxic lesions of the major organ systems of the body in laboratory animals. In single and chronic administration of the drug is not provided is also expressed locally irritating to the mucous membranes, skin and subcutaneous kletchatku.Preparat pharmacologically active. Application of the test preparation Sedatin film fast-dissolving 0.2 mg is promising in terms of correction of psycho-emotional state.

References:
1.Karamyan A.S., Obidchenko Yu.A. Sovremennye neinvazivnye tarapevticheskie sistemy // Vetpraktik.-2012г.-S.24-27 2.Ananyev V.N., Novikov Yu.T., Furin V.A. Novaya adresnaya immobilizovannaya lekarstvennaya forma- lekarsyvennye zhelatinovye plenki //Medicinskaya kniga.- 2004. – S. 216 . 3. Balabanov V.I. Nanotehnologii // Nauka buduschego.-2009. –S. 256. 4. Andreeva L.A., et al. Ex vivo screening of prospective peptide drugs: new approaches. Dokl Biol Sci, 2010. 434: p. 300-3. 5. Brain S.D. and H.M. Cox. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. Br J Pharmacol, 2006. 147 Suppl 1: p. S202-11. 6. Fernandes E.S., S.M. Schmidhuber and S.D. Brain. Sensory-nerve-derived neuropeptides: possible therapeutic targets. Handb Exp Pharmacol, 2009(194): p. 393-416. 7. Mangoni M.L. Host-defense peptides: from biology to therapeutic strategies// Cell Mol Life Sci.- 2011. 68(13): p. 2157-9. 8. Ashmarin I.P. and M.F. Obukhova. Current state of the hypothesis on functional continuum of regulatory peptides// Vestn Ross Akad Med Nauk.- 1994.-№ 10.- p. 28-34. 9.DeiginV.I., YarovaE.P. Synthesisofdermorphinanditsanalogs.Peptides, 1984: p.325-328. 10.FleishmanM.Y. etal. Effect of the arginine-containing mu,delta-opiate receptor agonist sedatin on DNA synthesis in the epithelium of the gastric fundus in albino rats//.Bull Exp Biol Med.- 2004.-№ 137(3).- p. 235-7.

УДК: 615.243.4, ББК:

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА БИФИДОБАКТЕРИЙ, ЛАКТОБАЦИЛЛ И ЭНТЕРОКОККА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

К.Климина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Россия, 119991, Москва, Губкина, 3, ppp843@yandex.ru, 89161336090

Создание нового отечественного препарата на основе штаммов пробиотических микроорганизмов с исследованными свойствами является реальным способом решения задачи профилактики и лечения воспалительных заболеваний кишечника у людей

Ключевые слова: пробиотики, фармацевтический препарат, геномы, цитокины, щелочная фосфатаза

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), такие как болезнь Крона и язвенный колит, характеризуются не только нарушением кишечной микробиоты, но и нарушением взаимодействия между внешними факторами и иммунной системой. Имеющиеся данные о влиянии дисбиотических процессов на течение

язвенного колита ставит нормализацию кишечного микробиоценоза с использованием пробиотиков в ряд необходимых условий адекватной терапевтической тактики. Необходимость разработки новых отечественных препаратов продиктована современными тенденциями: 1) использованием отечественных регионально-адаптированных пробиотических штаммов с аннотированной последовательностью генома; 2) использованием комплексных препаратов, состоящих из нескольких штаммов, что приводит к расширению спектра действия, по сравнению с монокомпонентными пробиотиками.

Все сказанное указывает на целесообразность создания всесторонне исследованного комплексного фармацевтического препарата (ФП) – пробиотика с известной структурой генома всех микробных компонентов, выделенных из организма людей – жителей России для профилактики и лечения ВЗК в России.

Была разработана и обоснована технология получения препарата, при которой были решены следующие задачи: 1) подобрана экономически обоснованная питательная среда, обеспечивающая оптимальные условия развития биомассы; 2) проведен подбор вспомогательных веществ, обеспечивающих высокую выживаемость бактерий в кислой среде желудка; 3) отработаны параметры процесса культивирования штаммов Bifidobacterium longum GT15, Lactobacillus rhamnosus K32, Enterococcus faecium L-3 в производственных условиях; 4) подобрано оборудование для стадии концентрирования и отмывки биомассы; 5) проведен комплексный анализ ФП.

Фармацевтическая композиция, состоящей из штаммов B. longum GT15, L. rhamnosus K32, E. faecium L-3, была проверена на модели неспецифической воспалительной реакции, аналоге язвенного колита – антибиотико-ассоциированном дисбиозе у крыс. Разрабатываемый ФП по его влиянию на микробиоту, морфофункциональные характеристики кишечника, на иммунитет не уступало препаратам сравнения (Бифиформ и Линекс), а по ряду параметров даже превосходило их. Использование комплексного средства позволяет быстрее восстанавливать слизистую кишечника, пищеварение, гомеостаз и иммунитет.

Специфические признаки, отличающие разработанный препарат:

- стимуляция IL-10, на фоне увеличения содержания продуцирующих бутират Faecalibacterium prausnitzii и быстрой нормализации микробиоты (исчезновение признаков чрезмерного роста клебсиелл, протея, стафилококков и других условно-патогенных бактерий и грибов);
- дополнительное влияние на противовоспалительный цитокин TGFβ (увеличение) и воспалительный цитокин MCP-1 (тенденция к уменьшению);
- увеличение фагоцитарной активности лейкоцитов;
- утолщение слоя слизи, отделяющего микробиоту кишечника от поверхности эпителия;
- увеличение выработки щелочной фосфатазы клетками слизистой оболочки тонкой кишки;
- быстрая компенсация после токсического действия антимикробных препаратов по биохимическим показателям сыворотки крови, восстановление активности пищеварительных ферментов слизистой оболочки кишечника и химуса.

На данный момент фармацевтический препарат успешно прошел доклинические испытания и показал высокие результаты безопасности. Полученные результаты, являются основой для проведения клинических исследований и внедрения в клиническую практику эффективного препарата для лечения ВЗК. На отечественном и зарубежном рынках пробиотических препаратов с исследованными свойствами бактерий крайне мало.Разработанное отечественное средство будет импортозамещающим и более дешевым по сравнению с зарубежными аналогами, что позволит сделать его доступным для большинства нуждающихся в нем больных.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (Государственный контракт 14.N08.12.0021)

DEVELOPING A DRUG BASED ON THE COMPLEX OF BIFIDOBACTERIA, LACTOBACILLI AND ENTEROCOCCUS FOR TREATING AND PREVENTING GUT INFLAMMATORY AND AUTOIMMUNE DISEASES

K.Klimina

Vavilov Institute of General Genetics RAS, Russia, 119991, Moscow, Gubkin, 3

A new drug composed of strains of probiotic bacteria with known properties is the clue for a successful prevention and treatment of inflammatory bowel disease in humans

Key words: probiotics, pharmaceutical, genomes, cytokines, alkaline phosphatase

Inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis are characterized not only by disorders in the intestinal microbiota, but also by the malfunction of the interaction between environmental factors and the immune system.Data available on the impact of dysbiotic processes on the course of ulcerative colitis puts the normalization of the intestinal microbiota using probiotics among the necessary conditions for adequate therapeutic tactics.The strategy for developing the new drug is dictated by current trends: 1) using region-specific probiotic strains with known genomic sequence; 2) making a complex drug consisting of several strains, as it leads to an increase in the spectrum of action compared to monocomponent probiotics.

All these points indicate at the need to develop a new drug with well-studied characteristics: a probiotic with known genomic sequences of all of its components – bacteria isolated from Russian residents for IBD treatment in Russia. The technology of drug production has been developed which solved the following tasks: 1) selected a cost effective nutrient medium, providing optimal conditions for the biomass growth; 2) selection excipients, that provide a high survival rate of bacteria in the acidic environment of the stomach; 3) selection the optimal conditions for large-scale cultivation process of Bifidobacterium longum GT15, Lactobacillus rhamnosus K32, Enterococcus faecium L-3; 4) selection the equipment for concentrating and washing the biomass; 5) conduction of comprehensive analysis of pharmaceutical product.

The pharmaceutical composition consisting of B. longum GT15, L.rhamnosus K32, E. faecium L-3 strains has been tested on the model of antibiotic-associated dysbiosis in rats, a non-specific inflammatory reaction, similar to the ulcerative colitis. The developed pharmaceutical composition was not inferior, or even surpassed the comparison drugs (Bifiform and Linex), as compared by its effect on the microbiota and morphological and functional characteristics of the intestinal immunity.The use of the drug allows to quickly restore the intestinal mucosa, digestion, homeostasis and immunity.

Specific characteristics of the developed drug:

- stimulation of IL-10, increased content of butyrate-producing Faecalibacterium prausnitzii and rapid normalization of the microbiota (the disappearance of excessive growth of Klebsiella, Proteus, Staphylococci and other opportunistic bacteria and fungi);
- additional impact on the anti-inflammatory cytokine TGFß (increase) and the inflammatory cytokine MCP-1 (decrease);
- the increase in phagocytic activity of leukocytes;
- thickening the layer of mucus that separates the gut microbiota from the surface of the epithelium;
- increased production of alkaline phosphatase by mucosal cells of the small intestine;
- quick recovery after the toxic action of antimicrobial drugs according to the biochemical indicators of the blood serum, recovery of the activity of the digestive enzymes of the intestinal mucosa and chyme.

Due date, the drug has successfully passed preclinical trials and shows good results of safety. The obtained results are basis for clinical trials conduction and the implementation into clinical practice of the effective drug for the treatment of IBD. On national and foreign markets the share of probiotics with the known properties of the bacteria is extremely small. Developed national pharmaceutical drug will be import-substituting and cheaper as compared with foreign analogues that will make it available for most patients.

Grant: This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (State grant 14.N08.12.0021).

УДК: 577.151.62, ББК: 28.07

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ РЕДОКС-ПАРТНЕРОВ ЦИТОХРОМОВ P450 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

А.А.Ковалевский, Д.О.Дормешкин, А.А.Гилеп

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь, 220141, Минск, Купревича, 5/2, bio.kovalevs@gmail.com, +375 29 6794055

Получены рекомбинантные редокс-партнеры цитохромов P450 Mycobacterium tuberculosis: НАДФН-ферредоксин-редуктаза, ферредоксин-редуктаза и ферредоксин.

Ключевые слова: редокс-партнеры, цитохромы P450, туберкулез, экспрессия белков.

Геном Mycobacteriumtuberculosis, основного возбудителя туберкулеза, кодирует 20 цитохромов P450, функция большинства которых не установлена. Тем не менее, показано участие ряда данных белков в патогенезе туберкулеза. Таким образом, цитохромы P450 M. tuberculosis являются перспективными мишенями противотуберкулезной терапии [1].

Изучение цитохромов P450 M. tuberculosis ограничено малым количеством информации о редокс-партнерах, и, соответственно, невозможностью полноценной реконструкции ферментативных систем invitro. Для монооксигеназного катализа цитохромам P450 необходимы доноры электронов. В зависимости от типа цитохромов P450, транспорт электронов осуществляется через ФАД-ФМН содержащий флавопротеин, либо через комплекс FAD-содержащего флавопротеина и ферредоксина. В ряде случаев цитохромы P450 способны принимать электроны от альтернативных доноров электронов [2]. Однако для понимания биологической функции различных цитохромов P450 оптимальным является использование природных редокс-партнеров.

Последовательности генов fprA, Rv0688 и Rv0763c штамма H37RvM. tuberculosis, соответствующие НАДФН-ферредоксин-редуктазе, ферредоксин-редуктазе и ферредоксину были клонированы в экспрессионный вектор pET11a в вариантах с 6-His последовательностью на N- и C-концах. Белки были очищены с помощью металл-афинной и ионообменной хроматографии. ПААГ электрофорез и MALDI-TOF спектры показали высокую степень очистки целевых белков. Полученные белки обладают характерными спектрами флавопротеинов и ферредоксинов. Нами была проведена сравнительная оценка способности полученных белков к восстановлению P450 микобактерий и поддержанию каталитической активности в реконструированной системе.

Литература.
1. Sean A. Hudson Kirsty J. McLean, Andrew W. Munro, Chris Abell Mycobacterium tuberculosis cytochrome P450 enzymes: a cohort of novel TB drug targets [Journal] // Biochem. Soc. Trans. - 2012. - 40. - pp. 573–579. 2. Vasilevskaya A.V. Yantsevich A.V., Sergeev G.V., Lemish A.P., Usanov S.A., Gilep A.A. Identification of Mycobacterium tuberculosis enzyme involved in vitamin D and 7-dehydrocholesterol metabolism [Journal] // The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. - 2016.

PRODUCTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CYTOCHROMES P450 REDOX PARTNERS

A.Kavaleuski, D.Dormeshkin, A.Gilep

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220141, Minsk, Kuprevich, 5/2

Recombinant redox partners of Mycobacterium tuberculosis cytochromes P450 were produced: NADPH-ferredoxin reductase, ferredoxin reductase and ferredoxin.

Key words: redox partners, cytochromes P450, tuberculosis, protein expression.

The genome of the main cusative agent of tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, encodes 20 cytochromes P450, whereas the function of the majority of them is still unrevealed. Nevertheless, the number of them are shown to be involved in tuberculosis pathogenesis. Thus, cytochromes P450 of M. tuberculosis are considered to be the promising targets for anti-tuberculosis therapy [1].

Studies of M. tuberculosis cytochromes P450 are limited due to insufficiency of the data concerning their redox partners. Consequently, the complete in vitro reconstruction these enzymatic systems is impossible. Electron donors are essential for monooxygenase catalysis with cytochromes P450. Depending on the type, cytochromes P450 can gain electrons through FAD-FMN-containing flavoprotein or through complex of FAD-containing flavoprotein and ferredoxin. In some cases, cytochromes P450 are capable of accepting electrons from the electron donor alternatives [2]. However, it is optimal to use the natural redox partners in order to understand the biological functions of the different cytochromes P450.

The sequences of M. tuberculosis H37Rv genes fprA, Rv0688 and Rv0763c that encode NADPH-ferredoxin reductase, ferredoxin reductase and ferredoxin were cloned into pET11a expression vector in variants with 6-His tag flanking N- and C-terminus. The proteins were expressed and purified using metal-affinity and ion-exchange chromatography techniques. SDS-PAAG electrophoresis and MALDI-TOF spectra indicate a high level of purification of the proteins. These proteins exhibit characteristic spectra of flavoproteins and ferredoxin. We carried out a comparative assessment of the expressed proteins to reduce mycobacterial cytochromes P450 and maintenance the catalytic activity in the reconstituted system.

References:
1. Sean A. Hudson Kirsty J. McLean, Andrew W. Munro, Chris Abell Mycobacterium tuberculosis cytochrome P450 enzymes: a cohort of novel TB drug targets [Journal] // Biochem. Soc. Trans. - 2012. - 40. - pp. 573–579. 2. Vasilevskaya A.V. Yantsevich A.V., Sergeev G.V., Lemish A.P., Usanov S.A., Gilep A.A. Identification of Mycobacterium tuberculosis enzyme involved in vitamin D and 7-dehydrocholesterol metabolism [Journal] // The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. - 2016.

УДК: 664.642.2, ББК:

РАЗРАБОТКА СПОСОБА БИОАКТИВАЦИИ ДЕГИДРАТИРОВАННОЙ ЗАКВАСКИ ПРЯМОГО ВНЕСЕНИЯ ДЛЯ ЕЕ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ РЖАНО-ПШЕНИЧНОГО ХЛЕБА

А.В.Козионов

ФГАНУ «Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности» edefly1@gmail.com, 89164187159

Изучено влияние пряностей на прирост биомассы МКБ, получена композиция из пряностей с наиболее благоприятным для роста биомассы составом. Изучено влияние внесение композиции пряностей в хлебобулочные изделия на свойства выпечка.

Ключевые слова: ржаные закваски, ацидофильная закваска, биопрепарат, пряности, технология

Актуальным на сегодняшний день является использование в технологии приготовления хлеба биопрепаратов - дегидратированных заквасок на основе чистых культур МКБ. Это связано с тем, что существующие технологии приготовления традиционных заквасок длительны и трудоемки для предприятий. Применение биопрепаратов позволяет не только обеспечить качество, микробиологическую чистоту, повышение пищевой ценности хлебобулочных изделий, но и сократить производственный цикл. Одной из стадий подготовки биопрепарата к производству является активация – создание оптимальных условий для повышения эффективности его использования (интенсификация прироста биомассы МКБ, кислотность, содержание летучих кислот, органолептические свойства (вкус, запах)). Целью исследований являлась разработка способа активации бипрепарата ацидофильной закваски (на основе штамма L. acidophilus A-146) в технологии ржано-пшеничного хлеба. Этот штамм является термофильным, обладает высокой антагонистической активностью по отношению к плесневым грибам и спорообразующим бактериям, а также способностью продуцировать экзополисахариды, которые служат барьером между клетками и окружающей средой, выполняя протекторную функцию [1, 2].

В ФГАНУ НИИ хлебопекарной промышленности проведены исследования по изучению влияния различных дозировок пряностей на динамику роста молочнокислых бактерий (МКБ). Исследованы следующие пряности: имбирь, куркума, кориандр, розмарин, тмин, гвоздика в следующих количествах: 0%, 0,2%, 0,5%, 1%. Выявлено, что стимулирующее действие на рост микроорганизмов проявили имбирь в количестве 0,5%-1% (прирост количества клеток по отношению к контролю до 17%), куркума – 1%-2% (прирост до 50%) и кориандр – 0,5-2% (прирост до 26%). Вероятно, вносимые пряности обогащают среду витаминами и некоторыми другими веществами, которые стимулируют рост микробных клеток. Проведена серия опытов по активации биопрепарата различным соотношением пряностей в составе композиции (±100% от концентрации с максимальным приростом клеток): имбиря (0-1%), куркумы (0-2%) и кориандра (0-2%). Оптимизацию проводили методом композиционно униформ-ротатабельного планирования эксперимента по показателю количества клеток молочнокислых бактерий. В результате математической обработки экспериментальных данных была получена зависимость количества клеток МКБ от количества вносимых пряностей. Проведение оптимизации процесса методом сканирования позволило получить глобальный максимум выхода процесса, характеризующий оптимальные дозировки имбиря, куркумы и кориандра в составе композиции – 0,5%; 1,0%; 1,0% соответственно, обеспечивающие максимальный прирост биомассы МКБ L. acidophilus A-146.

Далее проведены исследования влияния активации биопрепарата разработанной композиции пряностей на технологические параметры процесса и качество ржано-пшеничного хлеба. Хлеб готовили традиционным способом на заквашенной заварке кислотностью 12-14 град. Композицию пряностей на стадии активации вносили в образец с биопрепаратом. Контрольным был образец хлеба, приготовленный с использованием биопрепарата без внесения пряностей. Органолептические (вкус, запах) и физико-химические показатели (кислотность, пористость) качества хлеба, приготовленного с использованием активированного композицией пряностей биопрепарата, были выше контроля.

В результате установлено, что применение пряностей и их композиции способствует интенсификации роста микробной биомассы, что приводит к ускорению накопления кислотности закваски и большему содержанию летучих кислот в технологии ржано-пшеничного хлеба. Разработан способ активации биопрепарата ацидофильной закваски с помощью композиции пряностей. Подана заявка на патент «Способ приготовления закваски» № 2016144969 от 16.11.2016.

Литература.
Пристатейная литература 1. Невская Е.В., Цыганова Т.Б., Головачева О.В. Исследование антимикробных свойств молочнокислых бактерий, применяемых в хлебопечении для приготовления заквасок// Хранение и переработка зерна. Научно практический журнал. – 2016. – № 2 (199) (Украина). – С. 44-47 2. Невская Е.В., Головачева О.В., Цыганова Т.Б. Разработка сухого биопрепарата с высокими антагонистическими свойствами к возбудителям микробной порчи хлеба // Инновационные технологии в пищевой промышленности: материалы XV Междунар. науч.- практ. конф., (Минск, 5-6 октября 2016 г.)/ РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Белоруси по продовольствию»: редкол.: З.В. Ловкис [и др.]. – Минск: ИВЦ Минфина, 2016 – С. 35-37

DEVELOPMENT OF METHODS OF BIOACTIVATION OF THE DIRECT INTRODUCTED DEHYDRATED LEAVEN FOR ITS RATIONAL USE IN RYE-WHEAT BREAD BAKING TECHNOLOGY

A.Kozionov

Federal State Autonomous Scientific Institution Research Institute of the baking industry ,

It was studied the effect of spices on biomass growth LAB, obtained composition of spices with the most positive for the growth of the biomass effect. Studied the effect of the introduction of spices composition in bakery products in the baking properties.

Key words: rye sourdough, acidophilic yeast, biological product, spices, technology

The use of biological products (dehydrated sourdough based on pure cultures LAB) in technology of baking bread is popular field of researching todays. This is because of the existing technology of produce of traditional sourdough is long and difficult process for factories. Application of biological products can not only ensure the quality, microbiological safety, increase the nutritional value of baked goods, but can also reduce the production cycle. One of the stages of preparation for the production of a biological product is activation - the creation of optimal conditions for increasing the efficiency of its use (intensification of biomass growth of the LAB, acidity, volatile acidity, organoleptic properties (taste, smell)). Purpose of research is provide a method for the activation of a biological product acidophilic ferment (based on the strain L. acidophilus A-146) in baking rye-wheat bread technology. This strain is a thermophilic, has a high antagonistic activity against molds and spore-forming bacteria, as well as the ability to produce exopolysaccharides that provide a barrier between the cells and the environment, performing the function of the tread [1, 2].

Research of the effect of different doses of spices on growth of lactic acid bacteria (LAB) was conducted in the FSASI SRI of the baking industry. We investigated the following spices: ginger, turmeric, coriander, rosemary, caraway, cloves in the following amounts: 0%, 0.2%, 0.5%, 1%. It was revealed that stimulating effect on the growth of the microorganisms was reached with ginger in an amount 0.5% -1% (increase in cell number relative to control up to 17%), with turmeric - 1% -2% (50% increase) and with coriander - 0 5-2% (an increase of up to 26%). Probably, introduced spices enrich the environment with vitamins and other substances that stimulate the growth of microbial cells. Series of experiments on the activation of a biological product by different spices were carried out in a composition ratio: ginger (0-1%), turmeric (0-2%) and coriander (0-2%). Optimization was performed by experimental compositional uniforms-rotatable planning according to the number of lactic acid bacterial cells. Because of the mathematical processing of the experimental data dependence of the number of cells on the number of LAB insertion spices was obtained. Carrying out the optimization by scanning method allowed us to obtain a global extremum of process outputs, characterizing the optimal dosage of ginger, turmeric and coriander in the composition - 0.5%; 1.0%; 1.0%, respectively, providing maximum biomass growth of LAB L. acidophilus A-146.

Then we studied the effect of the activation of a biological product by the developed composition of spices on the technological parameters of the process and the quality of rye-wheat bread. Bread was cooked in the traditional way with the fermented brewing leaves acidity 12-14 degrees. The composition of spices was added to the sample with a

biological product on the activation stage. The control sample was a sample of bread, baked with the biological product without adding spices. Organoleptic (taste, smell) and physic-chemical characteristics (acidity, porosity) of the quality of bread baked with the biological product activated by composition of spices, were higher than ones of the control sample.

As a result, established that the application of spices and their composition contribute to the intensification of the microbial biomass growth, which leads to faster accumulation of acidity of the leaven and more volatile acid content in the rye-wheat bread technology. A method of activation of the biological product of acidophilic leaven by the spices composition was developed. Patent application «Method of preparation of the leaven» № 2016144969 is submitted from 11.16.2016.

References:
Linked References: 1. Nevskaya E.V., Tsyganova T.B., Golovacheva OV Investigation of antimicrobial properties of lactic acid bacteria used in baking industry to prepare leavens // Storage and processing of grain. Scientific and practical journal. - 2016. - № 2 (199) (Ukraine). - P. 44-47 2. Nevskaya E.V., Golovacheva O.V., Tsyganova T.B. The development of dry biological product with high antagonistic properties to the agents of microbial spoilage of bread // Innovative technologies in the food industry: materials XV Intern. scien.- Pract. Conf., (. Minsk, October 5-6, 2016) / RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus Food»: the Editorial .: Z.V. Lovkis [et al.]. - Minsk: ITC Ministry of Finance, 2016 - P. 35-37

УДК: 57.022, ББК: 28

ГЕРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА СЪЕДОБНОГО БАЗИДИОМИЦЕТА PHALLUS IMPUDICUS С ПАРОДОКСАЛЬНЫМИ ЗАВИСИМОСТЯМИ ДОЗА-ЭФФЕКТ И ИХ МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ.

Ю.С.Козуб[1], А.Н.Разин[2], А.В.Кулырова[1]

[1]ЛГУ им. А.С. Пушкина , Россия, 196605, Санкт-Петербург, Пушкин, Петербургское шоссе, 10 , pharmlines@yandex.ru
[2]НПО БИОЛОКС , Russia, 198054, Санкт-Петербург, Белы Куна, 34

Впервые получены данные о геропротекторных свойствах базидиомицетов. Экстракты веселки обыкновенной Phallus impudicus дали беспрецедентный рост средней продолжительности жизни (СПЖ) моделей до 150%. Но зависимости доза-эффект немонотонные, с непредвиденно сильными максимумами при очень больших разведениях. Объяснение этих парадоксов в свойствах также изучаемых впервые биологически активных веществ (БАВ) веселки, что подтверждается и математическим моделированием кривых выживаемости (КВ).

Ключевые слова: геропротекторы, веселка обыкновенная, математическое моделирование в геронтологии, кривые выживаемости.

Цель работы: показать явные преимущества макромицетов в плане открытия новых вероятных геропротекторов, а также поиск наиболее адекватных подходов при создании реальных геропротекторных средств. Сегодня не известно агентов с достоверными свойствами замедлять старение людей. Но идет активный поиск потенциальных геропротекторов среди БАВ, увеличивающих СПЖ коротко живущих моделей. Для многих из них доказана ценность в терапии возрастных болезней. С 2015 все данные аккумулируют в Curated Database of Geroprotectors (CDG) [1].В первую очередь изучают БАВ следующих классов: антиоксиданты, иммуномодуляторы, сенолитики, нейропротекторы, цитостатические ингибиторы синтеза ДНК/РНК и сигнальных путей пролиферации клеток. Большая часть метаболитов, открытых в макромицетах, явные и наглядные примеры БАВ этих классов, но в CDGих пока нет. В народной медицине Европы популярен съедобный гриб веселка обыкновенная Ph. impudicus[2], [3], научно доказаны её противоопухолевые, тромболитические и антиоксидантные свойства [4], [5], [6]. Несмотря на это, биохимию Ph. impudicusранее не изучали. Однако, близкий тропический гриб Ph. indusiata, также популярен в народной медицине Китая. Отчасти изучены и его БАВ, включая: необычные алкалоиды [7] и сесквитерпены [8] сактивностью нейропротекторов, иммуномодулирующие полисахариды [9], [10] и антиоксидантные полифенолы [11] очень типичные для макромицетов. Таковы предпосылки настоящей работы, первому изучению геропротекторных свойств макромицетов и биохимии Ph. impudicus. Исходная тема - изучение на самых обычных моделях геронтологии, популяциях нематод Caenorhabditis elegans, действия водных и органических экстрактов веселки в разведениях 1-10000х. Водный экстракт 5000х дал беспрецедентный рост

СПЖ на 150%. Сходные результаты у экстрактов ацетонитрилом. Но зависимости доза-эффект оказались немонотонными с парадоксально сильными максимумами при очень высоких разведениях. Это объяснимо синергизмом разных присутствующих агентов, включая мягкие ингибиторы синтеза ДНК, очевидно, это специфичные цереброзиды. Они могут тормозить деление клеток и исчерпание предела Хейфлика, но лишь при их малых концентрациях, не дающих ответной экспрессии ферментов репарации ДНК, устраняющих это замедление. Для проверки выводов был успешно изолирован ряд БАВ веселки (алкалоиды, цереброзиды, полисахариды). Изучаются их свойства, включая геропротекторные, явно разноплановые. Также взят ряд нетрадиционных моделей с различными КВ. Часто напоминают, что тезис Винера всё ещё верен: «к настоящему времени адекватных моделей старения создано не было» [12]. Явная причина многофакторность природы старения. Но нужда анализа синергизма дала идею изучить влияние геропротекторов на конфигурацию КВ (кривизну, выпуклость, масштабирование по времени), а не на СПЖ. Есть основания считать, что влияние любого геропротектора представимо, как функционал, т.е. функция от функции, описывающей КВ, трансформирующая их практически однотипно для разных моделей, хотя сравнительно их СПЖ может сильно разниться. Формулы функционалов зависит от класса агентов и легко биологически интерпретируемы. Итог - априори многофакторная математическая модель анализа/симуляции КВ, хорошо описывающая данные CDGи результаты по веселке. Но этот подход явно требует проверки на широком спектре моделей, которых в CDGвсего 13, так что увеличение их числа ценно само по себе. Выводы: пример Ph. impudicus доказывает перспективность поиска геропротекторов в макромицетах, особо, с учетом синергизма комплексов их БАВ, создан новый потенциально ценный инструмент для математического анализа свойств геропротекторов.

Литература.
1. Curated Database of Geroprotectors [Электронный ресурс]. URL: http://www.geroprotectors.org (дата обращения 10.01.2017). 2. Kuznecovs S., Jegina K., Kuznecovs I., Kuznecova G. Phallus impudicus: from folk medicine to supportive cancer care //International journal of medicinal mushrooms. 2007. Vol. 9. № 3/4. P. 263. 3. Ralph W. Moss. Stinkhorn mushroom juice: latvian folk remedy shows promise against cancer //The cancer chronicles. №17. sept. 1993. 4. Kuznecovs S., Jegina K., Kuznecovs I., Kuznecova G. Phallus impudicus in thromboembolic disease prevention in cancer //16th MASCC international symposium //Supportive care in cancer. 2004. A-43. P.379. 5. Kuznecovs S., Jegina K., Kuznecova G. Phallus impudicus prolongs survival time of patients with advanced cancer in a prospective long-term epidemiological cohort study //Supportive care in cancer. 2006. Vol. 14. №. 6. June 2006. 09-063. P.616. 6. Разин А.Н. Технология получения биологически активной субстанции из Phallus impudicus и её применение для конструирования биопрепаратов с противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами: дис. … канд. биол. наук.- Москва, 2011. 7. Lee I. K., Yun B. S., Han G., Cho D. H., Kim Y. H., Yoo I. D. Dictyoquinazols A, B, and C, new neuroprotective compounds from the mushroom Dictyophora indusiata // Journal of Natural Products. 2002. Vol. 65. № 12. P.1769-1772. 8. Kawagishi H., Ishiyama D., Mori H., Sakamoto H., Ishiguro Y., Furukawa S., Li J. Dictyophorines A and B, two stimulators of NGF-synthesis from the mushroom Dictyophora indusiata // Phytochemistry. 1997. Vol. 45. №. 6. P. 1203- 1205. 9. Shigeo Ukai, Chihiro Hara, Tadashi Kiho. Polysaccharides in fungi. IX. A b-D-glucan from alkaline extract of Dictyophora indusiata fisch //Chemical and pharmaceutical bulletin. 1982. Vol. 30. №. 6. P. 2147-215. 10. Liao W., Luo Z., Liu D., Ning Z., Yang J., Ren J. Structure characterization of a novel polysaccharide from Dictyophora indusiata and its macrophage immunomodulatory activities //Journal of agricultural and food chemistry. 2015. Vol. 63. №. 2. P. 535-544. 11. Oyetayo V. O., Dong C. H., Yao Y. J. Antioxidant and antimicrobial properties of aqueous extract from Dictyophora indusiata //The Open Mycology Journal. 2009. Vol.3. №. 1. P. 20-26. 12. Новосельцев В.Н., Новосельцева Ж.А., Яшин А.И. Математическое моделирование в геронтологии - стратегические перспективы //Успехи геронтол. 2003. Т. 12. С. 149-165.

PHALLUS IMPUDICUS EDIBLE BASIDIOMYCETE GEROPROTECTIVE PROPERTIES WITH PARADOX DOSE-EFFECT RELATIONSHIPS AND THEIR MATHEMATICAL INTERPRETATION.

J.Kozub[1], A.Razin[2], A. Kulirova [1]

[1]Pushkin Leningrad State University, RUSSIA, 196605 , St Petersburg (Pushkin), Peterburgskoe shosse, 10
[2]NPO BIOLOX, Russia, 198054, Saint-Peterburg, Bely Kuna, 34

The data concerning geroprotective properties of basidiomycetes is obtained for the first time. Extracts from common stinkhorn Phallus impudicus showed unexampled animal-models mean life-span (MLS) growth up to 150%. But dose-effects relationships appeared to be non-monotonic, with strong counterintuitive maximums in highly diluted range. The paradoxes explanation is enclosed in stinkhorn bioactive substances (BAS) properties, which are under study also for the first time, and mathematical modeling of survivance curves (SC) confirming the explanation.

Key words: geroprotectors, common stinkhorn, mathematical modeling in gerontology, survivance curves.

The aim of the present work is to show macromycets' apparent benefits in respect with new probable geroprotectors discovery as well as to search the most adequate approaches for creating real geroprotective drugs. Today there aren't any known agents with verified ability to slow human ageing. But it is going on an active search for potential geroprotectors among BAS capable to increase short-lived models MLS. Many of them are proved to be valuable for age-related desiaees therapy.All the data since 2015 is accumulated in Curated Database of Geroprotectors (CDG) [1]. Under primary investigations there are agents belonging to the following classes: antioxidants, immunomodulators, senolytics, neuroprotectors, citostatic inhibitors of DNA/RNA synthesis and cell proliferation signal pathways. The most of metabolites discovered in macromycets are apparent and vivid examples of the above-listed classes BAS, but they are still absent in CDG. Common stinkhorn Ph. impudicus is popular in native medicine in Europe [2], [3]. It has scientifically verified anticancer, thrombolytic and antioxidant properties [4], [5], [6]. In spite of this Ph. impudicus biochemistry wasn't still studied. Nevertheless there is a relative tropical mushroom Ph. indusiatus which is similarly popular in Chinese native medicine. And some of its BAS are already-studied ones including: unusual alkaloids [7] and sesqueterpens [8] with neuroprotective activity and most typical for mushrooms immunomodulating polysaccharides [9], [10] with antioxidant polyphenols [11]. That is the background for the present work which is the first every investigation of macromycetes geroprotective properties and Ph. impudicus biochemistry. The initial topic was to study impacts of water and organic extracts of stinkhorn in dilations 1-10000x applied to the most common gerontologist model, nematodes Caenorhabditis elegans populations. An unexampled MLS growth up to 150% was achieved in the case of water extract with 5000x dilation. Similar results were shown by acetonitrilic extracts. But obtained dose-effects relationships appeared to be non-monotonic with counterintuitive strong maximums in high-dilated range. The mentioned paradoxes explanation is synergism of simultaneously presented agents including soft DNA synthesis inhibitors, obviously, i.e. specific cerebrosides. They can slow cell division and the Hayflick limit exhaust but in the only cases of their small concentrations which does not cause response expression of DNA repairing enzymes abolishing this slowing. Several BAS (alkaloids, cerebrosydes, polysaccharides) were successfully isolated from stinkhorn in order to check the conclusions. They properties are under study including geroprotective ones, which are apparently multifaceted. Moreover we are using a number of nontraditional models with multifarious SC. It has been often remembered that the Wiener's thesis is still true: «there aren't any adequate ageing models created nowadays» [12]. The definitive reason of this is multifactor nature of ageing. But the need of synergism analysis gave us an idea to study geroprotectors impact on SC configuration features (flexure, bulge, time-scalling), but not on MLS. There are reasons to consider that impact of the every geroprotector can be described as functional of SC, i.e. function taken from SC describing function and transforming them practically in monotypic maner in cases of different models, despite their comparative MLS changing can be very different. Functional's formula is class-dependent and has simple biological interpretation. The output is a priori multifactor SC analysis/simulation mathematical model with good description of CDG data and stinkhorn results. But the approach has apparent need to be checked on wide spectrum of animal-models, which are only 13 ones in CDG, thus their number enlargement is intrinsically valuable. Conclusions: Ph. impudicus example proves prospectively of geroprotectors search in macromycetes, especially, with taking into consideration synergism of BAS complexes; a new probable valueable tool for mathematical analysis of geroprotector properties was created.

References:
1.Curated Database of Geroprotectors [elektronnyy resurs]. URL: http://www.geroprotectors.org (data obrashcheniya 10.01.2017). 2. Kuznecovs S., Jegina K., Kuznecovs I., Kuznecova G. Phallus impudicus: from folk medicine to supportive cancer care //International journal of medicinal mushrooms. 2007. Vol. 9. № 3/4. P. 263. 3. Ralph W. Moss. Stinkhorn mushroom juice: latvian folk remedy shows promise against cancer //The cancer chronicles. №17. sept. 1993. 4. Kuznecovs S., Jegina K., Kuznecovs I., Kuznecova G. Phallus impudicus in thromboembolic disease prevention in cancer //16th MASCC international symposium //Supportive care in cancer. 2004. A-43. P.379. 5. Kuznecovs S., Jegina K., Kuznecova G. Phallus impudicus prolongs survival time of patients with advanced cancer in a prospective long-term epidemiological cohort study //Supportive care in cancer. 2006. Vol. 14. №. 6. June 2006. 09-063. P.616. 6. Razin A.N. Tekhnologiya polucheniya biologicheski aktivnoy substantsii iz vesolka obyknovennaya i yeyo primeneniye dlya konstruirovaniya biopreparatov s protivoopukholevymi i antioksidantnymi svoystvami: dis. .. kand. biol. nauk.- Moskva, 2011. 7. Lee I. K., Yun B. S., Han G., Cho D. H., Kim Y. H., Yoo I. D. Dictyoquinazols A, B, and C, new neuroprotective compounds from the mushroom Dictyophora indusiata //Journal of Natural Products. 2002. Vol. 65. № 12. P.1769-1772. 8. Kawagishi H., Ishiyama D., Mori H., Sakamoto H., Ishiguro Y., Furukawa S., Li J. Dictyophorines A and B, two stimulators of NGF-synthesis from the mushroom Dictyophora indusiata //Phytochemistry. 1997. Vol. 45. №. 6. P. 1203-1205. 9. Shigeo Ukai, Chihiro Hara, Tadashi Kiho. Polysaccharides in fungi. IX. A b-D-glucan from alkaline extract of Dictyophora indusiata fisch //Chemical and pharmaceutical bulletin. 1982. Vol. 30. №. 6. P. 2147-215. 10. Liao W., Luo Z., Liu D., Ning Z., Yang J., Ren J. Structure characterization of a novel polysaccharide from Dictyophora indusiata and its

macrophage immunomodulatory activities //Journal of agricultural and food chemistry. 2015. Vol. 63. №. 2. P. 535-544. 11. Oyetayo V. O., Dong C. H., Yao Y. J. Antioxidant and antimicrobial properties of aqueous extract from Dictyophora indusiata //The Open Mycology Journal. 2009. Vol.3. №. 1. P. 20-26. 12. Novosel'tsev V.N., Novosel'tseva ZH.A., Yashin A.I. Matematicheskoye modelirovaniye v gerontologii - strategicheskiye perspektivy // Uspekhi gerontol. 2003. Vol. 12. P. 149-165.

УДК: 571.27, ББК:

СОЗДАНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА НА ОСНОВЕ КАТИОННЫХ АМФИФИЛОВ И МОЛЕКУЛ МИРНК ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

О.О.Колоскова[1], А.С.Носова[2], У.А.Буданова[2], Ю.Л.Себякин[2], Е.А.Турецкий[3], А.А.Никольский[4], М.М.Купцова[4], К.К.Ведринская[4], И.П.Шиловский[4], В.В.Смирнов[4], М.Р.Хаитов[4]

[1]ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, oo.koloskova@nrcii.ru, +79258732920
[2]Московский технологический университет , Россия, 119571, Москва, проспект Вернадского, 86, c-221@yandex.ru,
[3]ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24
[4]ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина», Россия, 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

Создан иммунобиологический комплекс на основе молекул миРНК и катионных липосом, который является перспективной основой инновационного лекарственного препарата для терапии вирусного гепатита С.

Ключевые слова: миРНК, РНК-интерференция, гепатит С, катионные липосомы, трансфекция, иммунобиологический комплекс

Вирусный гепатит С (ВГС) представляет серьезную проблему для мирового здравоохранения. Существующие способы его терапии имеют свои недостатки, связанные с низкой эффективностью, развитием побочных эффектов и резистентности патогена к препарату. В связи с этим создание новых подходов к лечению ВГС продолжает оставаться актуальной задачей. Открытие интерференции РНК – механизма сиквенс-специфической регуляции генов посредством молекул малых интерферирующих РНК (миРНК) открыло новые возможности в создании противовирусных препаратов.

В данной работе сконструирован новый иммунобиологический комплекс, в состав которого вошли синтетические молекулы миРНК, подавляющие экспрессию регуляторного региона 5'UTR ВГС и катионные липосомы на основе липотрипептидов в качестве носителя. При этом поверхность липосом модифицирована производным лактозы для увеличения аттракции к клеткам печени за счет связывания с асиалгликопротеиновыми рецепторами.

На первом этапе была изучена цитотоксичность invitro и острая токсичность invivo, в результате данных исследований сконструированный комплекс можно отнести к классу малотоксичных соединений.

В экспериментах invitrona гепатоцитах Huh-7 была показана способность данного комплекса подавлять экспрессию субгеномного репликона вируса. Применение разработанного комплекса вызывает снижение репликации на 20-30%.

Проведено сравнительное исследование фармакокинетических параметров и биораспределения компонентов комплекса с немодифицированной и модифицированной галактозой поверхностью на мышах линии BALB/c. После внутривенного введения флуоресцентно меченных комплексов (модифицированного и немодифицированного) в дозе 50 мкг/мышь через 2, 5, 10, 20, 30, 45 и 60 минут у животных забирали кровь и печень, почки, легкие, селезенку, тимус, мышца бедра, головной мозг. Детекцию компонентов комплекса определяли в биоматериале методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией.

В результате показано, что максимальная концентрация компонентов комплекса в крови выявлена сразу после введения препарата (через 2 мин), а через 60 минут после введения компоненты комплекса не детектировались в крови, при этом период полувыведения для модифицированных углеводом липосом в почти 2 раза меньше чем для немодифицированных (около 4 мин и около 8 мин соответственно). Показано, что компоненты комплекса не детектируются в тимусе, мышцах и головном мозге, что позволяет предполагать отсутствие побочных явлений на опорно-двигательную и центральную нервную систему. В органе-мишени – печени компоненты комплекса детектируются в значительных количествах (Cmaxдля модифицированных –

19,04 нг/орган, Cmax для немодифицированных – 12,59 нг/орган), более того, период полувыведения препарата из печени один из самых высоких, в сравнении с другими органами. Модификация поверхности комплекса гликоконъюгатом значительно увеличивает его аттракцию к печени, а компоненты модифицированного комплекса начинают детектироваться в печении через 2 минуты (для липосом) и 5 минут (для миРНК) в сравнении с не модифицированным (через 10 минут после введения для липосом и миРНК).

В результате работы был сконструирован иммунобиологический комплекс на основе катионных липосом, модифицированных нейтральным углеводом, и молекул миРНК, подавляющих экспрессию региона 5'UTR вируса гепатита С, который способен адресно аккумулироваться в органе-мишени – печени и при этом обладающий низкой токсичностью.

DESIGN OF IMMUNOBIOLOGICAL COMPLEX BASED ON CATIONIC AMPHIPHILES AND SIRNA MOLECULES TO INHIBIT THE REPLICATION OF HEPATITIS C VIRUS

O.Koloskova[1], A.Nosova[2], U.Budanova[2], Y.Sebyakin[2], E.Turetskiy[3], A.Nikolskii[4], M.Kuptsova[4], K.Vedrinskaya[4], I.Shilovskii[4], V.Smirnov[4], M.Khaitov[4]

[1]NRC-Institute of Immunology FMBA of Russia, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye Shosse, 24
[2]Moscow Technological University (campus MITHT), Russia, 119571, Moscow, prospekt Vernadskogo, 86
[3]NRC-Institute of Immunology FMBA of Russia, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye Shosse, 24
[4]Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skrjabin, Russia, 109472, Moscow, akademika Skryabina str., 23

The immunobiological complex based on siRNA molecules and cationic liposomes was developed, it is a promising approach for the treatment of hepatitis C virus infection.

Key words: siRNA, RNA interference, hepatitis C virus, cationic liposome, transfection, immunobiological complex.

Hepatitis C virus (HCV) is a serious problem for global health. Current methods for its therapy have disadvantages associated with low efficiency, side effects and development the resistance of the pathogen. In this regard, design of new approaches to the treatment of HCV is still an urgent task. The discovery of RNA interference - the mechanism of sequence-specific gene regulation by synthetic molecules of small interfering RNA (siRNA) has opened up new possibilities in the design of antiviral drugs.

In this report we designed the novel immunobiological complex, consisting of the synthetic siRNA molecules inhibited the expression of regulatory 5'UTR region of HCV and cationic liposome based on lipotripeptides as a carrier. The surface of liposome was modified by the lactose derivative, that increased the complex attraction to liver cells by binding the asialglikoprotein receptors.

In vitro cytotoxicity and in vivo acute toxicity was studied on the first step. The designed complex can be classified as low-toxic compound.

In vitro experiments on the Huh-7 hepatocytes have demonstrated the ability to inhibit the expression of virus subgenomic replicon by our complex. Developed complex up to 20-30% reduced the expression of subgenomic replicon in this cells.

A comparative study of the pharmacokinetic and biodistribution parameters on BALB/c mice was carried out for the complexes which was modified and unmodified by galactose. After intravenous injection of fluorescently labeled complexes (modified and unmodified) at a dose of 50 mcg/mouse after 2, 5, 10, 20, 30, 45 and 60 minutes the blood were taken as well as organs, such as liver, kidneys, lungs, spleen, thymus, muscle, brain. Detection of the complex components in biomaterial was determined by HPLC with fluorescence detection.

The maximum concentration of complex components in the blood was detected immediately after administration (in 2 minutes) and complex components were not detected in the blood after 60 minutes of administration. The half-life of the liposomes modified by carbohydrate was almost in two times weaker than for unmodified (about 4 minutes and about 8 minutes, respectively). It was shown that the components of the complex are not detected in the thymus, muscle, and brain, that suggesting the absence of adverse effects on the musculoskeletal and central nervous system. The complex components (liposomes and siRNA) were detected in significant amounts in target organ - liver (for modified Cmax - 19.04 ng/organ, unmodified Cmax - 12.59 ng/organ), moreover, the half-life in the liver is one of the highest compared to other organs. Modification by glycoconjugates significantly increases the attraction to the liver, and the components of modified complex begin to be detected in the liver after earlier time (2 minutes to liposomes and 5 minutes for siRNA) compared with unmodified (10 minutes after the administration of liposomes and siRNA).

The immunobiological complex based on cationic liposomes, modified by neutral carbohydrate, and siRNA molecules, that suppress the expression of 5'UTR region in hepatitis C virus, was designed. The designed complex is capable to accumulate in the liver and has a low toxicity at the same time, it provide a promising approach to develop novel drugs.

УДК 57.571.27

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ IN VITRO КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ БИОАКТИВНОСТИ ИНТЕРФЕРОНОВ I И II ТИПОВ

Е.П. Коняева, К.В. Куликова, М.И. Лукашина, С.С. Ларин

Институт биологии гена Российской академии наук Москва, Россия
konyaeva@phystech.edu

Получены и охарактеризованы клеточные линии ISREP и PiGAS, позволяющие количественно определять специфическую биоактивность интерферонов I и II типов. Продемонстрирована возможность идентификации ингибирующих антител к интерферону-β с помощью линии ISREP.

Ключевые слова: интерфероны, STAT-сигнальный путь, рассеянный склероз, иммунодефициты.

Введение. Интерфероны (IFN) – это группа цитокинов, имеющая важное значение для диагностики и лечения заболеваний. Избыточная или недостаточная функция сигнального пути, запускаемого IFN-α, IFN-β или IFN- , является причиной различных патологических состояний иммунной системы и организма в целом. IFN-α,β, являются широко используемыми терапевтическими агентами, оказывающими противовирусное, микробицидное, иммуномодулирующее и антипролиферативное действия. В литературе описаны случаи возникновения нейтрализующих антител при длительном лечении одним и тем же препаратом интерферона [1].

Своевременное обнаружение нарушений в синтезе/секреции IFN-α,β а так же диагностика наличия антител к данным интерферонам помогут постановке верного диагноза и корректировке курса лечения. Традиционные тесты для определения биологической активности интерферонов технологически сложны, а их результаты плохо поддаются количественному учету. С помощью иммуноферментного анализа невозможно определить, обладают ли антитела к интерферону ингибирующим действием.

Таким образом, существует необходимость в разработке новых подходов для решения данных задач. Один из возможных методов – это создание модельных систем, основанных на способности интерферонов запускать сигнальные каскады, одним из которых является STAT-сигнальный путь (Signal Transducer and Activator of Transcription) [2].

Результаты. В ходе данной работы были созданы две модельные системы: PiGAS и ISREP (клеточные линии со стабильно интегрированной в геном экспрессионной кассетой).

Линия клеток PiGAS содержит интегрированную в геном конструкцию, содержащую повторы сайта связывания GAS (Interferon Gamma Activated Site) и репортерный ген люциферазы светлячка (FFly). При инкубации клеток с интерфероном- активируется STAT-1-сигнальный путь, что вызывает экспрессию гена люциферазы FFly.

ISREP представляет собой клеточную линию со стабильно

интегрированной в геном ISRE-зависимой репортерной

Конструкция содержит повторы сайта связывания ISRE (Interferon-Stimulated Response Element) и репортерный ген люциферазы светлячка (FFly). Клетки линии ISREP синтезируют люциферазу в ответ на обработку интерферонами-α,β.

Люциферазная активность измеряется количественно.

На примере клеточной линии ISREP продемонстрирована возможность использования данных тест-систем для определения наличия в биологических образцах антител к интерферону с ингибирующими свойствами.

Выводы. В рамках данной работы получены и охарактеризованы модельные клеточные линии PiGAS и ISREP, синтезирующие люциферазу в ответ на обработку интерферонами II типа (IFN-γ) и I типа (в частности, IFN-α,β), соответственно. Продемонстрирована возможность проведения количественного анализа биологической активности интерферонов I и II типа.

Литература:
1. Gilli F, Bertolotto A, Sala A, Hoffmann F, Capobianco M, Malucchi S, Glass T, Kappos L, Lindberg RL, Leppert D. Neutralizing antibodies against IFN-beta in multiple sclerosis: antagonization of IFN-beta mediated suppression of MMPs. // Brain. 2004. No127. P. 259-268.

2. Villarino AV, Kanno Y, Ferdinand JR, O'Shea JJ. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. // J Immunol. 2015. Vol. 194. No 1. P. 21-7

FUNCTIONAL CAPABILITIES OF QUANTITATIVE IN DETERMINATION OF TYPE I AND II IFNS´ BIOACTIVITY

Koniaeva E., Kulikova K., Lukashina M., Larin S.

Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Science Moscow, Russia
konyaeva@phystech.edu

Cell lines ISREP and PiGAS, enabling quantitative determination of type I and II IFNs' bioactivity, were established and characterized. The possibility of neutralizing anti- interferon antibodies identification was demonstraded using ISREP cell line.

Key words: interferons, STAT signaling pathway, antibodies to interferon, multiple sclerosis, immunodeficiency.

Abbreviations: IFN = Interferon, STAT = Signal Transducer and Activator of Transcription, ISRE = Interferon-Stimulated Response Element, GAS = Interferon Gamma Activated Site, FFly = FireFly.

Introduction. Interferons (IFNs) are the group of cytokines having a crucial importance for treatment and diagnosis of the illnesses. Dysfunction or overexpression of IFN-α,β, signalling causes different pathological states of immune system and whole organism. IFN-α,β, are widely used as therapeutic agents with antiviral, antimicrobial, immunostimulating and antiproliferative effects. It has been shown that neutralizing anti-interferon antibodies appear in patients treated with interferon for a long time.

Well-timed identification of IFN-α,β, synthesis or secretion defects and screening for neutralizing anti-interferon antibodies appearance could help to diagnose and to correct the treatment. Conventional IFNs bioactivity tests are technically complicated and/or their results are not suited for accurate quantitative analysis. It is impossible to define neutralizing anti-interferon antibodies using immunoassays (ELISA or Western-Blot).

Consequently, there is a necessity to develop new approaches for the solution of this problem. One of the possible ways is a creation of model systems based on the ability of IFNs to activate signal cascades, one of which is STAT signaling pathway (Signal Transducer and Activator of Transcription).

Results. To define the IFNs bioactivity two model systems were established: ISREP and PiGAS (cell lines with genome integrated reporter cassette).

PiGAS is represented by a stable cell line with GAS-reporter cassette including six tandem repeats of GAS-element (Interferon Gamma Activated Site) and firefly luciferase gene (FFly). Incubation of PiGAS cells with IFN-γ leads to STAT-1 signaling pathway activation caused the FFly gene expression.

ISREP is a stable cell line with ISRE-dependent reporter cassette. This cassette contains seven tandem repeats of ISRE-element (Interferon-Stimulated Response Element) and firefly luciferase gene (FFly). ISREP cells synthesize luciferase in response to IFN-α or IFN-β.

Luciferase activity is measured quantitatively.

The possibility of neutralizing anti-interferon antibodies identification in biological samples was demonstraded using ISREP cell line.

Conclusion. Cell lines ISREP and PiGAS, synthesizing luciferase in response to type I IFNs (IFN-α or IFN-β) and type II IFNs (IFN-γ), were established and characterized. The possibility of caring out the quantitative assay of type I and II IFNs' bioactivity was shown.

References:
1. Gilli F, Bertolotto A, Sala A, Hoffmann F, Capobianco M, Malucchi S, Glass T, Kappos L, Lindberg RL, Leppert D. Neutralizing antibodies against IFN-beta in multiple sclerosis: antagonization of IFN-beta mediated suppression of MMPs. // Brain. 2004. No127. P. 259-268.
2. Villarino AV, Kanno Y, Ferdinand JR, O'Shea JJ. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. // J Immunol. 2015. Vol. 194. No 1. P. 21-7

УДК: 579.695:579.262:579.222.2, ББК:

РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОВ ДЕГРАДАЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В МИКРОБНОМ СООБЩЕСТВЕ РАЙОНА ПРОМЫШЛЕННЫХ СОЛЕРАЗРАБОТОК (ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

Е.С.Корсакова, А.О.Воронина, Е.Г.Плотникова

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Россия, 614081, Пермь, Голева, 13, korsakovaekaterina08@gmail.com, 83422808431

Микробное сообщество района промышленной добычи солей (калийные предприятия ПАО «Уралкалий», Пермский край) характеризуется наличием гетерогенных генетических детерминант (в том числе генов narAa, bphA, ipbA, arhD), контролирующих разложение ароматических поллютантов.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, ароматические соединения, клонирование, библиотека генов

В последнее время все более актуальной становится проблема утилизации экологически опасных поллютантов, а именно, соединений, отнесенных к группе стойких органических загрязнителей, большинство из которых имеют техногенное происхождение, обладают токсичностью, биоаккумуляцией и устойчивостью к разложению. К таким загрязнителям относятся (моно)полициклические ароматические соединения (АС) (такие как нафталин, антрацен, фенантрен, бифенил, а также фталаты, бензол, толуол, этилбензол, ксилол, фенол) и их хлорированные производные. Большие количества АС поступают в окружающую среду в результате работы соледобывающих предприятий (Пермский край). Значительный вклад в методологию и разработку новых биотехнологий ремедиации загрязненных территорий вносят современные молекулярно-генетические методики, не требующие культивирования микроорганизмов, позволяющие получить широкое представление о разнообразии, экологии и генетике микроорганизмов, участвующих в процессах деструкции АС.

В результате скрининга тотальной ДНК, экстрагированной из образцов шламов и почв/грунтов территории калийных предприятий БКПРУ-1 и БКПРУ-3 ПАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край), в исследуемых пробах выявлено наличие ключевых генов деструкции АС. Выделенная ДНК была проверена на присутствие PAH-RHDα-генов (кодируют α-субъединицу диоксигеназ, гидроксилирующих ароматическое кольцо), а также гена bphA1 (кодирует α-субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, осуществляющей гидроксилирование ароматического кольца многих АС). По итогам амплификации генов PAH-RHDα и bphA1 с выделенной тотальной ДНК фрагменты нужного размера (302 п.н. и 470 п.н., соответственно) были обнаружены во всех образцах. Для дальнейшего исследования были выбраны два образца с наибольшей концентрацией искомых генов: поверхностного слоя шлама из шламохранилища БКПРУ-3 и грунта, отобранного вблизи солеотвала БКПРУ-3. Методом клонирования были созданы библиотеки PAH-RHDα-генов бактерий-деструкторов, входящих в состав микробного сообщества исследуемого шлама (24 рекомбинантных клона) и бактериальных bphA1-генов из техногенного грунта (73 рекомбинантных клона). Последующее секвенирование рекомбинантных клонов и биоинформационный анализ полученных нуклеотидных последовательностей bphA1- и PAH-RHDα-генов показал, что в бактериальном сообществе образца шлама присутствуют гены α-субъединицы нафталин диоксигеназы (narAa) и α-субъединицы диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо углеводородов (PAHring-hydroxylatingdioxygenase) преимущественно некультивируемых форм бактерий и ряда штаммов рода Pseudomonas. Данные нуклеотидные последовательности были депонированы в базе данных GenBank под номерами KY288483, KY319060-KY319065. Установлено, что микробном сообществе грунта (вблизи солеотвала калийного предприятия) присутствуют гены трех типов диоксигеназ: бифенил 2,3-диоксигеназы (bphA), изопропилбензол 2,3-диоксигеназы (ipbA) и диоксигеназы, гидроксилирующей ароматическое кольцо (arhD). Таким образом, полученные результаты указывают на присутствие гетерогенных генетических систем деструкции АС в бактериальном сообществе района солеразработок и послужат основой для дальнейших инновационных работ, направленных на решение задач по очистке загрязненных территорий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01009 мол_а.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-01009 мол_а.

THE DIVERSITY OF GENES DEGRADATION OF AROMATIC COMPOUNDS IN THE MICROBIAL COMMUNITY OF THE INDUSTRIAL SALT MINING AREA (PERM KRAI)

E.Korsakova, A.Voronina, E.Plotnikova

FSBES INSTITUTE OF ECOLOGY AND GENETICS OF MICROORGANISMS UB RAS, Russia, 614081, Perm, Golev, 13

Microbial community of industrial salt mining area (potash plant PJSC «Uralkali», Perm Krai) is characterized by a heterogeneous genetic determinants (including genes narAa, bphA, ipbA, arhD), controlling the degradation of aromatic pollutants.

Key words: bacteria-destructors, aromatic compounds, cloning, gene library

Recently increasingly urgent becomes the problem of utilization of environmentally hazardous pollutants, namely, compounds referred to a group of resistant organic pollutants, the majority of which have a technogenic origin, toxicity, bioaccumulation and resistance to degradation. Such pollutants include (mono) polycyclic aromatic compounds (AC) (such as naphthalene, anthracene, phenanthrene, biphenyl and phthalates, benzene, toluene, ethylbenzene, xylene, phenol) and their chlorinated derivatives. A large amount of AC released to the environment as a result of salt-mining enterprises (Perm Krai). The significant contribution to methodology and development of new biotechnologies for the remediation of contaminated areas bring modern molecular and genetic techniques that do not require cultivation of microorganisms, which allows obtaining a wide representation of the diversity, ecology and genetics of microorganisms involved in destruction processes the degradation processes of the AC.

As a result of screening of the total DNA extracted from sludge samples and soils from the territory of potash enterprises of Mine-1 and Mine-3 of PJSC «Uralkali» (Berezniki, Perm Krai) in the studied samples the presence of key genes of AC destruction is revealed. The isolated DNA was tested for the presence of PAH-RHDα-gene (encoding α-subunit of dioxygenases, hydroxylated aromatic ring) and bphA1-gene (encoding the α-subunit of biphenyl 2,3-dioxygenase, carrying out hydroxylation of the aromatic ring of many AC). According to the results of amplification of genes PAH-RHDα and bphA1 with isolated total DNA fragments of the desired size (302 bp and 470 bp, respectively) were detected in all samples. For further study were selected two samples with the highest concentration of the desired genes: the surface layer of the sludge from the sludge storage Mine-3 and soil taken near the salt storage Mine-3. By cloning have been created PAH-RHDα-genes libraries of bacteria-destructors, members of the microbial community of the investigated sludge (24 recombinant clones), and bacterial bphA1-genes from the anthropogenic soil (73 recombinant clone). Subsequent sequencing of recombinant clones and bioinformatics analysis of the obtained nucleotide sequences of bphA1- and PAH-RHDα genes showed that the bacterial community of sludge sample contains genes encoding the α-subunit of naphthalene dioxygenase (narAa) and α-subunit of dioxygenase, hydroxylating aromatic hydrocarbon ring (PAH ring-hydroxylating dioxygenase) mostly uncultivated forms of bacteria and some strains of the genus Pseudomonas. Nucleotide sequence data were deposited in the GenBank database under the numbers KY288483, KY319060-KY319065. It is established that the microbial community of soil (near salt potash company) contains a genes of three types of dioxygenase: biphenyl 2,3-dioxygenase (bphA), isopropyl 2,3-dioxygenase (ipbA) and dioxygenase, hydroxylating aromatic ring (arhD). Thus, the obtained results indicate the presence of heterogeneous genetic systems of AC degradation in the bacterial community of a salt mining area and will serve as a basis for further innovative work aimed at solution of problems for cleaning up the contaminated areas.

The study was performed with financial support RFBR, research project No. 16-34-01009 mol_a.

Grant: The study was performed with financial support RFBR, research project No. 16-34-01009 mol_a.

УДК 579.6:615.331

ВЫДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ИЗ ЛИЧИНОК GALLERIA MELLONELLA И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ИХ СВОЙСТВ

Крылова Л.С., Ларионова О.С., Древко Я.Б.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия, 410012, г. Саратов, Театральная пл.,1
E-mail: krilovalyubov@yandex.ru

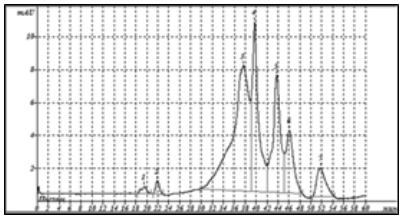
Выделены антимикробные пептиды из личинок большой восковой моли Galleria mellonella, изучена их антимикробная активность в отношении патогенных и условно-патогенных штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, высокоэффективная жидкостная хроматография, антимикробная активность, штаммы.

В последние годы антимикробные пептиды (АМП) привлекают к себе пристальное внимание исследователей, поскольку они обладают антимикробной, фунгицидной и противоопухолевой активностью и могут быть использованы для лечения заболеваний различной этиологии.

Целью наших исследований явилось выделение и изучение АМП из биомассы личинок Galleria mellonella, для обоснования возможности конструирования антимикробных препаратов нового поколения.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) нами были выделены белковые фракции. ВЭЖХ проводили на колонке BioSep S2000 300x2120 mm, при длине волны 280 нм, объем петли 1575 мкл, элюентом являлся 0,1 М фосфатносолевой буфер.



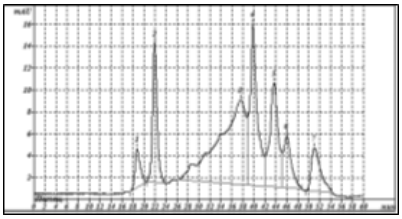


Рисунок 1 – Хроматограмма № 1 **Рисунок 2** – Хроматограмма № 2

Как видно из хроматограммы № 1 нами были выделены 7 белковых фракций из биомассы личинок Galleria melonella на стадии до окукливания и 7 белковых фракций (хроматограмма № 2) на стадии окукливания.

В соответствии с хроматограммами нами было определено процентное содержание, выделенных антимикробных пептидов от общего количества водорастворимых пептидов. Концентрацию белка полученных фракций определяли методом Лоури на спектрофотометре Shimadzu UV-1280 при длине волны 450 нм.

Антимикробную активность определяли по отношению к различным микроорганизмам, Bacillus cereus, Candida albicans, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium. Установлено, что антимикробной активностью обладала белковая фракция № 3 в концентрации 18 мкг/мл (оптическая плотность 0,075) в отношении Candida albicans, Staphylococcus aureus. Белковая фракция №6 в концентрации 111 мкг/мл (оптическая плотность 0,103) обладала антимикробной активностью ко всем группам микроорганизмов (рис. 1). Аналогичные данные были получены при исследовании АМП, полученных из личинок Galleria melonella на стадии окукливания (рис. 2).

Таким образом, исследования в данной области являются предпосылками к созданию антибактериальных препаратов нового поколения, и наряду с этим позволят решить проблемы терапии заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами и профилактики болезней различной этиологии.

Литература.
1. Parachin N.S., Franco O.L. New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance // Frontiers in Microbiology. 2014. P. 1-145.
2. Van der Weerden N. L., Bleackley M. R., Anderson M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides // Cellular and Molecular Life Sciences. 2013. Vol. 70. P. 3545-3570.
3. Wang G., Mishra B., Lau K., Lushnikova T., Golla R., Wang X. Antimicrobial Peptides in 2014 // Pharmaceuticals. 2015, Vol. 8. P. 123-150.

UDC 579.6:615.331

INDICATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FROM GALLERIA MELLONELLA LARVA AND SOME OF THEIRS PROPERTIES RESEARCH

Krylova L.S., Larionova O.S., DrevkoYa.B.

Federal State Budgetary Educational University of Higher Education Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov; Saratov, Russia, 410012, Saratov, Teatralnaya square,1
E-mail: krilovalyubov@yandex.ru

The antimicrobial peptides from bee-moth Galleria mellonella were indicated and theirs antimicrobial activity against pathogenic and opportunistic pathogenic microflora was studied.

Key words: antimicrobial peptides, high-performance liquid chromatography, antimicrobial activity, strains.

In recent years, antimicrobial peptides (AMPs) have attracted attention of researchers, as they possess antimicrobial, antifungal and antitumor activity and can be used to treat diseases of different etiology.

The goal of our research was indication and research of AMPs of biomass of Galleria mellonella for substantiation of possibility to design new generation of antimicrobial preparation.

The peptides particles were indicated by high-performance liquid chromatography (HPLC). HPLC was carried out on column BioSep S2000 300x2120 mm, at the wavelength 280 nm, test portion 1575 µl, the eluent was 0,1 M phosphate buffer saline.

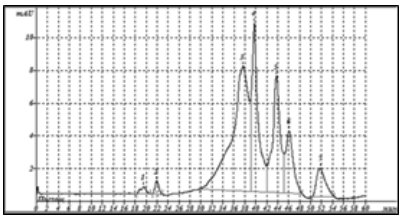


Figure 1 – Chromatograph № 1

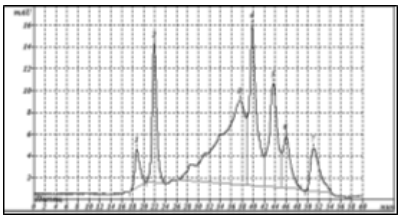


Figure 2 –Chromatograph № 2

As shown in (chromatograph № 1) were indicated 7 peptides particles from biomass of Galleria melonella larva in stage before pupation and 7 peptides particles (chromatograph № 2) on stage of pupation.

In according to chromatographs were determined the percentage composition of indicated antimicrobial peptides of the total number of water-soluble peptides. The peptide concentrations of obtained particles were determined by Lowry's method on spectrophotometer ShimadzuUV-1280 at the wavelength 450 nm.

Antimicrobial activity was determined against to different microorganisms, Bacillus cereus, Candida albicans, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium.

The peptide particle № 3 had an antimicrobial activity in concentration 18 µg/ml (optical density 0,075) toward to Candida albicans, Staphylococcus aureus. The peptide particle № 6 had an antimicrobial activity in concentration 111µg /ml (optical density 0,103) toward to all groups of microorganisms (Fig. 1). The similar antimicrobial activity was established during AMPs research obtained from Galleria melonella larva on stage of pupation (Fig. 2).

Consequently, the research in this field precipitate to antibacterial preparation development of new generation and at the same time will allow deciding the problem of treatment diseases caused by antibiotic-resistant strains and prevention diseases of different etiology.

References:
1. Parachin N.S., Franco O.L. New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance // Frontiers in Microbiology. 2014. P. 1-145.
2. Van der Weerden N. L., Bleackley M. R., Anderson M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides // Cellular and Molecular Life Sciences. 2013. Vol. 70. P. 3545-3570.
3. Wang G., Mishra B., Lau K., Lushnikova T., Golla R., Wang X. Antimicrobial Peptides in 2014 // Pharmaceuticals. 2015, Vol. 8. P. 123-150.

УДК: 579.6: 543.94, ББК:

ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕТИЛОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ БИОКАТАЛИЗАТОРА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕДИАТОРНОГО БИОСЕНСОРА.

Т.А.Кузнецова

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», РФ, 300600, Тула, проспект Ленина, 92, tatulyakuz@mail.ru, 8-903-659-62-84

Методом аффинной металл-хелатной хроматографией на колонке с Ni2+- NTA-агарозой получен гомогенный препарат рекомбинантной метанолдегидрогеназы из метилобактерий Methylobacterium extorquens AM1 и проведена его характеристика.

Ключевые слова: метилобактерии, метанолдегидрогеназа, рекомбинантные белки, аффинная хроматография, амперометрический биосенсор.

Использование PQQ-зависимых дегидрогеназ при разработке биоаналитических систем является перспективным направлением развития аналитической биотехнологии. PQQ-зависимая метанолдегидрогеназа (МДГ) грамотрицательных метилобактерий (КФ 1.1.2.7) – периплазматический растворимый белок. Наиболее эффективно фермент катализирует окисление метанола до формальдегида (КМ ~ 20 мкМ), передавая электроны в клетках на специфический кислый цитохром cL. Использование МДГ в биоэлектрокатализе отражено в научной литературе весьма фрагментарно (Suye etal., 1996; Liu and Kirchhoff 2007).

Применению ферментов в распознающих элементах биосенсоров предшествует стадия разработки методов получения активных гомогенных белков. Для выделения и очистки нативной PQQ-МДГ обычно используются классические хроматографические методы (Liu et al., 2006). Применение современной методологии получения рекомбинантных белков, основанной на клонировании соответствующих генов, их экспрессии в штаммах-суперпродуцентах с последующей очисткой фермента посредством аффинной металл-хелатной хроматографии, позволяет во многом упростить процедуру получения гомогенной МДГ. Следует отметить, что исследования по получению рекомбинантных МДГ и изучению их свойств ранее не проводились и являются актуальными задачами биохимии и биоаналитики. Целью данной работы является очистка и характеристика свойств рекомбинантной МДГ метилобактерий Methylobacterium extorquens для использования в качестве биораспознающего элемента амперометрического биосенсора.

На первом этапе работы был сконструирован экспрессионный вектор pCM160/mxaF_Mext, содержащий конститутивный промотор МДГ, ген mxaF, кодирующий большую α-субъединицу МДГ, и нуклеотидную последовательность, кодирующую шесть аминокислотных остатков гистидина. Для получения функционально-активной МДГ в качестве штамма хозяина использовали штамм Methylobacterium extorquens AM1. Плазмидные конструкции переносили в клетки метилобактерий методом коньюгации из клеток E. coli S17-1. Впервые методом аффинной металл-хелатной хроматографией на колонке с Ni2+- нитрилтрилацетатной (NTA)-агарозой получен гомогенный препарат рекомбинантной МДГ из метилотрофных бактерий Methylobacterium extorquens AM1 и проведена его характеристика. В отличие от метода очистки нативной МДГ, одностадийная очистка рекомбинантного фермента более экономична, что особенно важно при создании расходных материалов для биосенсорного анализа. Проведено сопоставление полученных данных с известными для нативных МДГ (Liu et al., 2006; Кузнецова с соавт., 2012), что является необходимым этапом для прогнозирования биокаталитических свойств фермента при разработке амперометрического медиаторного биосенсора на его основе. Доказано, что благодаря высокой стабильности и сродству к метанолу, рекомбинантная МДГ может служить одним перспективным биокатализаторов амперометрического биосенсора для определения содержания метанола.

Литература.
1. Suye, S.-I. Mediated amperometric determination of ammonia with a methanol dehydrogenase from Pseudomonas sp. AM-1 immobilized carbon paste electrode / S.-I. Suye, Y. Nakamura, S. Inuta, T. Ikeda, M. Senda // Biosens. Bioelectron. – 1996. – V. 11 – № 5. – P. 529-534. 2. Liu, Q. A rapid method for the purification of methanol dehydrogenase from Methylobacterium extorquens / Q. Liu, J.R. Kirchhoff, C.R. Faehnle, R.E. Viola, R.A. Hudson // Protein Expr. Purifi. – 2006. – V. 46. – № 2. – P. 316–320. 3. Liu, Q. Amperometric detection of methanol with a methanol dehydrogenase modified electrode sensor / Q. Liu and

J.R. Kirchhoff // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2007. – V. 601. – № 1-2. – P. 125-131 4. Кузнецова, Т.А. Очистка и свойства метанолдегидрогеназы ризосферного фитосимбионта Methylobacterium nodulans / Т.А. Кузнецова, А.П. Бесчастный, О.Н. Понаморева, Ю.А. Троценко // Прикл. биохим. микробиол. – 2012. – Т. 48. – № 6. – С. 606-611.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а №16-34-00409.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT METHANOL DEHYDROGENASE FROM METHYLOBACTERIA FOR CREATION OF AMPEROMETRIC MEDIATOR BIOSENSOR

T.Kuznetsova

Tula state university, Russian Federation, 300600, Tula, Lenin avenue, 92

Recombinant methanol dehydrogenase from methylotrophic bacteria Methylobacterium extorquens AM1 has been purified for the first time to an electrophoretically homogeneous state by affinity metal-chelate column chromatography on Ni2+ NTA-agarose and characterized.

Key words: methylobacteria, methanol dehydrogenase, recombinant proteins, affinity chromatography, amperometric biosensor.

The promising direction in the development of analytical biotechnology is the using of the PQQ-dependent dehydrogenases in bioanalytical systems. The MDH (EC 1.1.2.7) of Gram-negative methylobacteria is known to be a soluble periplasm protein. The enzyme catalyzes most effectively the oxidation of methanol to formaldehyde (KM is ~20 μM), transferring electrons in to specific acidic cytochrome cL. In the scientific literature the using of MDH as biocatalyst reflected is quite fragmented (Suye et al, 1996;. Liu and Kirchhoff 2007).

The application of enzymes in biosensors as the biocatalysts preceded a stage of development of methods for obtaining a homogeneous protein. Classical chromatographic methods generally used for isolation and purification of native PQQ-MDH (Liu et al., 2006). The application of modern recombinant protein production methodologies, based on the cloning of the corresponding genes and their expression in strains superproducer-enzyme followed by purification by metal-chelate affinity chromatography enables greatly simplify the procedure for obtaining a homogeneous MDH. It will be noted that the studies of purification and characterization of the recombinant MDH and the study of their properties previously not carried out and are topical tasks of biochemistry and bioanalytics. The aim of this work was the purification and characterization of the properties of recombinant MDH methylobacteria from Methylobacterium extorquens for creation of amperometric mediator biosensor.

At the first the expression vector pCM160 / mxaF_Mext, containing a constitutive promoter MDH gene mxaF, encoding the large subunit of α-MDH and the nucleotide sequence encoding six histidine residues was constructed. Methylobacterium extorquens AM1 was using as a host-strain. Plasmid constructs were passed on the methylobacteria cells by conjugation from E. coli S17-1. Recombinant MDH from methylotrophic bacteria Methylobacterium extorquens AM1 has been purified for the first time to an electrophoretically homogeneous state by affinity metal-chelate column chromatography on Ni2+ NTA-agarose and characterized. In contrast to the method of purification of the native MDH, one-step purification of the recombinant enzyme is more economical, which is especially important when creating consumables for biosensor analysis. A comparison of the data for the known native MDH (Liu et al, 2006;. Kuznetsov et al, 2012), which is a necessary step for predicting the biocatalytic properties of the enzyme mediator in the development of amperometric biosensor based on it. Therefore, the high level of stability and affinity to methanol makes recombinant MDH one of the most promising enzymes for the creation of amperometric biosensors for the methanol determination.

References:
1. Suye, S.-I. Mediated amperometric determination of ammonia with a methanol dehydrogenase from Pseudomonas sp. AM-1 immobilized carbon paste electrode / S.-I. Suye, Y. Nakamura, S. Inuta, T. Ikeda, M. Senda // Biosens. Bioelectron. – 1996. – V. 11 – № 5. – P. 529-534. 2. Liu, Q. A rapid method for the purification of methanol dehydrogenase from Methylobacterium extorquens / Q. Liu, J.R. Kirchhoff, C.R. Faehnle, R.E. Viola, R.A. Hudson // Protein Expr. Purifi. – 2006. – V. 46. – № 2. – P. 316–320. 3. Liu, Q. Amperometric detection of methanol with a methanol dehydrogenase modified electrode sensor / Q. Liu and J.R. Kirchhoff // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2007. – V. 601. – № 1-2. – P. 125-131 4. Kuznetsova, T.A. Purification and Characterization of Methanol Dehydrogenase of Methylobacterium nodulans Rhizosphere Phytosymbionts/ T. A. Kuznetsova, A. P. Beschastny, O. N. Ponamoreva, and Yu. A. Trotsenkoa// Applied Biochemistry and Microbiology, 2012, Vol. 48, No. 6, pp. 606-611.

Grant: The work was carried out with support by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-34-00409).

УДК: 57.085.23, ББК: 28.073

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА МОРФОЛОГИЮ И ПРОЛИФЕРАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В.В.Кузьменко, И.Е.Станишевская

Институт Биохимических технологий и Нанотехнологий Российского Университета Дружбы Народов, Россия, 117198, Москва, Миклухо-Маклая, 10/2, kuzmenko.valeria@gmail.com, 89152425783

В современном мире клеточные технологии представляют большой интерес как для ученых, так и для клиницистов. Однако оптимальная методика культивирования различных клеточных линий отрабатывается и по сей день. В пассировании культур клеток остро стоит вопрос поддержания стерильности клеточных линий. В лабороторной практике используется стандартная смесь антибиотиков, которая не всегда может быть использована в рамках конкретного эксперимента, или не может обеспечить стерильность культуры в связи с развитием резистентности у микроорганизмов к этим антибиотикам, что приводит к контаминации клеточной линии. В статье рассмотрено использование наноразмерных частиц серебра в качестве антимикробного агента для обеспечения стерильности клеточных культур. Проведен анализ метода синтеза наночастиц, и оценено влияние наносеребра на морфологию и пролиферацию клеточных культур на примере мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Ключевые слова: наночастицы серебра, мезенхимальные стволовые клетки, культивирование клеток, токсичность нанообъектов, клеточная дифференциация.

В докладе рассмотрено использование наноразмерных частиц серебра в качестве антимикробного агента для обеспечения стерильности клеточных культур. Проведен анализ метода синтеза наночастиц, и оценено влияние наносеребра на морфологию и пролиферацию клеточных культур на примере мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

В работе использовался метод синтеза наночастиц серебра с помощью восстановления танина солями серебра: 0,001% из соли AgNO3, 0,002% из соли AgNO3, 0,001% из соли Ag2SO4, 0,002% из соли Ag2SO4.

Культивирование клеток проходило в течение трех недель с постоянной экспозицией наночастиц. Суспензии наночастиц серебра добавляли в культуры клеток по следующей схеме:

1. Отрицательный контроль: МСК в среде без антибиотика и без наночастиц (DMEM+глутамин+0,1% раствор незаменимых аминокислот +10% фетальной бычьей сыворотки).
2. Положительный контроль: МСК в среде с антибиотиком (DMEM+глутамин+0,1% раствор незаменимых аминокислот +10% фетальной бычьей сыворотки+0,05% пенициллин+0,05%стрептомицин).
3. 0,001% Ag из AgNO3 (DMEM+глутамин+0,1% раствор незаменимых аминокислот +10% фетальной бычьей сыворотки +1 мл 0,001% Ag из AgNO3).
4. 0,002% Ag из AgNO3 (DMEM+глутамин+0,1% раствор незаменимых аминокислот +10% фетальной бычьей сыворотки+1 мл 0,002% Ag из AgNO3).
5. 0,001% Ag из Ag2SO4 (DMEM+глутамин+0,1% раствор незаменимых аминокислот +10% фетальной бычьей сыворотки+1 мл 0,001% Ag из Ag2SO4).
6. 0,002% Ag из Ag2SO4 (DMEM+глутамин+0,1% раствор незаменимых аминокислот +10% фетальной бычьей сыворотки+1 мл 0,002% Ag из Ag2SO4).
7. 0,004% Ag из Ag2SO4 (DMEM+глутамин+0,1% раствор незаменимых аминокислот +10% фетальной бычьей сыворотки+2 мл 0,002% Ag из Ag2SO4).

В результате проведенных исследований было установлено, что низкие концентрации наночастиц из солей нитрата и сульфата серебра не оказывают существенного влияния на морфологию клеток в течение непродолжительного культивирования, или его нельзя назвать достоверным. Для того, чтобы достоверно установить влияние природы соли на физиологическое состояние МСК, необходимо провести анализ состояния маркерных молекул, характерных для данного типа клеток. Также для предотвращения микробной контаминации, необходимо увеличить концентрацию серебра в культуральной среде. Увеличение объема добавляемой суспензии недостаточно, так как конечное содержание наносеребра все равно слишком мало, чтобы обеспечивать антимикробную защиту, а лишние миллилитры суспензии слишком сильно разбавляют культуральную среду, что создает дефицит питательных веществ для клеток, а это в свою очередь заставляет их входить в стадию апоптоза. Таким образом, необходимо модифицировать метод приготовления суспензии наночастиц серебра, увеличив концентрацию наночастиц, либо уменьшив жидкую фазу суспензии.

Литература.
1. Khaydarov R.A, Khaydarov R.R., Estrin Y., Cho S., Scheper T, and Endres C, «Silver nanoparticles: Environmental and human health impacts», Nanomaterials: Risk and Benefits, Series: NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security, 2009, Springer, Netherlands, pp. 287—299 ISSN 1874-6519 URL 2. C. Greulich & S. Kittler & M. Epple & G. Muhr & M. Köller/ Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs) /Langenbecks Arch Surg (2009) 394:495–502. 3. Xujie Liu, Wei He, Zhou Fang/ Influence of Silver Nanoparticles on Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells/ J. Biomed. Nanotechnol. 2014, Vol. 10, No.7/ 1277–1285/ 4. Christina Sengstock, Jörg Diendorf, Matthias Epple/ Effect of silver nanoparticles on human mesenchymal stem cell differentiation/ Beilstein J. Nanotechnol. 2014, 5, 2058–2069/ 5. Kern S., Eichler H., Stoeve J./ Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue/ Stem Cells. – 2006. – Vol.24. – P. 1294 – 1301.

Финансирование: Институт Биохимических технологий и Нанотехнологий Российского Университета Дружбы Народов

INFLUENCE OF SILVER NANOPARTICLE ON MORPHOLOGY AND PROLIFERATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS

V.Kuzmenko, I.Stanishevskaya

Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology (IBTN) of People's Friendship University of Russia (PFUR), Russia, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya, 10/2

Nowadays regenerative medicine and cells technologies become more and more actual for both scientists and clinicians. However, even today different cell cultivation methods are worked towards in science. Cell line sterility maintenance issue is obvious to be one of the important problems in biotechnology. Common antibiotic mixture is used in laboratory practice. But these antibiotics are not always possible to resort to in some of experiments and they cannot provide any culture sterility by reason of microorganism antibiotic resistibility. Consequently, cell line contamination is coursed by this process. The issue of nano-sized silver particle usage as an antimicrobial agent for providing cell line sterility is the subject of the article. Some methods of nanoparticle synthesis analysis is carried on, silver nanoparticle influence on cell culture morphology and proliferation is estimated in terms of mesenchymal stem cells.

Key words: silver nanoparticles, mesenchymal stem cells, cell cultivation, nanotoxicology, cell differentiation.

The report examines the use of nanoscale particles of silver as an antimicrobial agent to ensure the sterility of cell cultures. The analysis of the method of synthesis of nanoparticles, and evaluated the effect of nanosilver on the morphology and proliferation of cell cultures by the example of mesenchymal stem cells (MSCs).

We used a silver nanoparticle synthesis method using a recovery tannin silver salts: salts of 0.001% AgNO3, 0,002% of the salts AgNO3, 0,001% Ag2SO4 salt, from 0.002% Ag2SO4 salt.

Culturing the cells took place for three weeks with a permanent exhibition of nanoparticles. Suspensions of silver nanoparticles was added to the culture cells as follows:

1. negative control: MSCs in medium without antibiotic and without nanoparticles (DMEM + Glutamine + 0.1% solution of essential amino acids + 10% fetal bovine serum).
2. Positive control: MSCs in antibiotic medium (DMEM + Glutamine + 0.1% solution of essential amino acids + 10% fetal bovine serum + 0.05% + 0.05% penicillin streptomycin).
3. 0,001% Ag in AgNO3 (DMEM + Glutamine + 0.1% solution of essential amino acids + 10% fetal bovine serum 1 ml of 0,001% Ag AgNO3).
4. 0,002% Ag in AgNO3 (DMEM + Glutamine + 0.1% solution of essential amino acids + 10% fetal bovine serum + 1 ml of 0,002% Ag AgNO3).
5. 0,001% Ag of Ag2SO4 (DMEM + Glutamine + 0.1% solution of essential amino acids + 10% fetal bovine serum + 1 ml of 0,001% Ag Ag2SO4).
6. 0,002% Ag of Ag2SO4 (DMEM + Glutamine + 0.1% solution of essential amino acids + 10% fetal bovine serum + 1 ml of 0,002% Ag Ag2SO4).
7. 0,004% Ag of Ag2SO4 (DMEM + Glutamine + 0.1% solution of essential amino acids + 10% fetal bovine serum + 2 mL of 0,002% Ag Ag2SO4).

As a result of studies, it was found that low concentrations of nanoparticles of silver does not significantly affect the morphology of the cells in culture for a short, or it can not be considered reliable. In order to reliably establish the

influence of nanoparticles on the physiological state of MSC, it is necessary to analyze the state of the marker molecules of cells. To prevent microbial contamination, it is necessary to increase the silver concentration in the culture medium. The final content of nanosilver is not enoght to provide antimicrobial protection and extra milliliters suspension too much diluted with the culture medium, thats why cells go into apoptosis. Thus, it is necessary to modify the method of preparation of the suspension of silver nanoparticles, the nanoparticles increasing the concentration.

References:
1. Khaydarov R.A, Khaydarov R.R., Estrin Y., Cho S., Scheper T, and Endres C, «Silver nanoparticles: Environmental and human health impacts», Nanomaterials: Risk and Benefits, Series: NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security, 2009, Springer, Netherlands, pp. 287—299 ISSN 1874-6519 URL 2. C. Greulich & S. Kittler & M. Epple & G. Muhr & M. Köller/ Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (hMSCs) /Langenbecks Arch Surg (2009) 394:495–502. 3. Xujie Liu, Wei He, Zhou Fang/ Influence of Silver Nanoparticles on Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells/ J. Biomed. Nanotechnol. 2014, Vol. 10, No.7/ 1277–1285/ 4. Christina Sengstock, Jörg Diendorf, Matthias Epple/ Effect of silver nanoparticles on human mesenchymal stem cell differentiation/ Beilstein J. Nanotechnol. 2014, 5, 2058–2069/ 5. Kern S., Eichler H., Stoeve J./ Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue/ Stem Cells. – 2006. – Vol.24. – P. 1294 – 1301.

Grant: Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology (IBTN) of People's Friendship University of Russia (PFUR)

УДК: 579.6:695:663, ББК:

ГИБРИДЫ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ДРОЖЖЕЙ: ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРОУПРАВЛЯЮЩЕГО АГЕНТА НА 3D АРХИТЕКТУРУ МАТЕРИАЛОВ В УСЛОВИЯХ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ЭКОБИОТЕХНОЛОГИИ

Д.Г.Лаврова, О.Н.Понаморева

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Россия, 300012, Тула, пр. Ленина, 92, d.g.fedoseeva@gmail.com, +79539531492

С использованием золь-гель технологий синтезированы гибридные материалы на основе инкапсулированных в органосиликатные оболочки микроорганизмов в присутствии полиэтиленгликоля в качестве структуроуправляющего агента. На основе полученных материалов разработаны перспективные биокатализаторы для применении в экобиотехнологии.

Ключевые слова: инкапсулированные микроорганизмы, гетерогенный биокатализатор, золь-гель, кремнийорганические соединения, полиэтиленгликоль (ПЭГ), очистка метанолсодержащих стоков

Использование иммобилизованных микробных клеток позволяет интенсифицировать и повысить экономическую привлекательность биотехнологических процессов, значительно упростить технические решения по сравнению с применением суспензии клеток. Одним из современных подходов для иммобилизации микроорганизмов является микрокапсуляция – получение структур «клетка в защитной оболочке» [1]. Защитной капсулой вокруг клетки может служить слой из силикатных материалов, что является подобием структуры экзоскелета на поверхности диатомовых водорослей. Искусственное объединение клеток с соединениями кремния позволяет разрабатывать новые живые гибридные материалы [2,3]. Такие структуры на основе инкапсулированных микроорганизмов представляют собой стабильные биокатализаторы, которые обладают значительным инновационным потенциалом в биотехнологии. Для получения силикатных материалов с заданными структурами применяют методы золь-гель химии в присутствии структуроуправляющих агентов, в качестве которых часто применяют полиэтиленгликоли (ПЭГ). Однако информация о влиянии ПЭГ на жизнеспособность иммобилизованных с использованием золь-гель технологий микроорганизмов немногочисленна и противоречива.

Нами было показано, что в зависимости от молекулярной массы структурообразующего агента ПЭГ изменялась и 3D-структура биогибридов. Наибольший интерес представляет архитектура гибридного биоматериала, полученного при использовании ПЭГ с молекулярной массой 3000 Да. Вокруг каждой клетки формируется капсула, при этом инкапсулированные клетки образуют единую структуру. Кремнийорганические капсулы защищают клетки от стрессовых факторов окружающей среды. Именно поэтому живые

гибридные материалы, полученные нами, являются перспективными биокатализаторами при разработке биосенсоров для детекции метанола, биофильтров для очистки метанолсодержащих стоков [4–6].

Литература.
1. Wang S., Guo Z. Bio-inspired encapsulation and functionalization of living cells with artificial shells // Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier B.V., 2014. T. 113. C. 483–500. 2. Yang S.H., Hong D., Lee J. и др. Artificial spores: cytoprotective nanoencapsulation of living cells // Trends Biotechnol. 2013. T. 31, № 8. C. 442–447. 3. Meunier C.F., Dandoy P., Su B.L. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials // J Colloid Interface Sci. 2010. T. 342, № 2. C. 211–224. 4. Федосеева (Лаврова) Д.Г., Понаморева О.Н., Каманина О.А. и др. Синтез кремнийорганических золь-гель матриц и получение на их основе гетерогенных биокатализаторов // Журнал прикладной химии. 2014. Т. 87, № 6, - С. 753-759 5. Ponamoreva O.N., Kamanina O.A., Alferov V.A. и др. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol–gels for the design of biosensors // Biosens. Bioelectron. 2015. T. 67. C. 321–326. 6. Lavrova D.G., Ponamoreva O.N., Kamanina O.A. и др. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater: article // Enzyme Microb. Technol. 2016. T. 92. C. 94–98.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке РФФИ и Правительства Тульской области (грант № 16-43-710183 р_а)

HYBRIDS OF ORGANOSILANE COMPOUNDS AND YEAST CELLS: EFFECT OF STRUCTURE-CONTROLLING AGENT ON 3D-ARCHITECTURE OF MATERIALS IN CONDITIONS OF SOL-GEL SYNTHESIS AND PROSPECTS FOR THE APPLICATION IN ECOBIOTECHNOLOGY

D.Lavrova, O.Ponamoreva

Tula State University, Russia, 300012, Tula, Pr. Lenina, 92

Hybrid materials based on encapsulated in organosilicate shell yeast cells were synthesized through a sol–gel technology in the presence polyethylene-glycol (PEG) as a structure-controlling agent. Perspective biocatalysts based on the materials have been developed for application in ecobiotechnology.

Key words: encapsulated microorganisms, heterogeneous biocatalyst, sol–gel, organosilane compounds, polyethylene glycol (PEG), methanol wastewater cleaning

The application of immobilized microbial cells allows to intensify and increase the economic attractiveness of biotechnological processes. It can greatly simplify the technical solutions as compared to using of the cell suspension. Microencapsulation is one of the modern approaches to the immobilization of microorganisms. It involves obtaining of «cell in the protective shell» structures [1]. The layer of silicate materials can serve as a protective capsule around the cell, like the exoskeleton structure on the surface of diatoms. The artificial combination of silica compounds and microorganism cells allows the development of new living hybrid materials [2,3]. These structures are based on encapsulated microorganisms and can be stable biocatalysts, so, they have considerable innovational potential in biotechnology. Methods of sol-gel chemistry in the presence of structure-controlling agent are often used for the preparation silica materials with desired structures. In those processes polyethylene glycols (PEG) are common structure-controlling agents. However, information about the effect of PEG on the viability of microorganisms, immobilized using sol-gel technology, is incomplete and contradictory.

We demonstrated that biohybrid 3D-architecture varied depending on the molecular weight of the structure-controlling agent. Of great interest is the architecture of hybrid biomaterial obtained with using PEG of molecular weight 3000 Da as structure-controlling agent. Capsules are formed around each cell, wherein the encapsulated cells form a single structure. Therefore living hybrid materials we developed, are the perspective biocatalysts in the development of methanol biosensors and biofilters for methanol wastewater treatment [4–6].

References:
1. Wang S., Guo Z. Bio-inspired encapsulation and functionalization of living cells with artificial shells // Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier B.V., 2014. V. 113. p. 483–500. 2. Yang S.H., Hong D., Lee J. et al. Artificial spores: cytoprotective nanoencapsulation of living cells // Trends Biotechnol. 2013. V. 31, № 8. p. 442–447. 3. Meunier C.F., Dandoy P., Su B.L. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials // J Colloid

Interface Sci. 2010. V. 342, № 2. p. 211–224. 4. Fedoseeva (Lavrova) D.G., Ponamoreva O.V., Kamanina O.A. et al. Synthesis of organosilicon sol-gel matrices and preparation of heterogeneous biocatalysts based on them // Russ. J. Appl. Chem. Pleiades Publishing, 2014. V. 87, № 6. p. 761–766. 5. Ponamoreva O.N., Kamanina O.A., Alferov V.A. и др. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol–gels for the design of biosensors // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 67. p. 321–326. 6. Lavrova D.G., Ponamoreva O.N.,Kamanina O.A. и др. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater: article // Enzyme Microb. Technol. 2016. V. 92. p. 94–98.

Grant: The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research and Tula Region Government according to the research project № 16-43-710183

УДК: 579.25, ББК: 52.64

АССОЦИИРОВАННЫЕ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА ГЕНЫ БАКТЕРИЙ ВИДА ESCHERICHIA COLI ЯВЛЯЮТСЯ ДЛЯ ДАННОГО ВИДА ИСХОДНЫМИ И ПРЕТЕРПЕЛИ МНОЖЕСТВЕННОЕ УДАЛЕНИЕ ИЗ ГЕНОМА

А.И.Манолов[1], Д.В.Ракитина[1], М.С.Гельфанд[2], Е.Н.Ильина[1], В.М.Говорун[1]

[1]ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Россия, 119992, Москва, Малая Пироговская, 1а, paraslonic@gmail.com, +79854177308
[2]ФГБУ ИППИ РАН, Россия, 127994, Москва, Большой Каретный переулок, 19, gelfand@iitp.ru, +7 (495) 650-42-25

Сравнительный геномный анализ штаммов E. coli позволил выявить ряд генов представленность которых повышена в изолятах из больных людей. Среди этих генов - оперон утилизации пропандиола. Оказалось, что данный оперон присутствовал в геномах колей на ранних этапах их эволюции и затем подвергся делеции у большинства современных штаммов.

Ключевые слова: болезнь Крона, микробота, эволюция, потеря генов

Болезнь Крона (БК) зачастую сопровождается повышенным содержанием в кишечном микробиоме бактерий вида Escherichia coli. Это позволяет предположить их участие в развитии данного заболевания. С целью изучения данного предположения мы провели сравнительный генетический анализ бактерий вида E. coli изолированных из биопсийного материала и образцов кала 10 пациентов с БК (в среднем 3 образца на пациента) с привлечением информации об уже известных геномах штаммов данного вида.

Для девяти из десяти пациентов мы наблюдали крайне высокое сходство геномов отдельных изолятов E. coli изолированных из одного пациента (менее чем 200 однонуклеотидных замен на геном). Это свидетельствует в пользу предположения, что в микрофлоре людей, как правило, есть один доминирующий штамм E. coli.

Филогенетический анализ не выявил кластеризации геномов штаммов ассоциированных с болезнью Крона. На основе построенных групп гомологий было проведено сравнение представленности генов в штаммах изолированных из людей с БК и здоровых людей. Было определено 167 генов с повышенной представленностью в группе штаммов, ассоциированных с БК. Среди этих генов: pdu-оперон, содержащий гены утилизации пропандиола, транскрипционные факторы, гены связанные с горизонтальным переносом генетического материала.

Система утилизации пропандиола в виде pdu оперона, а не отдельных ферментов, редко встречается в геномах E. coli. Так, из 83 исследованных геномов данный оперон был обнаружен лишь в 11 из них. При этом, он присутствует у филогенетически очень отдаленных штаммов E. coli, включая один штамм, имеющий лишь 95% нуклеотидное сходство с другими штаммами (что сопоставимо со сходством к другим видам). Ранее, данный оперон был описан в геномах бактерий Klebsiella pneumonia и высказывалось предположение, что наличие оперона у E. coli есть следствие горизонтального переноса. Мы также наблюдали, что в микробиомах некоторых пациентов носителями данного оперона являются бактерии видов Fusobacteruim ulcerans и K. pneumoniae.

Мы провели анализ генного окружения pdu-оперона при помощи разработанного нами метода, основанного на графах. Данный анализ выявил, что в разных геномах данный оперон имеет крайне схожий контекст, так что можно утверждать, что он расположен в одном и том же участке хромосомы. Анализ расстояний между нуклеотидными последовательностями проведенный на основе генов оперона и на основе всех общих однокопийных генов выявил их хорошее соответствие (коэффициент корреляции Пирсона 0.9).

Имеющий повышенную представленность в геномах E. coli изолируемых из пациентов с болезнью

Крона pdu-оперон присутствовал в геномах колей еще на ранних этапах их эволюции. Затем, во множестве геномов, он претерпел делецию. Те штаммы, в которых оперон остался, сейчас выделяются преимущественно из людей больных болезнью Крона и некоторыми другими заболеваниями.

Литература.
1. Miquel S, Peyretaillade E, Claret L, De Vallée A, Dossat C, Vacherie B, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli strain LF82 // PloS one. 2010 Sep 17;5(9):e12714. 2. Dogan B, Suzuki H, Herlekar D, Sartor RB, Campbell BJ, Roberts CL, Stewart K, Scherl EJ, Araz Y, Bitar PP, Lefébure T. Inflammation-associated adherent-invasive Escherichia coli are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation // Inflammatory bowel diseases. 2014 Nov 1;20(11):1919-32.

Финансирование: Работа поддержана грантом РНФ 16-15-00258 «E. coli как мишень терапии при болезни Крона».

CROHN`S DISEASE ASSOCIATED GENES OF ESCHERICHIA COLI WERE INITIALLY PRESENT IN THEIR GENOMES AND UNDERGO MULTIPLE DELETION

A.Manolov[1], D.Rakitina[1], M.Gelfand[2], E.Ilina[1], V.Govorun[1]

[1]FGBU FNKC FHM FMBA of Russia, Russia, 119992, Moscow, Malaya Pirogovskaya, 1a
[2]FGBU IPPI RAN, Russia, 127994, Moscow, Bolshoy Karetniy pereulok, 19

Comparative genomic analysis of E. coli strains revealed a number of genes over-represented in isolates from patients with Crohn`s disease, particularly operon utilization operon. Our analysis revealed that this operon was initially presented in E. coli genomes long time ago but underwent multiple deletion in most strains.

Key words: Crohn`s disease, metagenome, evolution, gene deletion

Crohn's disease is often characterized by increased level of the Escherichia coli in the intestinal microbiome of patients. This suggests their involvement in the development of the disease. In order to examine this hypothesis, we conducted a comparative genetic analysis of E. coli isolated from biopsy material and fecal samples of 10 patients with CD (an average of 3 samples per patient). To conduct comparative analysis we use information about already sequenced genomes with known state of their host: with gastrointestinal diseases or healthy subject.

For nine out of ten patients, we observed a very high similarity of the genomes of individual isolates of E. coli (with the difference in less than 200 SNP). This supports the assumption that the microflora in humans usually have a dominant strain of E. coli.

Phylogenetic analysis did not reveal clustering of the genomes of strains associated with Crohn's disease. Homology groups were constructed and gene content was compared in different groups of strains. We find 167 genes to be overrepresented in the group of strains associated with CD. Among the overrepresented genes are utilization of propanediol, transcription factors, genes associated with the horizontal transfer of genetic material.

Propanediol utilization system as pdu operon rather than individual enzymes is rarely found in the genomes of E. coli. Among the 83 genomes studied only 11 of them hosts this operon. This strains with pdu-operon are phylogenetically divergent including a strain having only 95% nucleotide similarity with others which is comparable with the similarity to other species. Previously, this operon has been described in the genomes of the Klebsiella pneumoniae. It was suggested that the presence of this operon in E. coli is the result of horizontal gene transfer events. Earlier we also observed that in some patients the host of this operon are another bacterial species, among which are Fusobacteruim ulcerans and K. pneumoniae.

Our analysis of gene context of pdu operon with our new graph-based method revealed that in different genomes this operon has a very similar context, so that it can be argued that it is resides in the same place in the chromosome. Analysis of the distances between the nucleotide sequences based on the operon sequences and on core genes showed good agreement (Pearson correlation coefficient of 0.9).

the pdu-operon, which is overrepresented in genomes of E. coli isolated froma Crohn`s disease patients, was present in the genomes of E. coli in the early stages of their evolution and has undergone deletion in multiple strains. Those strains which still hosts this operon were isolated mainly from human with Crohn's disease.

References:
1. Miquel S, Peyretaillade E, Claret L, De Vallée A, Dossat C, Vacherie B, Segurens B, Barbe V, Sauvanet P, Neut C, Colombel JF. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive E. coli strain LF82 // PloS one. 2010 Sep 17;5(9):e12714. 2. Dogan B, Suzuki H, Herlekar D, Sartor RB, Campbell BJ, Roberts CL, Stewart K, Scherl EJ, Araz

Y, Bitar PP, Lefébure T. Inflammation-associated adherent-invasive Escherichia coli are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation // Inflammatory bowel diseases. 2014 Nov 1;20(11):1919-32.

Grant: This work was supported by RSF grant 16-15-00258 «E. coli as target for the therapy in Crohn`s disease».

УДК: 573/ 579.2, ББК: 28.087

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ TRICHODERMA В АГРОТЕХНОЛОГИЯХ

О.А.Маркина

ФГБОУ ВО Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина, Россия, 302019, Орел, Генерала Родина, 69, olya.olga-markina@yandex.ru, 89192001586

Определены и идентифицированы штаммы грибов Trichoderma spp., экзометаболиты которых проявляют наиболее выраженную антибиотическую активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов и микроорганизмов III-IV гр. патогенности, разработана схема культивирования, позволяющая увеличить синтез антибиотических веществ, получены препараты, которые могут применяться в современных агротехнологиях.

Ключевые слова: экзометаболиты, Trichoderma spp., биоинженерия, агротехнологии, биопрепараты

На современном этапе развития медицины и ветеринарии, в связи с широким, часто не совсем обоснованным применением антибиотиков, устойчивые к ним формы микроорганизмов встречаются очень часто, что значительно снижает эффективность применения препаратов с бактерицидным и бактериостатическим действием. Приоритетным направлением биоинженерии является использование биопотенциала растений и микроорганизмов, проявляющих биологическую активность для создания высокоэффективных препаратов для агротехнологий, в том числе, обладающих антимикробными свойствами.

Род грибов Trichoderma spp. имеет особое значение в сельскохозяйственной практике, так как является ценным биоагентом при регулировании многих видов фитопатогенных микроорганизмов (Agrios, 2005). Микромицеты являются богатым источником вторичных метаболитов, многие из которых являются биологически активными и оказывают глубокое воздействие на живую клетку [1, 2, 5].

Грибы Trichoderma spp. секретируют около 200 соединений с антибактериальным, антигрибным, цитотоксическим и антипротозойным действием. Среди них пептаиболы – новая группа природных пептидных антибиотиков [4].

Нами выделены и исследованы вторичные метаболиты Trichoderma harzianum и Trichoderma virens нескольких подвидов, идентифицированных молекулярно- генетическими методами. Определяли перспективные штаммы по синтезу веществ, проявляющих бактерицидные или бактериостатические свойства в отношении условно-патогенных микроорганизмов и микроорганизмов 3-4 гр. патогенности по МУК 4.2.1890-04 (E. coli (Lac+), E. coli (Lac-), K. pneumoniae, Staphylococcus aureus, Bacillus anthracis [3].

В результате исследований определены и идентифицированы штаммы, метаболиты которых проявляют наиболее выраженную антибиотическую активность, разработана схема культивирования, позволяющая увеличить синтез антибиотических веществ, получены препараты экстракты вторичных метаболитов различных объектов выделения (мицелий, спорово- мицелиальная масса, культуральная жидкость), определен наиболее перспективный объект выделения (мицелий). Ведется работа по созданию микробиологического препарата с антибиотическими свойствами для повышения качества кормов для сельскохозяйственных животных.

В результате исследований определены и идентифицированы штаммы, метаболиты которых проявляют наиболее выраженную антибиотическую активность, разработана схема культивирования, позволяющая увеличить синтез антибиотических веществ, получены препараты экстракты вторичных метаболитов различных объектов выделения (мицелий, спорово- мицелиальная масса, культуральная жидкость), определен наиболее перспективный объект выделения (мицелий). Ведется работа по созданию микробиологического препарата с антибиотическими свойствами для повышения качества кормов для сельскохозяйственных животных.

Литература.
1. Гнеушева И.А. Биологическая активность грибов рода Trichoderma и их промышленное применение / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская, И.В. Яковлева // Вестник Орловского государственного аграрного университета. - 2010. - № 3. - С. 36-39. 2. Садыкова, В.С. Антимикробная и противоопухолевая активность штаммов рода

Trichoderma / Садыкова В.С., Свирщевская Е.В., Громовых Т.И., Зубарева Е.С. // Биологически активные вещества микроорганизмов: Материалы Всероссийского симпозиума - Москва- 2011,- С. 105. 3. Яковлев В.П. Перспективы создания и внедрения новых антимикробных препаратов / В.П. Яковлев, С.В. Яковлев // Инфекции и антимикробная химиотерапия. – 2002. – №4(2). – С.1-5. 4. Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P. (2011). Trichoderma: the genomics of opportunistic success. Nature Rev. Microbiol. 9(10): 749–759. 5. Druzhinina, I.S., Komon-Zelazowska M., Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Belayneh, T. & Kubicek, C. P. (2008). Alternative reproductive strategies of Hypocrea orientalis and genetically close but clonal Trichoderma longibrachiatum, both capable of causing invasive mycoses of humans Microbiology 154, 3447–3459.

Финансирование: Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно- технической сфере

PROSPECTS OF APPLICATION OF THE PREPARATIONS BASED ON TRICHODERMA EXOMETABOLITES IN AGRICULTURAL TECHNOLOGIES

O.Markina

Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhina, Russia, 302019, Orel, General Rodina, 69

Isolated and identified the strains of fungi Trichoderma spp. planed, the exometabolites which show the most pronounced antibiotic activity against conditionally pathogenic microorganisms and microorganisms of III-IV gr. pathogenicity, we developed a scheme of cultivation to increase the synthesis of antibiotic substances received drugs that can be applied in modern agricultural technologies.

Key words: exo-metabolites, Trichoderma spp. planed, bioengineering, agricultural technology, biologics

At the present stage of development of medicine and veterinary medicine, with the broad, often not justified by the use of antibiotics, resistant forms of microorganisms are very common, which greatly reduces the effectiveness of drugs with bactericidal and bacteriostatic activity. The priority of bioengineering is the use of action potential of plants and microorganisms that exhibit biological activity for the creation of highly effective preparations for agricultural technologies, including those with antimicrobial properties.

A genus of fungi Trichoderma spp. planed is of particular importance in agricultural practice as a valuable bioagents in the regulation of many species of phytopathogenic organisms (Agrios, 2005). Micromycetes are a rich source of secondary metabolites, many of which are biologically active and have a profound impact on the living cell [1, 2, 5].

The fungi Trichoderma spp. secrete about 200 compounds with antibacterial, antirrhinum, cytotoxic and Antiprotozoal activity. Among them peptaibol – a new group of natural peptide antibiotics [4].

We have identified and investigated the secondary metabolites of Trichoderma harzianum and Trichoderma virens several subtypes identified by molecular genetic methods. Have identified promising strains for the synthesis of substances that exhibit bactericidal or bacteriostatic properties against pathogenic microorganisms and microorganisms 3-4 oz. pathogenicity for MUK 4.2.1890-04 (E. coli (Lac+), E. coli (Lac-), K. pneumoniae, Staphylococcus aureus, Bacillus anthracis [3].

The studies isolated and identified strains, the metabolites which show the most pronounced antibiotic activity, the scheme of cultivation, to increase the synthesis of antibiotic substances obtained drugs extracts of secondary metabolites of various objects highlight (the mycelium, the spore - mycelial mass culture liquid) determined that the most promising object selection (mycelium). Work is underway on the creation of a microbial drug with antibiotic properties for use in farming and vermicomposting.

The studies isolated and identified strains, the metabolites which show the most pronounced antibiotic activity, the scheme of cultivation, to increase the synthesis of antibiotic substances obtained drugs extracts of secondary metabolites of various objects highlight (the mycelium, the spore - mycelial mass culture liquid) determined that the most promising object selection (mycelium). Work is underway on the creation of a microbial drug with antibiotic properties for use in farming and vermicomposting.

References:
1. Gneusheva I. A. Biological activity of fungi of the genus Trichoderma and their industrial applications / I. A. Speech, N. E. Pavlovskaya, I. V. Yakovleva // Vestnik of Orel state agrarian University. - 2010. - No. 3. - C. 36-39. 2. Sadykov, B. C. antimicrobial and antitumor activity of strains of the genus Trichoderma / Sadykova B. C., E. V. Svirshevsky, Thunder T. I., Zubarev E. S. // Biologically active substances of microorganisms: Materials of all-Russian Symposium - Moscow - 2011,- P. 105. 3. Yakovlev V. P. prospects of creation and introduction of new antimicrobial drugs / V. P. Yakovlev, S. V.

Yakovlev // Infection and antimicrobial chemotherapy. – 2002. – №4 (2). – С. 1-5. 4. Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P. (2011). Trichoderma: the genomics of opportunistic success. Nature Rev. Microbiol. 9(10): 749–759. 5. Druzhinina, I.S., Komon-Zelazowska M., Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Belayneh, T. & Kubicek, C. P. (2008). Alternative reproductive strategies of Hypocrea orientalis and genetically close but clonal Trichoderma longibrachiatum, both capable of causing invasive mycoses of humans Microbiology 154, 3447–3459.

Grant: Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology

УДК: 573.6.086.83.001.26 , ББК: 30.16

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИАЛУРОНИДАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕМБРАННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Я.В.Мельникова, А.А.Лаврик, Н.Э.Искендерова, С.Г.Али

ООО «Самсон-Мед», Россия, 196158, Санкт-Петербург, Московское шоссе, 13, Jayani@mail.ru, 8(952)228-17--12

Разработана технология выделения гиалуронидазы из семенников КРС с использованием мембранной фильтрации. Показано, что использование данной технологии позволяет исключить из производственного цикла органический растворитель и повысить выход целевого компонента.

Ключевые слова: гиалуронидаза, семенники крупного рогатого скота, препарат «Лидаза», ультрафильтрация, диафильтрация.

Гиалуронидазы – это группа ферментов, способных расщеплять кислые мукополисахариды, составляющие основу соединительной ткани. Гиалуронидаза повышает эластичность соединительной ткани, уменьшает контрактуры и предупреждает их формирование, уменьшает спаечный процесс, ускоряет рассасывание рубцов и гематом, повышает биодоступность лекарственных препаратов [1].

Известны технологии выделения гиалуронидазы из тканей с использованием органических растворителей (ацетон [2], хлороформ [3]). Например, ацетон применяют на стадиях осаждения целевого компонента, его промывки и сушки. Однако ацетон является наркотиком, оказывает раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и верхних дыхательных путей [4]; оказывает негативное влияние на окружающую среду.

Цель работы заключается в разработке технологии выделения гиалуронидазы из семенников крупного рогатого скота (КРС), исключающей использование органических растворителей.

В работе применяли методы мембранной фильтрации: предфильтрация, ультрафильтрация и диафильтрация. Перед фильтрацией проводили обработку экстракта кизельгуром. Были изучены три типа кизельгура (super, medium и extra) с концентрацией 5%, 10% и 15%. Для работы был выбран 5% кизельгур типа Super. Использование кизельгура позволяет избавиться от жиров и балластных белков в экстракте, тем самым улучшая его фильтрационные свойства и не влияя на целевой компонент.

На этапе предфильтрации было показано, что при использовании большинства из исследованных глубинных фильтров потери гиалуронидазной активности в осветленных экстрактах не происходит.

Для ультрафильтрации и диафильтрации применяли мембранные кассеты с разной номинальной отсекаемой молекулярной массой. По результатам сравнительной оценки содержания общего белка и гиалуронидазной активности (в т.ч. удельной) выбраны кассеты с определенной номинальной отсекаемой молекулярной массой, обеспечивающие наилучшие показатели. Показано, что с увеличением кратности отмывки от 10- до 30-кратной происходит удаление из раствора балластных примесей, однако при этом гиалуронидазная активность снижается, поэтому 10-кратная отмывка выбрана в качестве оптимальной. Внедрение стадий ультра- и диафильтрации позволило удалить из экстракта низкомолекулярные балластные белки, что подтверждается электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэммли (SDSPAGE).

Фармацевтическая компания ООО «Самсон-Мед» выпускает препарат «Лидаза», содержащий гиалуронидазу. Сравнительный анализ полученной субстанции и препарата «Лидаза»показал, что в субстанции, полученной по новой технологии, происходитувеличение содержания общего белка в 2,5 раза и гиалуронидазной активности в 3,5 раза. Разработанная технология будет внедрена на ООО «Самсон-Мед» для получения субстанции гиалуронидазы и препарата «Лидаза», что позволит исключить из производственного цикла органический растворитель и увеличить выход целевого компонента.

Литература.
1. El-Saforya N.S., Fazaryb A.E., Lee C.–K. Hyaluronidases, a group of glycosidase: Current and future perspective // Carbohydrate polymers. 2010. Vol. 81. № 3. P. 165-181. 2. Патент СССР 827068, 07.05.1981 3. Патент РФ 2054943, 27.02.1996 4. Семенов В.А., Громова О.А., Субботин А.В. Поражение нервной системы при воздействии химических и физических факторов: учебное пособие для студентов лечебного факультета медицинских вузов. – М.: ФГБОУ ВО КемГМУ, 2009. 246 с.

Финансирование: Проект финансируется компанией ООО «Самсон-Мед»

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF HYALURONIDASE ISOLATION USING MEMBRANE FILTRATION

I.Melnikova, A.Lavrik, N.Iskenderova, S.Ali

Ltd. «Samson-med», Russia, 196158, St. Petersburg, Moskovskoye sh., 13

The technology of obtaining hyaluronidase from cattle testis is developed with the use of membrane filtration. It is shown that this technology allows to exclude the organic solvent from production process and increase the yield of the target component.

Key words: hyaluronidase, cattle testes, medicine «Lidaza», ultrafiltration, diafiltration.

Hyaluronidases are a family of enzymes that catalyse the degradation of acid mucopolysaccharides that are the base of connective tissue. Hyaluronidase increases the connective tissue compliance, reduces contracture and prevents their formation, reduces the adhesion process, accelerates the resorption of scar and bruise, increases the bioavailability of drugs [1].

Technologies of hyaluronidase isolation from tissues using organic solvents (acetone [2], chloroform [3]) exist. For example, acetone is used for precipitation, washing and drying of target component. Acetone is a drug and irritates conjunctiva and upper air passages [4]. Also it has negative effect on the environment.

The aim is to develop a technology for isolation of hyaluronidase from cattle testis that excludes the use of organic solvents.

Membrane filtration processes such as prefiltration, ultrafiltration and diafiltration are used. Kieselguhr were added to the extract before filtration. Three types of kieselguhr were studied (super, medium and extra), range of concentration was 5%, 10% and 15%. 5% Kieselguhr (type Super) was chosen as an optimal. Kieselguhr helps to eliminate the fats and ballast proteins from the extract, thereby improving its filtration characteristics without effecting the target component.

It has been shown that when using most of the investigated depth filters in prefiltration step there were no significant decreases in the hyaluronidase activity of the clarified extracts.

Some membranes with different molecular weight cut-off were studied for ultrafiltration and diafiltration processes. Membrane with a certain molecular weight cut-off, that provides the best performance, was chosen according to the comparative analysis of the total protein content and hyaluronidase activity. It is shown that impurities can be removed from the solution by increasing of washing through 10 to 30 retentate volumes, however, the hyaluronidase activity is reduced. That's why washing, that consists of 10 cycles, was selected as optimal. Ultra- and diafiltration stages allowed to remove low molecular weight ballast proteins from the extract, as confirmed by the results of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) according to Laemmli (SDSPAGE).

Pharmaceutical company «Samson-Med» produces the medicine «Lidaza» containing hyaluronidase. Comparative analysis of the «Lidaza» and obtained hyaluronidase showed a 2.5-fold increase of the total protein content and a 3.5-fold increase of the hyaluronidase activity of the last. Ltd. «Samson-Med» will launch medicine «Lidaza» and substance of hyaluronidase, obtained by applying a new technology, it will allow to exclude the organic solvent from production process and increase the yield of the target component.

References:
1. El-Saforya N.S., Fazaryb A.E., Lee C.–K. Hyaluronidases, a group of glycosidase: Current and future perspective // Carbohydrate polymers. 2010. Vol. 81. № 3. P. 165-181. 2. Patent of the USSR 827068, 07.05.1981 3. Patent RU 2054943, 27.02.1996 4. Semenov V.A., Gromov O.A., Subbotin A.V. Nervous system disturbance under the influence of chemical and physical factors: the textbook for students of medical faculty. - M.: KemSMU, 2009. 246 p.

Grant: The company LLC Samson-Med finances a project

УДК: 577.112.083, 577.352.335, ББК:

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПАНЕЛИ РЕКОМБИНАНТНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ АЛЛЕРГЕНОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ БИОЧИПА

Д.Н.Мельникова, И.В.Богданов, Е.И.Финкина, Т.В.Овчинникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Россия, 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10, office@ibch.ru, +7 (495) 335-01-00

Созданы генно-инженерные конструкции для экспрессии клинически значимых растительных аллергенов, относящихся к PR-10 и PR-14 подклассам, в клетках E. coli в составе гибридных белков, и получены высокоэффективные штаммы-продуценты. Разработана методика выделения аллергенов, позволяющая получить их рекомбинантные аналоги, полностью идентичные природным белкам по молекулярной массе, аминокислотной последовательности и спектру кругового дихроизма.

Ключевые слова: панель рекомбинантных аллергенов, гетерологичная экспрессия, аллерген; аллергодиагностика

По статистике каждый третий гражданин России подвержен тем или иным аллергическим заболеваниям. Стремительный рост числа пациентов с аллергией требует развития новых методов ранней аллергодиагностики. Одними из наиболее значимых растительных аллергенов являются представители белков, связанных с патогенезом (Pathogenesis-Related Proteins или PR-белков), в частности, относящиеся к подклассу PR-10 гомологи пыльцевого аллергена Bet v 1 березы и принадлежащие к подклассу PR-14 липид-транспортирующие белки (LTP). Целью данной работы являлась разработка биотехнологических подходов к созданию высокоэффективных продуцентов рекомбинантных аналогов растительных аллергенов, относящихся к подклассам PR-10 и PR-14, для аллергодиагностики с помощью современных тест-систем на основе биочипов.

В качестве объектов исследования нами были выбраны 7 клинически значимых аллергенов, принадлежащих к подклассу PR-14, в том числе из персика, чечевицы, гороха, фундука, клубники и полыни, а также 6 аллергенов, относящихся к подклассу PR-10, из пыльцы березы, ольхи, амброзии, а также из сои и клубники. Были разработаны системы для гетерологичной экспрессии данных аллергенов в клетках E. coli. Рекомбинантные белки экспрессировались под контролем промотора T7 в клетках штамма BL-21(DE3), несущего ген T7 РНК-полимеразы. Один из двух разработанных вариантов конструкции предусматривал получение аллергенов в форме гибридных белков с модифицированным тиоредоксином А. Данная система показала более высокий выход целевых продуктов и была использована для препаративного выделения белков методами аффинной хроматографии и ОФ-ВЭЖХ. Разработанная методика выделения аллергенов позволила получить их рекомбинантные аналоги, полностью идентичные природным белкам по молекулярной массе, аминокислотной последовательности и спектру кругового дихроизма.

Проведены исследования функциональной активности и иммунологических свойств рекомбинантных аналогов, принадлежащих к подклассу PR-14. Данные белки обладают умеренной антимикробной активностью в отношении ряда фитопатогенных микроорганизмов и различно эффективностью связывают широкий спектр гидрофобных соединений, а также осуществляют перенос фосфолипидов между мембранами. Результат иммунологических исследований показали, что рекомбинантные белки обладают способностью связывать специфические IgE из сывороток пациентов с пищевой аллергией на бобовые, фрукты и орехи.

Финансирование: Исследование белков чечевицы, гороха, полыни и амброзии выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

RECOMBINANT PLANT ALLERGENS PANEL CREATING FOR A TEST SYSTEM IN A MICROARRAY FORMAT

D.Melnikova, I. Bogdanov , E.Finkina, T.Ovchinnikova

M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences, Russia, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya, 16/10

The bacterial expression host strain, translational fusion strategy, and convenient cleavage and purification procedures were optimized to produce of clinically relevant allergens of PR-10 and PR-14 families. The method of purification allows to obtain recombinant analogues having molecular weight, amino acid sequence and spectra of circular dichroism identical to the natural proteins.

Key words: panel of recombinant allergens; heterologous expression; lipid transfer proteins; allergy diagnostics

According to the statistics, every third citizen of Russia is prone to allergic diseases. The rapid growth in the number of patients with allergy requires the development of new methods for early diagnostic of this disease. One of the most important plant allergens are pathogenesis-related proteins (PR-proteins), in particular, homologues of birch Bet v 1 (PR-10) and lipid transfer proteins (LTP) belonging to the PR-14. The aim of this work was to develop of biotechnological approaches for highly efficient production of recombinant plant allergens of PR-10 and PR-14 families for allergy diagnostic using modern test systems in a microarray format.

Seven clinically relevant allergens from peach, lentil, pea, hazelnut, strawberry, and sage, belonging to the PR-14 family, and six clinically relevant allergens from pollen of birch, alder, ragweed, as well as from soybean and strawberry, belonging to the PR-10 family, were obtained. Heterologous expression systems for production of the above mentioned allergens in E. coli were developed. Recombinant proteins were expressed under control of the T7 promoter in E. coli strain BL-21 (DE3), bearing the T7 RNA polymerase gene. The expression plasmids included a modified thioredoxin A as a fusion partner. This system demonstrated a higher yield of the mature proteins and was used for preparative purification by affinity chromatography and reversed-phase HPLC. The developed biotechnological methods allowed to obtain the recombinant allergens identical with the natural proteins by molecular mass, amino acid sequence and spectra of circular dichroism.

It was shown that the obtained recombinant proteins of the PR-14 family inhibited the growth of a number of pathogenic microorganisms, bound a wide range of hydrophobic ligands and transferred phospholipids between membranes. The results of immunological studies have shown that recombinant proteins have an ability to bind specific IgE in sera of patients with food allergy to fruits, nuts, and beans.

Grant: The reported study of allergens of lentil, pea, sage and ragweed was supported by the Russian Science Foundation (the agreement No.14-50-00131)

УДК: 615.275.2, ББК:

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПРОТАРГОЛА НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.

Н.В.Мещерякова[1], В.Ю.Жилкина [1], А.И.Марахова[1], Э.Б.Дашинимаев[2]

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», Россия, 117198, Москва, Миклухо-Маклая, 6, time-off@mail.ru, 8(499)936-85-99
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334, Москва, Вавилова, 26

Представлены данные по изучению цитотоксического эффекта разных концентраций Протаргола на дермальные фибробласты (ФБ) и нейральные стволовые клетки (НСК). Установлено, что Протаргол оказывает цитотоксическое действие в нелинейной зависимости от концентрации.

Ключевые слова: коллоидное серебро, Протаргол, дермальные фибробласты, нейральные стволовые клетки

На сегодняшний день большую перспективу для применения в медицине в качестве заменителей антибиотиков имеют коллоидные растворы серебра. Протаргол – протеинат серебра, производимый в виде порошка, что существенно увеличивает срок его хранения, и образующий в водном растворе коллоидный раствор. Протаргол широко используется как антимикробный препарат широкого спектра действия и противовоспалительное средство. Однако на сегодняшний день проведено недостаточное количество исследований токсичности протаргола на различные типы клеток человека. Мы поставили перед собой цель изучить действие протаргола на дермальные фибробласты и нейральные стволовые клетки в культуре invitro.

Исследование было проведено на культуре иммортализованных дермальных фибробластов (ФБ) человека линии 1608hТи культуре нейральных стволовых клеток человека (НСК), полученных методом прямой дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток линии KYOU¬DXR0109B. Цитотоксическое действие Протаргола определялось при помощи МТТ-теста и теста на пролиферацию, на 2, 4, 6, 8, 10 дни культивирования.

По результатам МТТ-тестов нами были определены концентрации Протаргола, при котором наблюдалась максимальная цитотоксичность: $2*10^{-2}$ - $5*10^{-1}$ мг/мл в культуре ФБ и $2*10^{-2}$ - $1*10^{-2}$ мг/мл в культуре НСК. Любопытным оказался факт, что при повышении концентрации Протаргола выше указанных значений, вплоть до 20 мг/мл, выживаемость клеток повышается. Также при концентрациях ниже $1*10^{-2}$ мг/мл в культуре ФБ и $2*10^{-3}$ мг/мл в культуре НСК цитотоксическое действие Протаргола практически отсутствует.

По результатам тестов на пролиферацию определено, что Протаргол оказывает ингибирующее действие на ФБ в концентрации от 1 мг/мл до $1*10^{-3}$ мг/мл, на НСК - во всех исследованных концентрациях, однако не выявлено прямой зависимости «доза-эффект». Интересным оказался факт, что при концентрации 20 мг/мл для ФБ и 1 мг/мл для НСК на 8-й и 4-й дни культивирования соответственно отмечается резкое снижение скорости пролиферации.

Таким образом, цитотоксичноть Протаргола на дермальные фибробласты и нейральные стволовые клетки человека зависит от концентрации лекарственного препарата, однако не находится в линейной зависимости от нее, и наблюдается в «коридоре» концентраций.

Литература.
1. Khan S.T., Musarrat J., Al-Khedhairy A.A. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status // Colloids Surf. B. Biointerfaces. 2016. V. 146. P. 70-83. 2. Березина Е.С., Смирнова М.М., Петухова А.В. Технологические аспекты и методы контроля растворов колларгола и протаргола различных концентраций: материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию ПГФА // Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: от разработки до коммерциализации / Пермь. - 2011. - С. 47-50. 3. Дурнев А.Д. Оценка генотоксичности наночастиц при использовании в медицине // Гигиена и санитария. 2014. - № 2(93). - С. 76-83. 4. Марахова А., Жилкина В., Блынская Е., Алексеев К., Станишевский Я. Определение размеров наночастиц в коллоидных растворах методом динамического рассеяния света // Наноиндустрия. - 2016. - №1(63). - С. 88-93.

Финансирование: оплата РУДН

CYTOTOXIC EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF PROTARGOL ON HUMAN DERMAL FIBROBLASTS ANS NEURAL STEM CELLS

N.Meshcheryakova[1], V.Zhilkina[1], A.Marahova[1], E.Dashinimaev[2]

[1]Peoples' Friendship University of Russia, Russia, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 6
[2]Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences IDB RAS, Russia, 119334, Moscow, Vavilova str., 26

The cytotoxic effect of different concentrations of Protargol on human dermal fibroblasts and neural stem cells is studied. It is determined that Protargol inhibits the proliferation and normal functioning of these cell lines by nonlinear relationship.

Key words: colloidal silver, Protargol, dermal fibroblasts, neural stem cells

Today large prospect for the application in medicine as the substitutes of antibiotics have the colloidal solutions of silver. Protargol is the proteinat of silver, produced in the form of powder, which substantially increases the period of its storage, and forming in the water sol. Protargol is used widely as the antimicrobic substance of the wide spectrum and anti-inflammatory agent .However today there is a lack of studies of the toxicity of Protargol for different types of human cells. The aim of our study is the determination of cytotoxic effects of Protargol on human dermal fibroblasts and neural stem cells in culture in vitro.

The study was carried out on the culture of the immortal human dermal fibroblasts from line of 1608hT (FB) and human neural stem cells (NCS). NCS were produced by the direct differentiation from the induced pluripotent stem cells from the line KYOUDXR0109B.The cytotoxic effect of Protargol was investigated with the help of MTT-test and the test for the proliferation. The tests were administered on 2, 4, 6, 8, 10 days of cultivation.

According to the results of MTT- tests, the cytotoxic concentrations of Protargol were determined. The highest cytotoxicity

was observed in the concentration $2*10^{-2}$ - $5*10^{-1}$ mg/ml for FB and $2*10^{-2}$ - $1*10^{-2}$ mg/ml for NSC. It is interesting, that with the increase of the concentration of Protargol up to 20 mg/ml, the viability of the cells rises. The cytotoxic effect of Protargol is practically absent with the concentrations lower than $1*10^{-2}$ mg/ml for FB and $2*10^{-3}$ mg/ml for NSC.

According to the test results for the proliferation, it is determined, that Protargol inhibits the proliferation of FB much in the concentration from 1 mg/ml to $1*10^{-3}$ mg/ml, the proliferation of NSC - in all investigated concentrations. However, there is no evidence of the direct dependence "dose- effect". It is also interesting that with concentration 20 mg/ml for FB and 1 mg/ml for NSC on the 8th and 4th days of cultivation respectively sharp reduction of proliferation is noted.

Thus, the cytotoxic influence of Protargol on human dermal fibroblasts and neural stem cells depends on the concentration of the drug in a nonlinear relationship.

References:
1. Khan S.T., Musarrat J., Al-Khedhairy A.A. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status // Colloids Surf. B. Biointerfaces. 2016. V. 146. P. 70-83. 2. Berezina E.C., Smirnova M.M., Petuchova A.V. The technologacal aspects and inspection methods for collargol and protargol solutions of different concentrations: data from the international research-to-practice conference dedicated to the 75 anniversary of PSFA // Actual problems of science of pharmaceutic and medical schools: from development to commercialization / Perm. 2011. C. 47-50. 3. Durnev A.D. Genotoxicity charachterization of nanoparticles used in medicine // Sanitary science. - 2014. № 2(93). - C. 76-83. 4. Marachova A., Zhilkina V., Blynskaya E., Alekseev K., Stanishevskiy Ya.Determination of nanoparticle size in colloidal solutions by dynamic light scattering // Nanoindustry. - 2016. - №1(63). - C. 88-93.

УДК: 544, ББК: 165

ПРИМЕНИМОСТЬ ВЕБ-РЕСУРСОВ ПО ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ПРОФИЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДЛЯ РЕПОЗИЦИОНИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВ

Х.А.Муртазалиева, В.В.Поройков, Дружиловский

1Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), Россия, 119121, Москва, Погодинская, 10, khalimat.murtazalieva@gmail.com, 89636351733

Произведена оценка применимости свободно-доступных веб-ресурсов по прогнозированию профилей биологической активности для репозиционирования лекарств. Валидация качества прогноза веб-сервисов показала, что значения «чувствительности» варьируют от 0,64 до 1,00 и от 0,64 до 0,98 для предсказания активностей, ассоциированных с исходными и репозиционированными показаниями к применению, соответственно.

Ключевые слова: репозиционирование лекарств, химико-биологические взаимодействия; биоинформатика; подходы, основанные на структуре лигандов

В последние годы наблюдается повышение интереса к репозиционированию лекарств, так как при этом уменьшается риск получения отрицательного результата и снижаются временные и финансовые затраты, по сравнению с разработкой препарата de novo. Поэтому проекты по репозиционированию лекарственных препаратов могут быть осуществлены академическими учреждениями. При разработке лекарственного препарата экспериментальное тестирование соединения на все возможные виды биологической активности практически неосуществимо, поэтому многие виды биологической активности, остаются неизученными. В настоящее время, благодаря накоплению большого объема информации о структуре и биологической активности веществ, стали появляться свободно-доступные через Интернет веб-сервисы по предсказанию профилей биологической активности, которые могут быть полезны в проектах по репозиционированию лекарств. Мы сопоставили семь свободно-доступных в Интернете веб-сервисов, используя подготовленную нами тестовую выборку из 50 репозиционированных препаратов, относящихся к разным химическим классам, с различными показаниями к применению и фармакологическими мишенями. Оказалось, что, в соответствии с точностью прогноза (в качестве критерия мы выбрали «чувствительность»), изученные веб-сервисы могут быть ранжированы следующим образом: TarPred (0.64/0.64) < SuperPred (0.76/0.64) < SwissTargetPrediction (0.72/0.72) < SEA (0.80/0.78) < TargetHunter (0.82/0.82) < ChemProt (0.82/0.84) < PASS (1.00/0.98) - в скобках приведены значения чувствительности,

разделенные косой чертой для исходных и репозиционированных показаний, соответственно. Методы машинного обучения позволяют достичь более высокой точности прогноза (PASS-1.00/0.98). Использование попарного консенсуса результатов предсказаний позволяет улучшить качество прогноза (при объединении прогнозов SwissTargetPrediction и TarPred «чувствительность» возрастает до 0,90 вместо 0,72 – max для исходных показаний; ChemProt и TarPreddо 0,94 вместо max 0,84 – для репозиционированных показаний).

В целом, мы обнаружили, что свободно-доступные веб-ресурсы по прогнозированию профилей биологической активности могут быть полезны для планирования фармакологического тестирования и клинических испытаний в проектах по репозиционированию лекарств.

Финансирование: Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ-DST № 16-45-02012-INT/RUS/RSF/12.

APPLICABILITY OF WEB-SERVICES PREDICTING BIOACTIVITY PROFILES FOR DRUG REPURPOSING PROJECTS

K.Murtazalieva, Poroikov, D.Druzhilovskiy

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Russian Federation, 119121, Moscow, Pogodinskaya, 10

Retrospective assessment of the performance of seven freely available web services predicted bioactivity profiles using evaluation set of 50 repositioned drugs demonstrates that the sensitivity values vary from 0.64 to 1.00 and from 0.64 to 0.98 for the initial and repurposed indications, respectively.

Key words: polypharmacology, drug repurposing, ligand-based approach, drug-target-disease network, systems biomedicine, multi-target action

An increased interest to drug repurposing is observed today, which may be explained by higher probability success of drug-repurposing projects and fewer resources necessary for drug repurposing in comparison with de novo drug development; thus, drug repositioning projects may be performed by academic researchers. Experimental study of multitargeted drug action is rather expensive and may provide the coverage of the relatively small part of ample pharmacological space. In recent years some freely available via Internet computational tools for prediction of biological activity profiles of drug-like compounds appeared, due to the accumulation of large amounts of data on the biological activity of substances, they may be useful in drug-repurposing projects. Until now, there was no systematic evaluation of these web resources, to establish their relative strength and weakness. We evaluated seven freely available predictive services using the set of 50 repositioned drugs represented diverse chemical classes, the variety of indications, and different pharmacological targets. We show that, according to the predictive accuracy (sensitivity), the studied web-services could be arranged in the following ascending order: TarPred (0.64/0.64) < SuperPred (0.76/0.64) < SwissTargetPrediction (0.72/0.72) < SEA (0.80/0.78) < TargetHunter (0.82/0.82) < ChemProt (0.82/0.84) < PASS (1.00/0.98) - in the parentheses, listed the sensitivity values separated by a slash for initial and repurposed indications. Based on the obtained results, one may conclude that the performance of machine learning approaches supersedes those based on the chemical similarity methods (PASS - 1.00/0.98). Utilization of the consensus prediction by several web-resources allows to increasing the predictive accuracy (when we are combining prediction results obtained by use SwissTargetPrediction and TarPred, «sensitivity» is increased to 0.90 instead of 0.72 - max for initial indications; ChemProt and TarPred to 0,94 instead max 0,84 – for repurposed indications).

In general, we found that freely available web-services for profiling of biological activity may be used for planning of pharmacological testing and clinical studies in drug repurposing projects.

Grant: Acknowledgement. The work is supported by the RSF-DST grant No. 16-45-02012-INT/RUS/RSF/12.

УДК: 615.375, ББК: 52.63

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КРАСНУХИ НА ОСНОВЕ СТРУКТУРНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЧАСТИЦ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ

Н.А.Никитин, Е.А.Трифонова, Е.М.Рябчевская, Е.В.Путляев, Е.К.Донченко, О.А.Кондакова, И.Г.Атабеков, О.В.Карпова

МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12, nikitin@mail.bio.msu.ru, 84959395367

Проведены доклинические испытания вакцины против краснухи на основе структурно модифицированного вируса растений. Показаны высокая эффективность и безопасность кандидатной вакцины.

Ключевые слова: современные вакцины, краснуха, вирусы растений, структурно модифицированные вирусные частицы, доклинические испытания

Краснуха является острой вирусной инфекцией. Заражение этой инфекцией опасно для беременных женщин и женщин репродуктивного возраста, так как осложнением краснухи является его тератогенное действие на плод, особенно в первые недели беременности. Инфекция может привести к самопроизвольному аборту, смерти плода или серьезным последствиям, связанным с врожденными пороками развития, известными как синдром врожденной краснухи. В настоящее время большинство используемых в мире вакцин против краснухи основаны на ослабленных штаммах вируса, реплицирующихся в клеточных линиях человека. Несмотря на эффективность и относительную безопасность аттенуированной вакцины, важно учитывать, что живые вакцины, содержащие вирус способный к репликации несут риск реверсии к патогенной форме, а получение вируса в клеточных линиях человека является довольно дорогим процессом.

Вирусы растений являются перспективными инструментами для создания вакцин нового поколения. Одним из основных преимуществ вирусов растений является биологическая безопасность ввиду отсутствия общих патогенов у растений и животных.

Ранее было показано, что при термической денатурации палочковидного спирального вируса табачной мозаики образуются частицы сферической формы белковой природы. Полученные частицы стабильны, иммуногенны, биодеградируемы и обладают высокой адсорбционной активностью.

На основе сферических частиц в качестве адъюванта и рекомбинантного антигена вируса краснухи была получена кандидатная вакцина против краснухи. Проведены доклинические исследования кандидатной вакцины, которые показали ее высокую эффективность. Продемонстрировано, что вакцина индуцирует сильный гуморальный иммунный ответ с высоким титром IgG1 антител, которые играют ключевую роль в иммунном ответе против естественной инфекции. Важно отметить, что на антиген вируса краснухи в крови иммунизированных животных вырабатывалось значительно большее количество антител, чем на адъювант (сферические частицы). Было проведено сравнение эффективности сферических частиц в качестве адъюванта с адъювантами, которые используются в человеческих вакцинах и лабораторной практике. Проведены исследования по изучению мутагенности, аллергенности, хронической токсичности, субхронической токсичности, эмбриотоксичности и иммунотоксичности вакцины. Вакцина показала свою полную безопасность по исследуемым параметрам на животных моделях. Осуществлен подбор оптимальной дозы вакцины и соотношения антиген вируса краснухи:адъювант. Таким образом, полученная кандидатная вакцина может стать эффективным и безопасным средством борьбы с вирусом краснухи.

PRECLINICAL TRIALS OF RUBELLA CANDIDATE VACCINE BASED ON A STRUCTURALLY MODIFIED PLANT VIRUS

N.Nikitin, E.Trifonova, E.Ryabchevskaya, E.Putlyaev, E.Donchenko, O.Kondakova, J.Atabekov, O.Karpova

Lomonosov Moscow State University, Russia, 119234, Moscow, Leninskie gory, 1/12

Preclinical trials of Rubella candidate vaccine based on structurally modofied plant virus were conducted. High effectiveness and safety of candidate vaccine were shown.

Key words: vaccine, rubella, plant virus, structurally modified plant virus, preclinical trials

Rubella is a highly contagious viral infection. This infection is dangerous for pregnant women and women of reproductive age. The major complication of rubella is its teratogenic effects on the fetus, especially in the early weeks of pregnancy. Infection can lead to spontaneous abortion, fetal death or children born with congenital rubella syndrome (CRS). All rubella vaccines used throughout the world are based on attenuated virus strains, and most of them have been produced in human cell lines. Despite the effectiveness and relative safety of attenuated rubella

vaccine, it is important to take into account that live vaccines containing replicating virus carry the risk of reversion to the virulent form, and that propagation of virus in human cell lines is a rather expensive process.

Plant viruses are promising tools for design a new generation of vaccines. One of the main advantages of plant viruses is biological safety due to the lack of common pathogens in plants and animals.

Previously it has been shown that spherical particles of protein nature formed under the thermal denaturation of rod-shaped helical tobacco mosaic virus particles. The particles are stable, immunogenic, biodegradable, and have a high adsorption activity.

Based on the spherical particles as an adjuvant and rubella virus recombinant antigen candidate vaccine against rubella was obtained. Preclinical trials of candidate vaccines that have shown its high efficiency were conducted. It has been demonstrated that the vaccine induces a strong humoral immune response with high titers of IgG1 antibodies, which play a key role in the immune response against natural infection. Importantly that rubella virus antigen in blood of immunized animals produce significantly greater amount of antibodies than the adjuvant (spherical particles). Comparison of the efficacy of spherical particles as an adjuvant with adjuvants used in human vaccines and laboratory practice was conducted. Mutagenicity, allergenicity, chronic toxicity, subchronic toxicity, embryotoxicity and immunotoxicity of candidate vaccine were studied. The vaccine has shown its complete safety for the studied parameters in animal models. The optimum doses and ratios of rubella virus antigen and adjuvant were selected. Thus, candidate vaccine based on spherical particles can be an effective and safe tool against the rubella virus.

УДК: 612.017.12, ББК:

ИММУНОАНАЛИЗ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ТИПА 9N ДЛЯ КОНТРОЛЯ КОМПОНЕНТОВ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

Р.И.Нуриев, И.А.Гальвидис, Н.Е.Ястребова, М.А.Буркин

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Россия, 105064, Москва, Малый Казенный переулок, 5а, mech.inst@mail.ru, +7(495)917-49-00

Получены конъюгат овальбумина с полисахаридом 9N S. pneumoniae и соответствующей специфичности поликлональные антитела, на их основе разработан иммуноферментный анализ для типирования штаммов пневмококка, выявления полисахаридного антигена в биожидкостях организма, вакцинных препаратах, а также для исследования иммунного ответа у вакцинированных лиц.

Ключевые слова: иммуноанализ; капсульный полисахарид; гликоконъюгат; пневмококковая вакцина; серодиагностика.

Разработка отечественной конъюгированной вакцины против пневмококковой инфекции предполагает качественную и количественную оценку отдельных полисахаридных антигенов (Ps) в процессе их выделения и очистки, в составе конъюгатов, а также создание методов исследования иммунного ответа, как у экспериментальных животных, так и у вакцинированных или инфицированных лиц.

В качестве модельного антигена был взят капсульный полисахарид S. pneumoniae типа 9N (Ps9N), который входит в состав полисахаридов 23-валентной вакцины «Пневмо-23», но отсутствует в составе гликоконъюгатов вакцин «Превенар-7» и «Превенар-13». На основе полисахарида был приготовлен конъюгат с овальбумином (OVA-Ps9N), который использовался в качестве твердофазного антигена. Благодаря своим адсорбционным свойствам, OVA-Ps9N позволил в 30 раз, в сравнении с Ps-препаратом, сократить расход антигенного материала и таким образом снизить уровень неспецифических взаимодействий при исследовании иммунного ответа у животных.

В результате многократной иммунизации кроликов штаммом S. pneumoniae серотипа 9N получены поликлональные антитела и разработан конкурентный вариант иммуноферментного анализа (ИФА). Исследование перекрестной реактивности с PS-препаратами серотипов 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18, 19F, 23F выявило абсолютную специфичность анализа в отношении Ps9N, чувствительность (IC50) которого составила 33 нг/мл, а предел определения (IC80) – 2.5 нг/мл. Дополнительное исследование специфичности анализа на суспензиях (109 м.к/мл) пневмококка серотипов 1-33 подтвердило селективность теста в отношении серотипа 9N. Возможность идентификации S. pneumoniae типа 9N (IC50=106м.к./мл), а также выявления Ps9N в сыворотке крови и моче позволяет рассматривать этот тест в качестве диагностического – для типирования возбудителя.

Разработанная ИФА-система может найти применение для качественной и количественной характеристики

компонентов противопневмококковых вакцин в процессе их производства – от наработки антигенного материала и тестирования опытных образцов гликоконъюгатов до оценки поствакцинального иммунитета населения.

Финансирование: Финансовая поддержка при проведении исследований не оказывалась.

IDENTIFICATION OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CAPSULAR POLYSACCHARIDE TYPE 9N IN IMMUNOASSAY FOR VACCINE COMPONENTS CONTROL AND DIAGNOSIS

R.Nuriev, I.Galvidis, N.Yastrebova, M.Burkin

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russia, 105064, Moscow, Malyj Kazionnyj per., 5a

The conjugate of ovalbumin with polysaccharide 9N of S. pneumoniae and anti-Ps9N polyclonal antibodies were obtained. Using these reagents, we developed ELISA, which is suitable for S. pneumoniae serotype 9N identification, detection of polysaccharide antigens in body fluids and vaccines, and assessment of immune responses to vaccination.

Key words: immunoassay; capsular polysaccharide; glycoconjugate; pneumococcal vaccine; serodiagnostics.

The qualitative and quantitative evaluation of polysaccharide antigens is essential in the development of conjugate vaccines against pneumococcal infections, e.g. in processes as antigen production and purification and conjugate synthesis. There is also an absolute necessity to assess the immune responses in experimental animals and vaccinated persons.

As a model antigen we chose capsular polysaccharide of S. pneumoniae serotype 9N (Ps9N), which is included in 23-valent polysaccharide vaccine «Pneumo-23», but is not a component of conjugate vaccines «Prevenar-7» or «Prevenar-13». We prepared the conjugate of Ps9N and ovalbumin (OVA-Ps9N) to be used as an immobilized antigen in ELISA. Coating of the conjugate allowedthe 30-fold reduction of antigen demand in immunoassay in comparison with the use of Ps9N. As a result, the nonspecific interactions in the immune response assessments were also diminished.

We obtained polyclonal rabbit antibodies against S. pneumoniae serotype 9N after repeated immunizations and developed indirect competitive ELISA. The cross-reactivity examinations with polysaccharides from serotypes 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18, 19F, 23F showed absolute specificity of assay toPs9N. The sensitivity (IC50) of this assay was 33 ng/ml, and the limit of detection (IC80) was 2.5 ng/ml. The additional tests for specificity were carried out using pneumococcal bacterial suspensions serotypes 1 to 33 (109 cells per ml), which confirmed the selectivity of the assay for serotype 9N.

The ELISA could be used for the identification of S. pneumoniae serotype 9N (IC50=106 cells per ml) and for the detection of Ps9N in serum and urine. Thus, it would be helpful in medical diagnosis.

The assay is suitable for quantitative and qualitative assessments in the different stages of the pneumococcal vaccine development: in the antigen preparations, in the experimental conjugate samples testing, and in the immune response investigations.

УДК: 57.088.1, ББК: 28.492

АНАЛИЗ ОКРУЖЕНИЯ ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ДАННЫХ NGS

Е.И.Олехнович[1], А.Т.Васильев[2], А.Е.Самойлов[3], В.И.Ульянцев[4], А.В.Тяхт[5]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агенства России., Россия, 119435, Москва, Малая Пироговская , 1а, jeniaole13@mail.ru, 89251720794
[2]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Россия, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, 49, jeniaole13@mail.ru, 89251720794
[3]Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агенства России., Россия, 119435, Москва, Малая Пороговская, 1а, jeniaole13@mail.ru, 89251720794
[4]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и

оптики, Россия, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, 49, jeniaole13@mail.ru, 89251720794
[5]Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агенства России., Россия, 119435, Москва, Малая Пороговская, 1а, jeniaole13@mail.ru, 89251720794

Разработан алгоритм, позволяющий извлекать из метагеномных данных информацию об окружении генов лекарственной устойчивости. Проведен разведочный анализ метагеномных и геномных данных на предмет обнаружения свидетельств событий горизонтального переноса, а также прослеживания возможных путей передачи генов резистентности к антибиотикам в пределах микробиоты кишечника человека.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, метагеномная сборка de novo, граф де Брейна, горизонтальный перенос генов

Устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний к противомикробным препаратам — одна из глобальных проблем мирового здравоохранения. Существует гипотеза, что при длительном воздействии антибиотиков кишечная микробиота человека может накапливать гены лекарственной устойчивости и передавать их при помощи механизмов горизонтального переноса.

Нами был разработан алгоритм, позволяющий извлекать максимальную информацию по окружению интересующего гена в исследуемом метагеноме с помощью исчерпывающего анализа графа локальной сборки. Программа осуществляет классические шаги метагеномной сборки и строит граф вокруг целевой последовательности. Алгоритм строит граф де Брейна и ищет подграф, содержащий целевой ген, используя модификацию алгоритма обхода графа в ширину. Результирующий граф выводится в одном из нескольких форматов, включая GFA (Graphical Fragment Assembly), Velvet LastGraph и другие, который можно визуализировать при помощи специализированных программ. Алгоритм также позволяет выполнить объединение графов (например, разные временные точки, полученные от одного пациента), с выделением общих и различающихся частей и детектировать перекрывающиеся участки сборки. Алгоритм реализован на языке Java.

Нами был осуществлен поиск генов лекарственной устойчивости в геномных и метагеномных данных при помощи программы Bowtie2 и базы данных CARD (http://card.mcmaster.ca). Поиск плазмид осуществляли используя контиги, полученные в результате сборки с использованием программ Ray и SPAdes, и алгоритм Blast. Используя разработанный алгоритм, мы строили метагеномное окружение найденных структур. Таксономическую аннотацию узлов графа проводили при помощи программы Kraken. Визуализация полученных графов осуществлялась в Bandage.

Созданный алгоритм был применен для анализа новых метагеномных данных, полученных на секвенаторе Illumina HiSeq по образцам кала от пациентов с Helicobacter pylori. Забор биоматериала проводили до и после курса эрадикации, включающего прием антибиотиков. В данных секвенирования геномов изолированных бактерий были найдены гены лекарственной устойчивости в составе графовой структуры, обладающей высокой степенью гомологии с плазмидными последовательностями, что позволило нам построить графы метагеномного окружения генов резистентности и плазмиды, и проследить путь перехода данных генов из одного окружения в другое.

Исходя из полученных данных о наличии генов в геноме изолированного Enterococcus faeciumи топологии соответствующего графа метагенома после приема антибиотиков, можно предположить, что гены tetM, tetL и ErmT входят в состав одной мобильной генетической структуры, приобретенной целевым микроорганизмом путем конъюгации.

Таким образом, данный алгоритм позволяет детектировать возможные события горизонтального переноса генов и выдвигать гипотеза относительно протекания данного процесса в микробиоте. Дальнейшая валидация и расширение данных находок углубит понимание горизонтального переноса АР-генов в пределах микробиоты человека.

Финансирование: Работа была профинансирована Российский научным фондом (грант №15-14-00066).

ANALYSIS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES ENVIRONMENT USING HUMAN GUT METAGENOMIC DATA

E.Olekhnovich[1], A.Vasilyev[2], A.Samoilov[3], V.Ulyantsev [4], A.Tyakht[5]

[1]Federal State Budget Institution Federal Research and Clinical Centre of Physical and Chemical Medicine, Federal

Medical and Biological Agency of Russia, Russia, 119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya, 1a
[2]Federal State Autonomic Educational Institution of Higher Education St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Russia, 197101, St. Petersburg, Kronverkskiy prospect, 49
[3]Federal State Budget Institution Federal Research and Clinical Centre of Physical and Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Russia, 119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya, 1a
[4]Federal State Autonomic Educational Institution of Higher Education St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Russia, 197101, St. Petersburg, Kronverkskiy prospect, 49
[5]Federal State Budget Institution Federal Research and Clinical Centre of Physical and Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Russia, 119435, Москва, Malaya Pirogovskaya, 1a

We developed an algorithm which allows to extract information about the environment of antibiotic resistance genes from the metagenomic data. We conducted an analysis of metagenomic and genomic data to detect potential horizontal gene transfer events, as well as to suggest possible pathways of antibiotic resistance transmission within the microbiota.

Key words: antibiotic resistance, metagenomic assembly de novo, de Bruijn graph, horizontal gene transfer

Resistance of infectious agents to antimicrobial drugs is one of the global issues of world health. There is a hypothesis that as the result of prolonged exposure to antibiotics, human gut microbiota can accumulate drug resistance genes and serve as a reservoire for horizontal transfer of these genes.

We have developed an algorithm that allows to explore all paths in a metagenomic graph providing the way to extract the detailed information on the environment of the gene of interest in the metagenome. The program provides the classic steps of metagenomic assembly and constructs a graph around the target sequence. The algorithm builds a de Bruijn graph and searches for a subgraph containing the target gene using a variation of the breadth-first graph traversal algorithm. The resulting graph is recorded in one of several formats including the GFA (Graphical Fragment Assembly), Velvet LastGraph and others that can be visualized using specialized software. The algorithm also allows to display differential graph (e.g., different time points obtained from the same patient)with the detection of common and varying parts in the environment. The algorithm is implemented in Java.

We searched for drug resistance genes in the genomic and metagenomic data using Bowtie2 programs and CARD databases (card.mcmaster.ca). We identified plasmids in contigs from genomic and metagenomic assemblies using Ray, SPAdes, and BLAST algorithms. We constructed metagenomic environment of the detected structures using the new algorithm. Taxonomy annotation of graph nodes was performed using Kraken. Visualization of the graph was performed using Bandage.

Our algorithm was used to analyze new metagenomic data obtained using Illumina HiSeq platform from stool samples of patients with Helicobacter pylori infection. Biomaterial was collected before and after the eradication that included the use of antibiotics.

The antibiotic resistance genes were identified in the sequencing data for the genomes of isolated bacteria as part of the graph structure with a high degree of homology to the plasmid sequences, absent prior to therapy and present afterwards, that has allowed us to build the graph of metagenomic environment for resistance genes and plasmid and trace the potential transition of these genes from one environment to another.

Basing on the presence of genes in the genome of isolated data Enterococcus faecium and topology of metagenomic graph after appropriate antibiotic therapy, the tetM, tetL and ErmT genes are supposed to be a part of a mobile genetic structure acquired by conjugation.

Thus, the algorithm can detect the possible events of horizontal gene transfer and state hypotheses about the transfer details in the microbiota. Further validation and expansion of the data discoveries will improve the understanding of the horizontal transfer of AR genes within the human microbiota.

Grant: This study was funded by the Russian Scientific Foundation (grant #15-14-00066).

УДК: 547.898, ББК: 24.239.

СОЗДАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

П.В.Островерхов[1], М.А.Грин[1], А.М.Николаев[1], М.А.Абакумов[2], А.С.Семкина[2], В.П.Чехонин[2]

[1]Московский технологический университет, Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского , 86, mrp_ost@mail.ru, +7 (985) 186-13-95

[2]*Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, abakumov1988@gmail.com, +79035864777*

Получены наноструктурированные фотосенсибилизаторы на основе производных бактериохлорофилла а и магнитных наночастиц. Была обнаружена зависимость между структурой фотосенсибилизатора и эффективностью его загрузки.

Ключевые слова: нанотехнолигии, фотодинамическая терапия, магнитные наночастицы, магнитно-резонансная томография.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является относительно мягким неинвазивным методом терапии онкологических заболеваний. Среди плюсов ФДТ стоит отметить: локальность действия, возможность амбулаторного проведения процедуры, отсутствие послеоперационных осложнений, снижение системного токсического воздействия на организм. Однако сами фотосенсибилизаторы (ФС) ограниченно накапливаются в опухоли, а также гидрофобны. Конъюгация ФС с наночастицами позволит увеличить селективность накопления в опухоли (эффект EPR) и растворимость препарата в воде.

Целью исследования является создание наноструктурированого фотосенсибилизатора на основе производных бактериохлорофилла а (Бхл а) и магнитных наночастиц (МНЧ) для комбинированной фотодинамической терапии и диагностики злокачественных новообразований и изучения его свойств.

В качестве ФС были выбраны аминоамиды в ряду бактериохлорофилла а, полученные из биомассы бактерий Rhodobactercapsulatus[1]. На последней стадии синтеза для раскрытия экзоцикла были использованы различные нуклеофилы с терминальной аминогруппой. Таким образом были получены три производных Бхл а с разными боковыми заместителями, которые отличаются длинной углеродного фрагмента ФС4, ФС6 и ФС8 (рис.1)

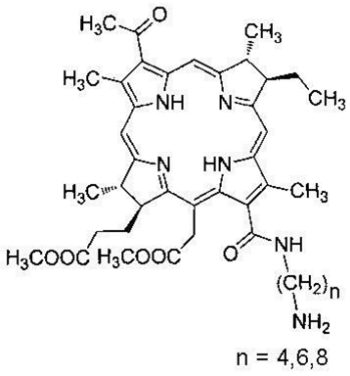


Рисунок 1. Аминоамиды в ряду бактериохлорофилл а

По описанной методике [2] были получены магнитные наночастицы, стабилизированне сывороточным альбумином (СА) и покрытые полиэтиленгликолем NH2-PEG-OH (ПЭГ).

Была изучена стабильность ФС и МНЧ в смесях органический растворитель/вода, для выбора оптимальных условий для иммобилизации. Были получены и охарактеризованы комплексы МНЧ-ФС. Показано, что ФС сохранил как фотофизические свойства, так и способность к генерации синглетного кислорода. Также была обнаружена зависимость между длинной углеродного фрагмента ФС и стабильностью комплекса МНЧ-ФС, наиболее стабильным является комплекс с ФС8. Размеры комплексов МНЧ-ФС составляют 88 нм, 69 нм и 64 нм для ФС4, ФС6 и ФС8 соответственно. При изучение эффективности загрузки ФС было обаружено, что наибольшая загрузка наблюдается для комплекса МНЧ-ФС8.

Литература.
Патенты 1 Патент РФ № 0002548675 C2, 2015 Статьи из журналов и сборников 2 Semkina A. S., Abakumov M. A., Chekhonin V. P. Core-Shell-Corona Doxorubicin-Loaded Superparamagnetic Fe3O4 Nanoparticles for Cancer Theranostics//Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015 Dec 1

Финансирование: Работа была проведена при поддержке гранта РФФИ «Мол_а_дк» № 16-33-60180

PHOTOSENSITIZERS NANOCOJUGATES FOR COMBINED THERAPY AND DIAGNOSTICS OF MALIGNANT TUMORS

P.Ostroverkhov[1], M.Grin[1], A.Nikolaev[1], M.Abakumov[2], A.Semkina[2], V.Chekhonin[2]

[1]Moscow Technological University, Russia, 119571, Moscow, Vernadsky Avenue, 86
[2]Pirogov Russian National Research Medical University , Russia, 117997, Moscow, Pirogov Russian National Research Medical University, 1

Nanostructured photosensitizers based on derivatives of bacteriochlorophyll a and magnetic nanoparticles were obtained. Correspondence between the structure of the photosensitizer and the efficiency of its immobilization was discovered.

Key words: nanotechnology, photodynamic therapy, magnetic nanoparticles, magnetic resonance imaging.

Photodynamic therapy (PDT) is a relatively soft non-invasive method of cancer therapy. Among the advantages of PDT following advantages can be noted: local actions, the possibility of outpatient carrying out procedures, the lack of post-surgical complications, reduction of systemic toxic effects on the patient. However photosensitizers (PS) have limited accumulations in tumors, and also they are hydrophobic. Conjugation of PS with nanoparticles will increase its selectivity of accumulation in the tumor (via EPR effect) and the drug solubility in water.

The aim of the study is to produce the nanostructured photosensitizer based on derivatives of bacteriochlorophyll a (BChl a) and magnetic nanoparticles (MNP) for the combined photodynamic therapy and diagnostics of malignant tumors and the study of those complexes properties.

Among wide variety of PS we selected an aminoamides bacteriochlorophyll a derivatives obtained from the biomass of bacteria Rhodobacter capsulatus [1]. At the last stage of the synthesis we used a nucleophiles with terminal amino group for exocyclic cleavage and addition. Thus three BChl derivatives (PS4, PS6 and PS8) with different lateral substituents, which characterized by number of methylene units were synthesized. (Figure 1).

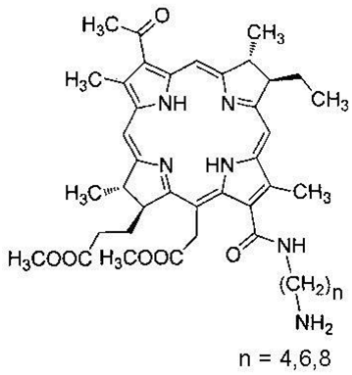


Figure 1. Aminoamide bacteriochlorophyll a derivatives

By the procedure described [2] we obtained magnetic nanoparticles stabilized serum albumin (SA) and coated with polyethylene glycol NH2-PEG-OH (PEG).

The stability of the PS and the MNP has been studied in mixtures of organic solvent/water to select the optimal conditions for carrying out immobilization. We have synthesized and characterized complexes of MNP with PS. It was shown that the PS retained its photophysical properties and the ability to generate singlet oxygen. It was also found a relationship between carbon fragment length of PS and stability of complex MNP-PS, so the most stable complex is MNP-PS8. Hydrodynamic diameter of MNP-PS complexes were equal to 88 nm, 69 nm and 64 nm for PS4, PS6 and PS8 respectively. The study of photosensitizers immobilization efficiency revealed that maximum loading capacity was observed also for MNP-PS8 complex

References:
Patents 1 RF patent № 0002548675 C2, 2015 Articles from journals and collections 2 Semkina A. S., Abakumov M. A., Chekhonin V. P. Core-Shell-Corona Doxorubicin-Loaded Superparamagnetic Fe3O4 Nanoparticles for Cancer Theranostics//Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015 Dec 1

Grant: Work was supported by RFBR grant «Мол_а_дк» № 16-33-60180.

УДК: 577.112, 577.181, ББК:

БИОИНЖЕНЕРИЯ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ ЗАЩИТНЫХ ПЕПТИДОВ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

П.В.Пантелеев[1], Т.В.Овчинникова[2]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая , 16/10, ibch@inbox.ru, 89169361885
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая , 16/10

В последние годы стремительно растет число штаммов бактерий, устойчивых к действию конвенциальных антибиотиков. Защитные антимикробные пептиды аренициины из морского кольчатого червя Arenicola marina имеют β-шпилечную структуру и проявляют выраженную активность в отношении широкого спектра микроорганизмов, а также обладают высокой цитотоксичностью. В данной работе было проведено структурно-функциональное исследование аренцина-1 с помощью методов сайт-направленного мутагенеза и гетерологической экспрессии в бактериальной системе. Также были исследованы основные механизмы антибактериального и цитотоксического действия аренициина-1 и его модифицированных рекомбинантных аналогов. В результате были разработаны менее токсичные аналоги аренициина-1, проявляющие выраженный мембранолитический и антибиоплёночный эффект в отношении бактерий, включая резистентные к антибиотикам штаммы. Таким образом, природные β-шпилечные антимикробные пептиды являются перспективной основой для биоинженерии новых антибиотиков.

Ключевые слова: антибиотики, резистентные бактерии, антимикробные пептиды, аренициин, рекомбинантный аналог

В последние десятилетия в результате широкого распространения устойчивых к антибиотикам штаммов патогенных микроорганизмов медицина столкнулась с серьезной проблемой, угрожающей свести на нет прогресс, достигнутый в области терапии инфекционных заболеваний. В течение последних 50 лет в клиническую практику были введены всего несколько новых классов антибиотиков, причем для большинства из них мишенью являются грамположительные бактерии [1]. Для преодоления проблемы устойчивости к антибиотикам необходим поиск и введение в клиническую практику новых антимикробных соединений, принципиально отличающихся по механизму действия, применение которых сводило бы к минимуму вероятность появления устойчивых к ним штаммов бактерий.Одним из классов искомых соединений являются защитные антимикробные пептиды (АМП) – ключевые молекулярные факторы системы врожденного иммунитета большинства многоклеточных видов, включая человека [2]. Мембранотропный механизм действия и способность быстро уничтожать клетки-мишени препятствуют формированию резистентности к АМП. К числу наиболее активных и устойчивых к действию протеаз АМП животного происхождения относятся молекулы, образующие стабилизированную дисульфидными связями β-шпилечную структуру. Однако сравнительно высокая цитотоксичность природных пептидов ограничивает их дальнейшее применение в медицине.

Ранее из целомоцитов морского кольчатого червя Arenicola marina нами были выделены и изучены представители нового семейства β-шпилечных АМП, названных аренициинами и состоящих из 21 аминокислотного остатка [3]. В данной работе было проведено структурно-функциональное исследование аренициина-1 с целью поиска подходов, позволяющих снизить цитотоксичность природного пептида и создать терапевтически ценные аналоги, подходящие для применения в медицине. Для этого с использованием методов сайт-направленного мутагенеза и гетерологической экспрессии в бактериальной системе был создан широкий спектр аналогов (более 50 пептидов) аренициина-1, в структуре которого варьировали такие параметры, как гидрофобность, суммарный заряд, а также длина молекулы. Для выяснения причин высокой цитотоксичности природного аренициина-1 был проведен сравнительный анализ гемолитической активности аналогов, а также их общей гидрофобности и пространственной структуры в мембрано-имитирующих средах. В совокупности, полученные данные указывают на то, что высокая гидрофобность не является ключевым фактором, обуславливающим цитотоксические свойства природного пептида.С помощью флуориметрических и фотометрических методов анализа было показано, что основной механизм действия аренициина-1 и его аналогов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий связан с быстрым нарушением целостности мембран. Важно отметить, что для разработанных аналогов аренициина-1 была показана способность убивать бактериальные

клетки вне зависимости от наличия у них устойчивости к классическим антибиотикам. Это свидетельствует об отсутствии эффекта кросс-резистентности бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) к разработанным в данной работе АМП.

С практической точки зрения, результатом исследования является создание ряда селективных в отношении бактерий аналогов ареницина, обладающих пониженной токсичностью как в отношении нормальных клеток человека in vitro, так и в отношении мышей линии ICR в условия in vivo. Системное применение АМП возможно, однако в значительной степени затруднено из-за их протеолитической деградации под действием ферментов, присутствующих в крови. Было показано, что преимуществом β-шпилечных АМП, в частности разработанных аналогов ареницина, перед линейными АМП (α-спиральными и неструктурированными пептидами) является высокая устойчивость к протеолизу, причем время полураспада в сыворотке крови in vitro для некоторых из них составило более 24 ч. Выраженная бактерицидная и антибиоплёночная активность в отношении патогенных бактерий, в том числе, обладающих МЛУ, а также высокий терапевтический индекс позволяют рассматривать разработанные аналоги ареницина в качестве перспективных антибиотиков с широким спектром действия.

1. Были разработаны более селективные в отношении бактерий, менее токсичные и устойчивые к протеолитической деградации аналоги ареницина-1, подходящие для дальнейших предклинических испытаний. 2. Основной механизм действия ареницина-1 и его аналогов в отношении бактерий связан с быстрым нарушением целостности мембран. 3. Показано отсутствие кросс-резистентности бактерий с множественной лекарственной устойчивочтью к разработанным аналогам ареницина-1. 4. Высокая гидрофобность не является ключевым фактором, обуславливающим цитотоксические свойства природного ареницина-1. 5. Природные β-шпилечные антимикробные пептиды являются перспективной основой для биоинженерии новых антибиотиков.

Литература.
[1] C. Lee Ventola, The antibiotic resistance crisis, Part 1: causes and threats, P&T 40 (2015) 277–283. [2] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature 415 (2002) 389–395. [3] T.V. Ovchinnikova, G.M. Aleshina, S.V. Balandin, et al., Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta Arenicola marina, FEBS Lett. 577 (2004) 209–214.

Финансирование: Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 14-14-01036).

BIOENGINEERING OF NOVEL ANTIBIOTICS USING INVERTEBRATE HOST-DEFENSE PEPTIDES

P.Panteleev[1], T.Ovchinnikova[2]

[1]Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russia, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10
[2]Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russia, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10

Over the last years, a growing number of bacterial species have become resistant to conventional antibiotics. The β-hairpin host-defense antimicrobial peptides arenicins from marine polychaeta Arenicola marina exhibit a broad spectrum of antimicrobial activity and high cytotoxicity. In this investigation structure-activity relationship study of arenicin-1 was performed using methods of directed mutagenesis and heterologous expression in bacteria. The main mechanisms of antibacterial activity and cytotoxicity of arenicin-1 analogs were studied. As the result, significantly less toxic analogs possessing strong membrane-disruptive and anti-biofilm activities against bacteria including antibiotic-resistant strains were developed. Thus, natural β-hairpin antimicrobial peptides could be considered as perspective scaffold for bioengineering of novel antimicrobial drugs.

Key words: antibiotics, resistant bacteria, antimicrobial peptides, arenicin, recombinant analog

In recent decades, medicine has faced a serious problem threatening to nullify the progress made in the treatment of infectious diseases as a result of widespread dissemination of antibiotic-resistant strains of pathogenic microorganisms. Over the past 50 years, only a few new classes of antibiotics have been introduced in clinical practice, with most of them targeting Gram-positive bacteria [1]. In this situation, a transition to the search and practical implementation of antibiotics with principally new mechanisms of action that limit selection of resistant mutants seems reasonable. One class of such candidates are host-defense antimicrobial peptides (AMPs) – the key molecular factors of innate immunity of most multicellular organisms, including humans [2]. The membrane-targeting mechanism of their action and the ability to rapidly kill pathogens prevent the evolving

of resistance to AMPs. Among the most active and stable under physiological conditions AMPs of animal origin are the molecules that adopt a β-hairpin conformation stabilized by disulfide bridges. However, the relatively high cytotoxicity of natural peptides limits their application in medicine.

Earlier, we have discovered a new family of 21-residue β-hairpin AMPs, termed arenicins, in coelomocytes of marine polychaeta Arenicola marina [3]. In this investigation, using methods of directed mutagenesis and heterologous expression in a bacterial system we have performed the structure-activity relationship study of arenicin-1 to design less cytotoxic analogs of the peptide. More than 50 modified arenicin-1 analogs were obtained using methods of directed mutagenesis and heterologous expression in bacteria. The comparative evaluation of the impact of different biophysical parameters such as hydrophobicity, net charge, and β-hairpin length was carried out. To evaluate the reasons of high cytotoxicity of natural arenicin comparative analysis of hemolytic activity, overall hydrophobicity, and spatial structure in membrane-mimicking environments of the analogs was performed. Taken together, the obtained data suggest that high hydrophobicity is not the key reason of the cytotoxicity of natural arenicin. Fluorescence spectroscopy and spectrophotometry methods have been used to demonstrate the ability of arenicin and its analogs to disrupt the membrane integrity of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The peptides were also shown to kill both antibiotic-sensitive and extensively drug resistant bacteria with an equal effect, thus arguing against cross-resistance to the AMPs.

From the practical standpoint, a number of much more selective and less toxic analogs, as was shown against both normal human cells in vitro and ICR mice in vivo, were developed. Although AMPs could be used systemically, there are significant obstacles in the circulatory system such as proteolytic degradation. An advantage of developed analogs which adopt β-hairpin structure over linear antimicrobial peptides (α-helical or extended structure) is their high resistance to proteolysis with half-life time in human serum in vitro over 24 h.The pronounced bactericidal and anti-biofilm activity against pathogens including extensively drug resistant ones as well as a wider therapeutic window makes arenicin analogs promising broad-spectrum antibacterial agents.

1. More selective, less toxic and stable to proteolysis analogs of arenicin-1 suitable for further preclinical studies were developed. 2. Arenicin-1 and its analogs exhibit rapid membrane-disruptive activity against bacteria. 3. The peptides were shown to kill both antibiotic-sensitive and extensively drug resistant bacteria with an equal effect, thus arguing against cross-resistance to the AMPs. 4. High hydrophobicity is not the key reason of the cytotoxicity of arenicin-1. 5. Natural β-hairpin antimicrobial peptides could be considered as perspective scaffold for bioengineering of novel antimicrobial drugs.

References:
[1] C. Lee Ventola, The antibiotic resistance crisis, Part 1: causes and threats, P&T 40 (2015) 277–283. [2] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature 415 (2002) 389–395. [3] T.V. Ovchinnikova, G.M. Aleshina, S.V. Balandin, et al., Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta Arenicola marina, FEBS Lett. 577 (2004) 209–214.

Grant: The work is supported by the Russian Science Foundation (the project No. 14-14-01036).

УДК: 547.426.2.057; 547.781, ББК: ББК 24.239

НОВЫЕ НЕГЕМОЛИТИЧЕСКИЕ ЛИПОФИЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПОЛИАМИНОВ ВЫЗЫВАЮТ ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

К.А.Перевощикова[1], А.И.Ничуговский [1], А.К.Исагулиева [1], А.А.Маркова[2], Н.Г.Морозова [3], М.А.Маслов[3], А.А.Штиль[4]

[1]*Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, Россия, 119571, Москва, Проспект Вернадского, 86*
[2]*Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова РАН, Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, 28*
[3]*Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, Россия, 119571, Москва, Проспект Вернадского, 86*
[4]*Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24*

Синтезирована серия липофильных производных полиаминов. Исследование цитотоксичности показало, что в микромолярных концентрациях новые соединения вызывают гибель опухолевых клеток при отсутствии гемолитического повреждения эритроцитов, что выгодно отличает новые производные от известного противоопухолевого липида эдельфозина.

Ключевые слова: полиамины, опухолевые клетки, гемолиз, цитотоксичность

Разработка новых химических классов для создания противоопухолевых лекарств - важная задача современной медицины. Глицеролипиды с простой эфирной связью исследуются как перспективные противоопухолевые агенты [1]. Фосфорсодержащий глицеролипид эдельфозин вызывает гибель опухолевых клеток, однако гемолиз ограничивает его использование в практике [1]. Бесфосфорные аналоги эдельфозина преимущественно токсичны для опухолевых клеток и не вызывают гемолиз [2]. Цитотоксичность бесфосфорных глицеролипидов определяется структурой полярного положительно заряженного домена [3]. В продолжение исследований по изучению связи "структура-противоопухолевая активность" в ряду бесфосфорных глицеролипидов нами увеличено количество положительных зарядов в полярном домене за счет использования природных (спермин) и синтетических (триэтилентетрамин и норспермин) полиаминов.

Синтез липофильных полиаминов осуществляли путем алкилирования региоселективно защищенных производных спермина, триэтилентетрамина и норспермина бромсодержащими производными диглицеридов с последующим удалением защитных групп.

Изучена цитотоксичность (МТТ-тест) новых соединений для клеток рака толстой кишки (HCT116) и миелоидного лейкоза (K562). Все липофильные полиамины вызывали гибель опухолевых клеток в микромолярном диапазоне концентраций, а их противоопухолевая активность зависела от типа полиамина и длины углеводородного заместителя при С(1) положении глицериного скелета. Наличие этильного заместителя при терминальном атоме азота полиамина увеличивало цитотоксичность. Наиболее перспективными для дальнейших исследований оказались полиамины с остатком норспермина в качестве катионного домена. В концентрациях, вызывающих гибель опухолевых клеток, новые соединения не вызывают лизис эритроцитов. Липофильные производные полиаминов не уступают по цитотоксичности эдельфозину и могут рассматриваться в качестве перспективных кандидатов для разработки противоопухолевых препаратов.

Литература.
1. Mollinedo F. Antitumor Alkyl phospholipid analogs: a promising and growing family of synthetic cell membrane-targeting molecules for cancer treatment // Anticancer Agents Med Chem. 2014. Vol. 14, № 4. P. 495-498. 2. Плявник Н.В. и др. Синтез глицеролипидов алкильного типа с функциональными группами в полярном домене // Биоорг. химия. - 2004.- Т. 5, №. 30. – С. 507-511. 3. Маркова А. Аи др. Противоопухолевые фосфатсодержащие липиды и бесфосфорные алкильные катионные глицеролипиды: особенности химической структуры и перспективы разработки препаратов на их основе // Изв. РАН Серия хим. – 2014. - № 5. – С. 1081-1087.

NOVEL NON-HEMOLYTIC LIPOPHILIC POLYAMINE DERIVATIVES INDUCE TUMOR CELL DEATH

A.Nichugovskiy [1], A.Isagulieva [1], A.Markova [2], N.Morozova [3], M.Maslov[3], A.Shtil [4]

[1]Institute of Fine Chemical Technology, Moscow Technological University, Russia, 119571, Moscow, Vernadsky Ave, 86
[2]Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Russia, 119334, Moscow, Vavilova St, 28
[3]Institute of Fine Chemical Technology, Moscow Technological University, Russia, 119571, Moscow, Vernadsky Ave, 86
[4]Blokhin Cancer Center, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24

A series of novel lipophilic polyamine derivatives were synthesized. The obtained compounds were found to induce tumor cells death in the micromolar concentration range without of hemolytic effect – it is an advantage over the known antitumor lipid edelfosine.

Key words: polyamines, tumor cells, cytotoxity

Development of new anticancer agents is an important problem in medicine. Ether glycerolipids based drugs are being considered perpsective [1]. The phosphate-containing glycerolipid edelfosine induces the death of cancer cells, but its practical use is limited by hemolytic activity [1]. Non-phosphorous analogs of edelfosine demonstrated selective cytotoxicity against tumor cells whereas red blood cells were spared [2]. The cytotoxicity of non-phosphorus glycerolipids is determined by the structure of polar cationic "head" [3]. For SAR investigation of non-phosphorus glycerolipids we replaced monocationic "head" group in lipid molecule by a polycationic residue. The latter was formed by natural polyamine spermine and its synthetic analogs triethylenetetramine and norspermine.

Synthesis of lipophilic polyamines was based on an alkylation of regioselectively protected polyamines derivatives with dialkylglycerol bromides and further deprotection of amino groups.

New compounds were tested against human chronic myelogenous leukemia (K562) and colon adenocarcinoma (HCT116) cell lines. All lipophilic polyamines induced tumor cells death in the micromolar concentration range. The potency depended on the type of polyamine and the alkyl chain length at C(1) position of the glycerol backbone. The introduction of ethyl substituent at the terminal amino group of polyamines increased cytotoxicity. The derivative with norspermine cationic domain was the most promising candidate for further investigations. Lipophilic polyamines caused no lysis of erythrocytes. The antitumor potencies of lipophilic polyamine derivatives were comparable with those of edelfosine. Thus, our new compounds can be considered as promising candidates for further preclinical development.

References:
1. Mollinedo F. Antitumor Alkylphospholipid analogs: a promising and growing family of synthetic cell membrane-targeting molecules for cancer treatment // Anticancer Agents Med Chem. 2014. Vol. 14, № 4. P. 495-498 2. Plyavnik N.V., et al. Synthesis of alkyl glycerolipids with functional groups in their polar heads // Russ. J. Bioorganic Chem. 2004. Vol. 5. №.30. P. 454-458 3. Markova A.A., et al. Antitumor phosphate-containing lipids and non-phosphorus alkyl cationic glycerolipids: chemical structures and perspectives of drug development// Russ. Chem. Bull. 2014. Vol. 63. № 5. P. 1081-1087

УДК: 543.066 : 57.083.3, ББК:

ТЕСТ-ПОЛОСКА БЕЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ – ПРОСТОЙ УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ АНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

А.В.Петракова

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, alina.petrakova@gmail.com, 89264321373

Предложена новая схема иммунохроматографического анализа, основанная на прединкубации антигена со специфическими антителами и последующем взаимодействии с нанесенными и высушенными конъюгатами золотых частиц (наносферы и наноцветы), обеспечивающем формирование окрашенных зон разного цвета. На примере детекции микотоксинов показано снижение предела обнаружения на 2 порядка по сравнению с традиционным тестом до 30 пг/мл.

Ключевые слова: иммунохроматографический анализ, наночастицы золота, наноцветы, микотоксины, увеличение чувствительности

Широкое применение иммунохроматографического анализа в современной практике обусловлено простотой использования, низкой стоимостью и быстрому получению результатов. Однако у этого метода имеются и существенное ограничение – для многих аналитов предел обнаружения иммунохроматографических тестов недостаточен. Для решения этой проблемы предложена новая схема конкурентного иммунохроматографического анализа: сухая тест-полоска содержит конъюгат золотых наночастиц, но с антивидовыми антителами, в то время как специфические антитела, в неконъюгированном свободном виде, перенесены в буфер для разбавления пробы. Непрямое введение маркера позволяет значительно повысить чувствительность иммунохроматографии низкомолекулярных соединений, сократив расход специфических иммуноглобулинов. Проведение же в растворе взаимодействия свободных антител с анализируемым антигеном исключает диффузионные ограничения и тем самым увеличивает количество связавшегося с антителами антигена пробы.

Впервые для повышения контрастности окрашивания в аналитической зоне (более эффективной детекции) сферические наночастицы золота светло-красного цвета заменены на золотые наноцветы темно-синего цвета. Оптимизирована методика синтеза наноцветов, получена панель препаратов наночастиц, охарактеризованных методами регистрации динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии. Для окрашивания контрольной зоны использованы традиционные сферические наночастицы золота красного цвета, формирующие специфический комплекс через модуль биотин-стрептавидин.

На примерах детекции микотоксинов – токсичных вторичных метаболитов плесневых грибов: Т-2 токсина, зеараленона, афлатоксина В1, достигнуты пределы обнаружения 50, 30 и 50 пг/мл соответственно, что на два порядка ниже, чем для стандартной схемы иммунохроматографического анализа. Применение наночастиц двух цветов упрощает дифференциацию контрольной и аналитической зон тест-полоски, снижая риск неправильной интерпретации результатов (трактовки результатов недействительного теста как

отрицательных). В то же время данный тест методически не отличается от обычной иммунохроматографической тест-полоски по процедуре применения – для проведения анализа достаточно опустить край теста в разбавленную буфером пробу, не требуются какие-либо дополнительные реагенты и манипуляции.

Предложенная концепция масштабируема. Наиболее сложные стадии разработки (подбор мембран, синтез конъюгатов наночастиц и подбор их соотношений) уже выполнены. Таким образом, для создания высокочувствительной тест-системы на любой антиген достаточно оптимизировать концентрации свободных антител и наносимого конъюгата гаптен-белок, что легко реализуется за 1-2 итерации.

Предложенная концепция универсальна – разработанные подходы могут быть легко перенесены на другой объект, а благодаря использованию неспецифического проявочного реагента не существует принципиальных ограничений для мультипараметрического анализа на одной тест-полоске.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-08-07913_а.

TEST STRIP WITHOUT SPECIFIC ANTIBODIES – A SIMPLE UNIVERSAL TOOL FOR CREATING HIGHLY SENSITIVE ANALYTICAL SYSTEMS

A.Petrakova

Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Russia, 119071, Moscow, Leninsky prospect, 33

A new scheme of lateral flow immunoassay was proposed, it is based on the pre-incubation of the antigen with specific antibodies. Subsequent reaction of the formed complex with applied and dried conjugates of gold particles (nanospheres and nanoflowers) provided formation of areas having different colors. On the example of mycotoxins detection decrease of the detection limit by 2 orders in comparison with the traditional test (to 30 pg/ml) was shown.

Key words: lateral flow immunoassay, gold nanoparticles, nanoflowers, mycotoxins, sensitivity enhancement.

Widespread use of lateral flow immunoassay in current practice is caused by their ease of use, low cost and fast results obtaining. However, this method has significant limitation, i.e. its detection limit is insufficient for many analytes. To resolve this problem, we proposed a new scheme of competitive lateral flow immunoassay: dry test strip contains conjugate of gold nanoparticles, but with the antispecies antibody while specific antibodies in unconjugated free form are transferred to the buffer for the sample diluting. Indirect introduction of the marker can significantly increase the sensitivity of the immunochromatography of low molecular weight compounds, reducing the consumption of specific immunoglobulins. The interaction of free antibody and the target antigen in solution allows excluding diffusion limitations and thereby increasing the amount of antibodies bound to the antigen containined in the sample.

For the first time light red spherical gold nanoparticles were replaced by dark blue gold nanoflowers to improve the contrast coloration of the analytical zone (more efficient detection). Synthesis of nanoflowers was optimized, panel of the obtained nanoparticles preparations were characterized by dynamic light scattering registration and transmission electron microscopy. For coloring control area, traditional red spherical gold nanoparticles were used that formed a specific complex through biotin-streptavidin module.

On examples of the detection of mycotoxins, toxic secondary metabolites of fungi, i.e. T-2 toxin, zearalenone, aflatoxin B1, the achieved detection limits were 50, 30 and 50 pg/ml, respectively, which is two orders lower than for the standard lateral flow immunoassays. The use of nanoparticles of two colors simplifies the differentiation of control and analytical areas of the test strip, reducing the risk of results misinterpretation (invalid interpretation of test results as negative ones). At the same time, this test is not different from the conventional immunochromatographic test strip according to the procedure of use - the test strip should be immersed in a sample diluted with buffer , and the analysis was not require any additional reagents and manipulations.

The proposed concept is scalable. The most difficult stages in the development (membrane selection, synthesis of conjugates of nanoparticles and the selection of their relations) have been completed. Thus, to create a highly sensitive test system to any antigen it is enough to optimize the concentration of free antibody and applied hapten-protein conjugate that is easily realized in 1-2 iterations.

The proposed concept is universal. The developed approaches can be easily transferred to another object, and through the use of unspecific developing reagent there is no fundamental limitations of multiparametric analysis on the same test strip.

Grant: This work was supported by the RFBR grant No 15-08-07913_a.

УДК: УДК: 612.017.1, ББК:

НЕКУЛЬТИВИРУЕМОЕ СОСТОЯНИЕ САЛЬМОНЕЛЛ – ЗАЩИТА ОТ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЙ ОБИТАНИЯ

А.Ю.Пиядина, Ю.Д.Пахомов, Л.П.Блинкова, Н.Н.Скорлупкина

ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» Москва, Россия, Россия, 105064, Москва, Малый Казённый пер. , 5а, denovobios@mail.ru, 89167241395

Изучена динамика перехода клеток штамма Salmonella enterica Typhimurium в некультивируемое состояние в зависимости от источника выделения штамма, этого процесса. Показаны особенности динамики этого процесса для клеток, выделенных из наиболее характерных источников контаминации исследуемым микроорганизмом.
Ключевые слова: Salmonella, некультивируемые клетки, стресс, контаминация

Введение. Некультивируемыми называют клетки (НК), которые под воздействием стресса утратили способность к росту на традиционных питательных средах. Переход в некультивируемое состояние (НС) может занимать от нескольких дней до нескольких месяцев в зависимости от условий и вида микроорганизма. Показано, что имеются штаммовые различия в скорости данного процесса.

Целью работы было изучение динамики перехода Salmonella enterica Typhimurium 79 в НС после предынкубации в различных субстратах.

Материалы и методы. В клетки S. Typhimurium 79 была введена плазмида RP4, содержащая гены устойчивости к ампициллину и канамицину. Клетки штамма были перенесены из питательного бульона после 20 часов культивирования в следующие варианты субстратов: почва (вариант S), водопроводная вода (W), куриный фарш (P), салат из свежих овощей (V), питательный бульон – контроль (C). Время предынкубации составляло 7 дней. После этого микроорганизмы выделяли из образцов на плотный питательный агар с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл канамицина. Полученные колонии переносили во флаконы с искусственной морской водой для создания стрессовых условий. Инкубацию в течение 8 месяцев проводили при комнатной температуре в темноте без перемешивания. Пробы отбирали периодически. В пробах определяли общее количество клеток, численность КОЕ/мл и соотношение живых и мёртвых клеток в люминесцентном микроскопе после окрашивания набором люминесцентных красителей Live/Dead.

Результаты и обсуждение. В течение всего времени наблюдения общая численность клеток менялась статистически незначительно т.е. оставалась на исходном уровне. Через семь дней инкубации клеток значение КОЕ/мл снизилось на 1 порядок, быстрее других в НС переходили сальмонеллы в образце W. Через три недели заметнее всего величина КОЕ/мл уменьшилась в образце P – на 3 порядка, в остальных образцах высеваемость снизилась на 2 порядка. Медленнее всех переход в НС зафиксирован в образце V, Спустя девять недель в образце S отмечен рост единичных колоний, что позволило сделать вывод о том, что данная популяция перешла в НС видимо полностью. Контрольная популяция в течение 3 месяцев обладала наибольшими значениями КОЕ/мл. Через 3 месяца пребывания сальмонелл в условиях стресса отмечено, что клетки варианта Sстали спонтанно выходить из НС, число КОЕ/мл возросло на 4 порядка, но затем показатель снизился и оставался наименьшим среди всех вариантов. К 8 месяцам инкубации наибольшее значение КОЕ/мл наблюдали для образца W– 8,56±0,76×105/мл. Из полученных результатов можно заключить, что инкубация S. enterica Typhimurium 79 в различных субстратах перед попаданием в неблагоприятные условия влияет на скорость перехода клеток штамма в НС. При этом пребывание в почве оказывает наиболее сильное воздействие на микроорганизм. Однако со временем происходила адаптация бактерий к осмотическому стрессу искусственной морской воды, и численность КОЕ/мл стабилизировалась. Пребывание в условиях стресса без аэрации в течение длительного времени не приводило к отмиранию клеток. Также нами начаты исследования по выведению сальмонелл из НС

Выводы. Выявлены особенности динамики образования НК S. Typhimurium 79 после предынкубации бактерий в различных субстратах. Наблюдавшиеся эффекты могут служить возможной причиной некоторых штаммовых различий в скорости перехода в некультивируемое состояние.

Выявлены особенности динамики образования НК S. Typhimurium 79 после предынкубации бактерий в различных субстратах. Наблюдавшиеся эффекты могут служить возможной причиной некоторых штаммовых различий в скорости перехода в некультивируемое состояние.

NONCULTURABLE STATE IN SALMONELLA – PROTECTION AGAINST UNFAVOURABLE CONDITIONS.

A.Piyadina, Y.Pakhomov, L.Blinkova, N.Skorlupkina

FSBSI I.I. Mechnikov RIVS Moscow, Russia, Russia, 105064, Moscow, Maliy Kazenniy per., 5a

Dynamics of entry into nonculturable process of Salmonella enterica Typhimurium depending on the source of isolation of the strain were studied. Specifics of this process were shown for cells isolated from typical sources of contamination of the studied microorganism.

Key words: Salmonella, nonculturable cells, stress, contamination

Introduction. Cells that fail to grow on routine media after stress influence are called nonculturable. Entry into nonculturable state can take from several days to several months depending on conditions and microorganism. It was also shown that there are strain differences in speed of this process.

The aim of this research was to study dynamics of entry process into nonculturable state of Salmonella enterica Typhimurium 79 after preincubation in different substrates.

Materials and methods. RP4 plasmid was inserted into S. Typhimurium cells that had resistance genes for ampicillin, kanamycin. Cells of the strain was transferred from nutrient broth into samples of different substrates: soil (S), tap water (W), minced chicken (P), fresh vegetable salad (V) and nutrient broth - control (C). Preincubation period was 7 days. After that substrains were isolated from samples on nutrient agar that contained 100μg/ml of ampicillin and 50μg/ml of kanamycin. Colonies were transferred into flasks with artificial seawater to create stress conditions. Flasks were incubated for 8 months at room temperature in the dark without agitation. Samples were taken periodically. For each sample CFU/ml values and total cell counts were determined. Cell viability was assessed in a luminescence microscope after staining with Live/Dead double staining kit.

Results and discussion. Throughout the whole observation period total cell counts remained fairly constant near the initial values for all populations. After one week CFU/ml lowered by one order of magnitude and for W variant was shifting to nonculturability at the fastest rate. After 3 weeks the lowest culturability was observed for variant P. It was 3 orders of magnitude lower than total cell counts. In other populations CFU/ml dropped by 2 orders of magnitude. The highest culturability at this point was observed for variant V. After 9 weeks in population S, only singular colonies grew. This means that this substrain probably fully shifted to nonculturability. Within first 3 months of observation control population had highest CFU/ml values After 3 months of incubation in stressful conditions cells of substrain S started exiting the VBNC state – CFU/ml increased by 4 orders of magnitude but after that lowered again and remained the lowest among all substrains. By 8 months the highest CFU/ml value was observed for the substrain W. Obtained data suggest that preincubation in different substrains prior to entering stress conditions influences speed of shifting into nonculturable state of S. enterica Typhimurium 79 and soil has the greatest impact. However in time cells adapted to artificial seawater and numbers of CFU/ml stabilized. Existing in stressful conditions without aeration does not lead to cell death. We also conducted studies in order to resuscitate salmonella from nonculturable state.

Conclusions. Specifics of entry into nonculturable state dynamics for S. Typhimurium 79 were studied after preincubation in different substrates before entering stressful environment. Observed effects can be the cause of some strain differences in speed nonculturable cell formation.

Specifics of entry into nonculturable state dynamics for S. Typhimurium 79 were studied after preincubation in different substrates before entering stressful environment. Observed effects can be the cause of some strain differences in speed nonculturable cell formation.

.....

УДК: 544.165, ББК:

KINSCREEN: ВЕБ-СЕРВИС ДЛЯ IN SILICO ПОИСКА И ОПТИМИЗАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ ЧЕЛОВЕКА

П.В.Погодин, А.А.Лагунин, В.И.Дубовская, Д.С.Дружиловский, А.В.Рудик, Д.А.Филимонов, В.В.Поройков

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), Россия, 119121, Москва, Погодинская, 10, pogodinpv@gmail.com, +79166971274

Нами разработан веб-сервис KinScreen, позволяющий на основе структурной формулы органического соединения получить оценки вероятностей проявления ингибирующей активности в отношении более трехсот протеинкиназ человека. Веб-сервис может применяться с целью поиска in silico новых селективных ингибиторов протеинкиназ, а также для оптимизации экспериментальных исследований фармакологических веществ.

Ключевые слова: протеинкиназы; ингибиторы протеинкиназ; хемоинформатика; веб-сервис; (Q)SAR; компьютерная оценка активности химических соединений.

Протеинкиназы вовлечены в регуляцию практически всех процессов, протекающих в живой клетке. Эти ферменты играют важную роль в патогенезе множества заболеваний и представляют особый интерес в качестве терапевтических мишеней. Только за последние четыре года более десяти ингибиторов киназ были разрешены к применению в клинической практике. Разработка препаратов этого класса осложняется необходимостью экспериментального тестирования их активности в отношении множества протеинкиназ на самых ранних этапах. Масштабное тестирование необходимо для выбора кандидатов, характеризующихся балансом между эффективностью и безопасностью. Оптимизировать этот процесс призван разработанный нами веб-сервис, KinScreen. В основе KinScreenлежит компьютерная программа PASS (Pred ictionofActivitySpectraforSubstances). PASS позволяет анализировать с применением наивного Байесовского подхода массивы химических соединений с известными данными по биологической активности и выявлять соответствующие взаимосвязи «структура-активность», которые в дальнейшем используются для поиска новых соединений с требуемыми свойствами. Для обучения PASS, из базы данных ChEMBL 21-ой версии нами были извлечены данные о структуре и биологической активности соединений, протестированных в отношении протеинкиназ. Структуры 71733 химических соединений были повергнуты фильтрации, в ходе которой были отсеяны молекулы, не отвечающие критериям построения достаточно точных и обладающих предсказательной способностью (Q)SAR моделей. После фильтрации в выборке остались данные о 69454 химических соединениях, которые были использованы для обучения PASS. В результате была получена программа, позволяющая рассчитывать компьютерные оценки проявления химическими соединениями ингибирующей активности в отношении более трехсот протеинкиназ со средней точностью более 0,85 (скользящий контроль с исключением по одному).

На основе полученных результатов нами разработан веб-сервис KinScreen, который свободно доступен в сети Интернет (www.way2drug.com/kinscreen). Разработанная программа была использована нами для поиска ингибиторов киназы Nek6, которые рассматриваются в качестве потенциальных средств терапии пролиферативных заболеваний.

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-01243.

KINSCREEN: WEB-SERVICE FOR THE IN SILICO SEARCH OF NOVEL KINASE INHIBITORS AND OPTIMIZATION OF EXPERIMENTAL STUDIES ON THEIR ACTIVITIES

P.Pogodin, A.Lagunin, V.Dubovskaya, D.Druzhilovskiy, A.Rudik, D.Filimonov, V.Poroikov

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Russia, 119121, Moscow, Pogodinskaya, 10

We have developed a new web-service, KinScreen, which allows researchers to assess the probabilities for organic compounds to inhibit more than three hundreds of protein kinases using structural formulae of drug-like compounds. The web-service can be used for the in silico search of selective potential kinase inhibitors and optimization of their further experimental testing.

Key words: protein kinases; kinase inhibitors; chemoinformatics; web-service; (Q)SAR; computer assessment of chemical compounds activity.

Protein kinases contribute to the regulation of almost all aspects of cell function. Pathological kinase activity is often associated with the cell switching from normal to pathological state and disease manifestation at the organismal level. Thus, kinases are of particular interest as therapeutic targets, and more than ten kinase inhibitors were approved for the usage in clinical practice in the last four years. The primary difficulty associated with the discovery of novel kinase inhibitors is their selectivity. Thus, to find the chemical entity with the appropriate balance between safety and efficacy, it is necessary to study the activity of compounds against as many kinases as possible in the early stage of development. KinScreen is aimed to optimize this process. Our web-service is based on PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) software. PASS was developed to analyze sets of chemical compounds with associated biological activities using naïve Bayes approach and elucidate «structure-activity» relationships for discovery of new compounds with desired activity or activities. The data on chemical structures and activities of compounds which were tested against kinases according to the ChEMBL database (21-st version) were used for PASS training. We provided extensive filtration for the extracted data to eliminate inaccurate or ambiguous molecular representations and unreliable activity data in accordance with practices adopted for building reliable and predictive (Q)SAR models. Initially, we extracted 71 733 chemicals, only 69 454 of them were used for training. As a result, the SAR models were prepared and became able to provide users with the computer assessment of inhibitory activity for chemical compounds against more than 300 of protein kinases. The quality of prediction was assessed as ROC AUC calculated using leave-one-out cross-validation, and it exceeded 0.85.

Results of our work are represented as freely available web-service KinScreen (www.way2drug.com/kinscreen). Our software was used to search for novel inhibitors of the Nek6 kinase, which may be useful in therapy of proliferative diseases.

Grant: This research is supported by the RFBR grant № 16-34-01243.

УДК: 615.07, 615.28, 615.31, 615.32, 615.45, ББК: 52.81, 52.82

РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИОННОЙ МАЗИ, СОДЕРЖАЩЕЙ АЦИКЛОВИР И ЭКСТРАКТ ТРАВЫ ЗВЕРОБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО

М.И.Поддубная[1], В.А.Вайнштейн[2], В.А.Кузнецов[3]

[1]Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, Россия, 192019, Санкт-Петербург, Бехтерева, 1, m_tsygankova84@mail.ru, +7(921)570-29-76
[2]Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Россия, 197022, Санкт-Петербург, Профессора Попова, 14
[3]Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, Россия, 188663, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, -, корп. 93, kuznetsov_va@front.ru, 8(812) 606-62-83 (доб. 373)

Разработан состав и выбрана оптимальная технология получения композиционной мази, содержащей экстракт травы зверобоя продырявленного, обогащенный целевыми биологически активными веществами (БАВ) (флавоноидами, антраценпроизводными), и ацикловир. Полученная мазь обладает хорошими потребительскими и технологическими свойствами.

Ключевые слова: экстракция, зверобой продырявленный, флавоноиды, антраценпроизводные, гиперицин, псевдогиперицин, ацикловир, вирус герпеса

Герпесвирусная инфекция (ГИ) – одна из наиболее распространенных и плохо контролируемых инфекций человека. «Золотым стандартом» лечения ГИ среди синтетических лекарственных веществ (ЛВ) является ацикловир, однако, как и все синтетические монопрепараты, он имеет ряд недостатков: не активирует собственные защитные силы организма, к нему развивается резистентность вирусного возбудителя, в лечебных дозах может быть токсичным.

В нетоксичных дозах экстракт зверобоя, содержащий антраценпроизводные (гиперицин и псевдогиперицин), ингибирует репликацию вируса простого герпеса (Herpes Simplex), а сопутствующий нативный комплекс БАВ зверобоя обладает иммуномодулирующей, гепатопротекторной, антиоксидантной

и другими видами биологической активности.[1] Механизм антивирусного и антимикробного действия фитопрепаратов, содержащих экстракты зверобоя, отличается от механизма действия синтетических субстанций (ацикловира). Сочетание синтетического ЛВ и фитопрепарата в одной ГЛФ может обеспечить синергизм в отношении подавления ГИ, активировать иммунную систему больного, компенсировать негативные эффекты медикаментозного лечения и достичь терапевтического эффекта при более низких концентрациях токсичного ЛВ (ацикловира). В арсенале современной медицины практически отсутствуют лекарственные средства, содержащие в одной ГЛФ ЛВ растительного и синтетического происхождения. Известные экстракты зверобоя (сухой, масляный, водно-спиртовой) не содержат полного комплекса БАВ (флавоноиды, антраценпроизводные, хлорофиллы и др.) и малопригодны для введения в составы готовых лекарственных форм (ГЛФ).

Разработан способ получения полиэкстракта травы зверобоя в компонентах мазевых основ (ПЭЗМ). ПЭЗМ получали полиэкстракцией травы зверобоя продырявленного рядом органических растворителей с возрастающей полярностью (ацетон-этанол-водные растворы этанола) с последующим переводом экстрактивных веществ в компоненты мазевых основ. Полученный экстракт содержит нативный комплекс БАВ зверобоя, обогащенный антраценпроизводными. БАВ в ПЭЗМ присутствуют в растворенном и/или высокодисперсном состоянии.[2] Разработан состав амфотерной мазевой основы, способной включать в себя не только гидрофильные и гидрофобные БАВ, но и поглощать экссудат из герпетических везикул. Разработан способ введения субстанции ацикловира в ГЛФ в виде суспензии в диметилсульфоксиде, что позволяет получить мазь однородной консистенции с высокодисперсным и равномерно распределенным в ней действующим веществом. Разработана оптимальная технология приготовления и изучены технологические и потребительские свойства композиционной мази.

Литература.
1. Meruelo D., Lavie G., Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988.Vol. 85. P. 5230-5234. 2. Цыганкова М. И., Вайнштейн В. А., Теслев А. А. Получение экстракта травы зверобоя продырявленного в компонентах мазевых основ // Фармация. – 2013. – № 8. – С. 30– 32. 3. Демина Н. Б. Биофармация – путь к созданию инновационных лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 1. – С. 8-13. 4. Черныш С. И. Новое в лечении герпесвирусных и папилломавирусных инфекций: терапевтические свойства Алломедина // TERRA MEDICA. – 2005. – № 4 – С. 31-34. 5. Шульженко А. Е. Человек и герпес. Настоящее и будущее. // Физиология и патология иммунной системы. – 2004. – № 2. – С. 45-61. 6. Железникова Г. Ф. Резистентность к возбудителю инфекции и иммунный ответ // Журн. микробиол. – 2005. – № 2. – С. 104-112. 7. Исаков В. А., Рыбалкин С. Б., Романцов М. Г. Герпесвирусная инфекция: рекомендации для врачей. – СПб., 2006. – 96 с. 8. Miskovsky P. Hypericin - a new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological macromolecules // Current Drug Targets. – 2002. – № 3. – P. 55-84. 9. Lavie. G. Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. // Proc. Natl. Acad. Sci.1989. – № 86. – P. 5963-5967. 10. Tang J. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses Antiviral Research. – 1990. – № 13. – P. 313-326. 11. Wood. S. Antiviral activity of naturally occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives // Planta Med. – 1990. – № 56. – P.651-652. 12. Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. St. John's wort (Hypericum perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties // Pharmacy and Pharmacology. – 2001. –№ 53. – С. 583-600 13. Баринский И. Ф. Герпесвирусные инфекции — иммунодефицитные заболевания XXI века // Аллергол. и иммунол. – 2004. – Т.5., № 1. – С. 202-204. 14. Халдин А. А., Баскакова Д. В. Эпидемиологические аспекты заболеваний, вызываемых вирусом простого герпеса (обзор литературы) // Consil. med. – 2007. – С. 27-30. 15. Редькин Ю. В., Одокиенко А. Ю. Биологические особенности вируса простого герпеса и возможности фармакотерапии // Успехи современ. биол. –2006. – Т. 126., № 1. – С.87-96. 16. Самгин М. А. Простой герпес (Дерматологические аспекты) – М.: МЕДэкспресс-информ. – 2002. – 160 с. 17. Исаков В. А., Исаков Д. В. Современные средства и перспективы терапии герпесвирусных инфекций //TERRA MEDICA. – 2001. – №2. – С. 18-23. 18. Шульженко А. Е. Герпетические инфекции человека. Перспективы диагностики и противовирусной терапии // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т.4, № 3. – С. 76-81. 19. Schaffer H. J. Acyclovir chemistry and spectrum of activity. // The Am. J. of Med. – 1983. – №Ia. – P. 4-6. 20. Кудашкина Н. В. Лекарственная форма из травы зверобоя для применения в гинекологии // Фармация. – 2004. – № 3. – С.36.37. 21. Файзуллина Р. Р. Фитохимическое изучение зверобоя продырявленного (Hypericum perforatum L.) флоры Башкортостана и перспективы создания на его основе новых лекарственных средств: автореф. дис. канд. фарм. наук. – Пермь, 2005. – 24 с. 22. Queen S. The Clinical use of Hypericum perforatum // American Journal of Natural Medicine. – 1995. – № 3. – P.24-29. 23. Багирова В. Л., Демина Н. Б., Кулинченко Н. А. Мази. Современный взгляд на лекарственную форму // Фармация. – 2002. – № 2. – С.24-26. 24. Перцев И. М., Котенко А. М., Чуешов О. В., Халеева Е.Л. Фармацевтические и биологические аспекты мазей. – Харьков: Изд-во НФаУ «Золотые страницы», 2003. – 288 с. 25. Тенцова А. И., Грецкий В. М. Современные аспекты исследования и производства мазей. – М.: Медицина, 1980. – 192 с. 26. Тенцова А. И., Ажгихин И. С. Лекарственная форма и терапевтическая

эффективность лекарств: Введение в биофармацию. – М.: Медицина, 1974. – 336 с. 27. Багирова В. Л., Демина Н. Б., Девяткина И. А., Тенцова И. А. и др. Современные аспекты использования вспомогательных веществ в технологии лекарственных препаратов // Фарматека. – 1998. – №6. – С.34-36. 28. Семкина О. А., Джавахян М. А., Левчук Т. А., Гагулашвили Л. И., Охотникова В. Ф. Вспомогательные вещества, используемые с технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов) //Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – №9. – С.45-48. 29. Комилов Х. М., Назирова Я. К., Махмуджанова К. С. Получение гидрофобных основ из различных жиров и масел для мягких лекарственных форм // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – №10. – С. 50-51. 30. Деримедведь Л. В., Перцев И. М., Загорий Г. В., Гуторов С. А. Рациональное применение мазей // Провизор. – 2002. – №1. – С.31-35. 31. Сёмкина О. А. Мази, гели, линименты и кремы, содержащие фитопрепараты (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – №7. – С.30-36. 32. Царахова Л. Н. Разработка состава и фармакотехнологические исследования парафармацевтических гелей на базе экстрактов из травы зверобоя продырявленного: автореф. дис. канд. фарм. наук – Курск, 2007. 33. Царахова Л. Н. Разработка состава, технологии производства и фармакологические исследования гелей, содержащих извлечения из травы зверобоя продырявленного // Материалы международной научно-практической конференции. Фармацевтические технологии (Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия). – СПб.: СПХФА, 2008. – С.139-142. 34. Чиркова М. А., Турышев А.Ю. и др. Технология мягких лекарственных препаратов из травы зверобоя // Актуальные проблемы науки фармацевтических и медицинских вузов: от разработки до коммерциализации: мат. науч.-практ. конф. с междунар. уч., поев. 75-летию Пермской гос. фарм. академии (7-9 декабря 2011 года). – Пермь, 2011. – С. 275-277. 35. Хаззаа И. Х. Экстракция травы зверобоя и сушеницы двухфазными системами растворителей с применением ПАВ: автореф. дис. канд. фарм. наук. – СПб., 2004. – 23 с. 36. Куркин В. А., Правдивцева О. Е. Сравнительное исследование содержания суммы флавоноидов и антраценпроизводных в препаратах травы зверобоя // Хим. - фарм. журнал. – 2008. – № 10. – С. 39-42. 37. Зимина Л. Н. Фармакогностическое исследование по обоснованию создания антидепрессантных препаратов на основе травы зверобоя: автореф. дис. канд. фарм. наук. – Самара, 2011. 38. Зимина Л. Н., Куркин В. А. Нейротропная активность настоек двух видов зверобоя // Фармация. – 2011. – № 5. – С. 43-45. 39. Вайнштейн В. А., Каухова И. Е. .Двухфазная экстракция в получении лекарственных и косметических средств. – СПб.: Проспект Науки, 2010. – 104 с. 40. Каухова И. Е. Теоретические и экспериментальные основы разработки эффективных ресурсосберегающих технологий лекарственных средств растительного происхождения : дис.... докт. фарм. наук. – СПб., 2007. – 390 с. 41. Иванов Е. В. Экстрагирование из волокнистых пористых материалов: дис.. докт. техн. наук. – СПб, 2009. – 302 с. 42. Артёмова М. А., Иванов Е. В., Маслов А. А. Экстрагирование производных хлорофилла из травы зверобоя двухфазной системой экстрагентов в пульсационном аппарате // Подготовка кадров для фармацевтической промышленности. Сб. науч. трудов юбил. конф., поев.60-летию ф-тета Промышленной технологии лекарств. (Санкт-Петербург, 9 декабря 2005 г.) – СПб., 2005. – С. 174-176. 43. Шиков А. Н. Разработка новых технологий масляных экстрактов и методологии создания препаратов на их основе: автореф. дис. .. докт. фарм. наук. – СПб., 2006. – 45 с. 44. Иванов Е. В., Бабенко Ю. И. Элементарная модель экстрагирования из пористых частиц под действием импульсов давления на их поверхности //Журнал прикл. химии. – 2005. – Т. 78, № 9. – С. 1487-1492. 45. Сычев Р. Л., Пунегов В. В. Интенсификация экстракции псевдогиперицина и гиперицина из травы Hypericum perforatum L. в СВЧ поле // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы III Всероссийской конференции в 3 кн. (23-27 апреля 2007 г.). – Барнаул, 2007. – Кн. 2. – С. 92-96. 46. Иванов Е. В., Артемова М. А., Маслов А. А. Экстрагирование сырья двухфазной системой экстрагентов в аппарате вакуумного осциллирующего кипения // Журнал прикл. химии. – 2007. – Т. 80, № 7. – С. 1127-1130. 47. Хазиев Р. Ш., Тынчерова А.А. Экстрагируемость флавоноидов травы зверобоя в настои // Фармация. – 2006. –№ 6. – С.32-34. 48. Григорович Н. А., Дорофтиенко С. Ф., Григорович Т. М. Клиническое применение препарата димексид // Медицинские новости. – 2009. – № 16. – С. 53-55. 49. Гаврилин М. В., Сеньчукова Г. В., Компанцева Е. В. Методы получения и анализа диметилсульфоксида (обзор) // Хим. - фарм. журнал. – 2000. – №9. – С.35-39. 50. Кукушкин Ю.Н. Диметилсульфоксид - важнейший апротонный растворитель // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 9. – С. 54-59. 51. Илларионова Е. А., Сыроватский И. И., Федотов С. В. Новый вариант спектрофотометрического определения ацикловира // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 3. – С. 44-46. 52. Маковецкая Е. Ю. Изучение связанных полифенолов травы зверобоя // Хим. - фарм. журнал. – 2000. – № 2. – С.55. 53. Емшанова С. В., Садчикова Н. П., Зуев А.П. О контроле размера и формы частиц лекарственных веществ // Хим. - фарм. журнал. – 2007. – № 1. – С.41- 49. 54. Моисеев Д. В., Марченко С. И., Моисеева А. М. и др.Использование метода ВЭЖХ в биофармацевтических исследованиях лекарственных веществ, производных пиримидина (обзор) // Хим.-фарм. журнал. – 2007. – № 1. – С.26-34. 55. Петров П. Т., Трухачева Т. В., Моисеев Д. В. и др. Определение пуриновых оснований с противогерпетической активностью методом ВЭЖХ (обзор) // Хим. - фарм. журнал. – 2004. – № 7. – С.44-53. 56. Мустафин Р. А., Насыбуллина Н. М., Поцелуева Л. А. Исследование реологических свойств лекарственных форм мелоксикама для наружного применения // Успехи современного естествознания. - 2010. - № 1. - С. 11-14. 57. Мичник О. В., Степанова Э.Ф, Еладышев В.В. Исследование реологических свойств мазей, содержащих различные фитокомплексы // Хим.-фарм. журнал. – 1993. – № 6. – С.21-24

COMPOSITION AND TECHNOLOGY DESIGN OF ANTIGERPETIC COMPOSITE OINTNENT WITH ACICLOVIR AND HYPERICUM PERFORATUM HERB EXTRACT

M.Poddubnaia[1], V.Vainshtein[2], V.Kuznetsov[3]

[1]Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology» of the Federal Medical and Biological Agency, Russia, 192019, Saint-Petersburg, Bekhtereva, 1
[2]Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Russia, 197022, Saint-Petersburg, Prof. Popov, 14
[3]Federal State Unitary Enterprise «Scientific-Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology» of the Federal Medical and Biological Agency, Russia, 188663, Leningrad Region, Vsevolozhsk district, township Kuzmolovsky, -, bild. 93

Composition and the best technology of production composite ointment with acyclovir and Hipericum perforatum herb extract, contained the aim biologically active substances (BAS) (flavonoids, anthracene derivatives), were designed. Produced ointment has good consumer and technological properties.

Key words: extraction, Hipericum perforatum (St. John's wort), flavonoids, anthracene derivatives, hypericin, pseudohypericin, acyclovir, Herpes Simplex Virus Infections

Herpes Simplex Virus Infections (HSVI) – one of the most common and badly controlled human infections. «The gold standard» treatment of HSVI among synthetic drug substances (DS) is acyclovir, but it have several disadvantages: do not activate own body defenses; the viral pathogen resistance to acyclovir is developing; therapeutic doses of acyclovir may be toxic.

The non-toxic doses of Hypericum perforatum extract containing anthracene derivatives (hypericin and pseudohypericin) inhibits the replication of Herpes Simplex virus. The native BAS complex has immunomodulatory, antioxidant, hepatoprotective, and other types of biological activity. [1] The antiviral and the antimicrobial action mechanism of herbal drug with Hypericum perforatum extract tend to be different from the synthetic substances (acyclovir) action mechanism. Synthetic DS and herbal drug combination in one dosage form can provide synergies in relation to suppression of HI, activate the immune system of patient, compensate the negative effects of treatment and achieve therapeutic effect at lower concentrations of toxic DS (acyclovir). There are no drugs containing synthetic DS and herbal drug combination in one dosage form in arsenal of modern medicine. There are technologies of dry, hydroalcoholic and oil Hypericum perforatum herb extracts, but they do not allow to incorporate native BAS complex (flavonoids, anthracene derivatives, chlorophylls, etc.) and are little use for administration in compositions of dosage forms (DF).

Method of production of Hypericum perforatum herb polyextract in components of ointment bases (PHOB) was designed. PHOB was obtained by dry St. John's wort herb extraction by solvents with increasing polarity (acetone, aqueous solutions of different concentrations of ethanol), then transferred extractive substances in components ointment bases. The extract contains native complex of BAS of Hypericum perforatum, enriched anthracene derivatives. BAS in the PHOB are dissolved and/or have a highly dispersed state.[2] The composition of amphoteric ointment base capable not only include hydrophilic and hydrophobic BAS, but also to absorb the exudate from herpetic vesicoles was designed. The method of acyclovir adding in the dosage form was designed. Dimethyl sulfoxide suspension of acyclovir was made. It allows to obtain an ointment of uniform consistency with a highly dispersed and uniformly distributed active ingredient in it. The optimum technology of preparation was designed and technological and consumer properties of composite ointment were studied.

References:
1. Meruelo D., Lavie G., Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988.Vol. 85. P. 5230-5234. 2. Tsygankova M. I., Vainshtein V. A., Teslev A. A. Production of Hypericum perforatum herb polyextract in components of ointment and suppository bases // Pharmacy. – 2013. – № 8. – P. 30– 32. 3. Demina N. B. Biopharmacy - way for the creation of innovative medicines // Development and registration of medicinal products. – 2013. – № 1. – P. 8-13. 4. Chernish S. I. New in the treatment of herpes and human papillomavirus infection: therapeutic properties of Allomedin // TERRA MEDICA. – 2005. – № 4 – P. 31-34. 5. Shulzhenko A. E. Man and herpes. The present and the future. // Physiology and pathology of the immune system. – 2004. – № 2. – P. 45-61. 6. Zheleznikova G. F. The resistance to the infection pathogen and immune response // Journal of microbiology. – 2005. – № 2. – P. 104-112. 7. Isakov V. A., Ribalkin S. B., Romantsov M. G. Herpes virus infection: recommendations for doctors. – SPb., 2006. – 96 p. 8. Miskovsky P. Hypericin - a new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological

macromolecules // Current Drug Targets. – 2002. – № 3. – P.55-84. 9. Lavie. G. Studies of the mechanisms of action of the antiretroviral agents hypericin and pseudohypericin. // Proc. Natl. Acad. Sci.1989. – № 86. – P.5963-5967. 10. Tang J. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses Antiviral Research. – 1990. – № 13. – P.313-326. 11. Wood. S. Antiviral activity of naturally occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives // Planta Med. – 1990. – № 56. – P.651-652. 12. Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D. St. John's wort (Hypericum perforatum L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties // Pharmacy and Pharmacology. – 2001. –№ 53. – C. 583-600 13. Barinsky I. F. Herpesvirus infection - immunodeficiency diseases of the XXI century // Allergy and Immunology. – 2004. – B.5., № 1. – P. 202-204. 14. Khaldin A. A., Baskakov D. V. Epidemiological aspects of diseases caused by the herpes simplex virus (review) // Consil. med. – 2007. – P. 27-30. 15. Red'kin U. V., Odokienko A. U. Biological features of the herpes simplex virus and the possibility of pharmacotherapy // Modern biology successes. –2006. – B. 126., № 1. – P.87-96. 16. Samgin M. A. Herpes simplex (Dermatological aspects) – M.: MEDexpress-Inform. – 2002. – 160 p. 17. Isakov V. A., Isakov D. V. Modern medicines and perspectives of herpesvirus infections treatment // TERRA MEDICA. – 2001. – № 2. – P. 18-23. 18. Shulzhenko A. E. Man herpetic infections. Diagnostics and antiviral therapy perspectives // Cytokines and inflammation. – 2005. – B.4, № 3. – P. 76-81. 19. Schaffer H. J. Acyclovir chemistry and spectrum of activity. // The Am. J. of Med. – 1983. – № la. – P. 4-6. 20. Kudashkina N. V. St. John's wort herb dosage form for applications in gynecology // Pharmacy. – 2004. – № 3. – P. 36.37. 21. Fayzullina R. R. Phytochemical study of Hypericum perforatum (Hypericum perforatum L.) of flora of Bashkortostan and prospects for new medicines creation on its basis: avtoref. disser-. cand. Pharm. sciences. – Permian, 2005. – 24 p. 22. Queen S. The Clinical use of Hypericum perforatum // American Journal of Natural Medicine. – 1995. – № 3. – P.24-29. 23. Bagirova V. L., Demina N. B., Kulinchenko N. A. Ointments. The modern view of the dosage form // Pharmacy. – 2002. – № 2. – P.24-26. 24. Pertsev I. M., Kotenko A. M., Chueshov O. V., Khaleeva E. L. Pharmaceutical and biological ointments aspects. – Kharkov: Publishing house NFaU «Golden Pages», 2003. – 288 p. 25. Tentsova A. I., Gretzky V. M. Modern aspects of ointments research and production. – M.: Medicine, 1980. – 192 p. 26. Tentsova A. I., Azhgikhin I. S. The medicines dosage form and therapeutic efficacy: Introduction to biopharmacy. – M.: Medicine, 1974. – 336 p. 27. Bagirova V. L., Demina N. B., Devyatkina I. A., Tentsova A. I. et al. Modern aspects of excipients use in drug technology // Farmateka. – 1998. – № 6. – P. 34-36. 28. Semkina O. A., Javakhyan M. A., Levchuk T. A., Gagulashvili L. I., Okhotnikova V. F. Excipients used in dosage forms soft technology (ointments, gels, liniments, creams) // Chemical-Pharmaceutical Journal. – 2005. – № 9. – P.45-48. 29. Komilov H. M., Nazirova Ya. K., Mahmudzhanova K. S. Production hydrophobic bases of various fats and oils to soft dosage forms // Chemical-Pharmaceutical Journal. – 2009. – №10. – P. 50-51. 30. Derimedved L. V., Pertsev I. M., Zagoriy G. V., Gutorov S. A. Rational ointments application // Pharmacist. – 2002. – № 1. – P. 31-35. 31. Semkina O. A. Ointments, gels, liniments and creams containing herbal medicines (review) // Chemical-Pharmaceutical Journal. – 2005. – № 7. – P. 30-36. 32. Tsarahova L. N. Development of composition and research farmakotechnological parapharmaceutical gels on the basis of Hypericum perforatum herb extracts of the: avtoref. dis. cand. pharm. sciences. – Kursk, 2007. 33. Tsarahova L. N. Development of composition, technology of production and pharmacological studies gels containing Hypericum perforatum herb extract // Materials of the international scientific-practical conference. Pharmaceutical technology (Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy). – SPb., 2008. – P. 139-142. 34. Chirkova M. A., Turishev A. U. et al. Hypericum herb soft dosage forms technology // Actual problems of science, pharmaceutical and medical universities: from development to commercialization: materials of scientific-practical. conference with international participation on the occasion of 75 birthday Perm State Pharmaceutical Academy (7-9 December 2011). – Permian, 2011. – P. 275-277. 35. Hazzaa I. H. Hypericum herb and cudweed extraction biphasic solvent systems with the use of surfactants: avtoref. dis. cand. pharm. sciences. – SPb., 2004. – 23 p. 36. Kurkin V. A., Pravdivtseva O. E. Comparative research of the content and amount of flavonoids and antratsenderivatives in Hypericum herb drugs // Chemical-Pharmaceutical Journal. – 2008. – № 10. – P. 39-42. 37. Zimina L. N. Farmakognostic research on the justification of the creation of anti-depressant Hypericum herb drugs: avtoref. dis. cand. pharm. sciences. – Samara, 2011. 38. Zimina L. N., Kurkin V. A. Neurotrophic activity of two types Hypericum tincture // Pharmacy. – 2011. – № 5. – P. 43-45. 39. Vainshtein V. A., Kauhova I. E. . The two-phase extraction in medicines and cosmetics preparation. – SPb.: Prospect of Science, 2010. – 104 p. 40. Kauhova I. E. Theoretical and experimental basis for the development of herbal medicines effective resource-saving technologies: diss…. dr. pharm. sciences. – SPb., 2007. – 390 p. 41. Ivanov E. V. Fibrous porous materials extraction: diss…. dr. techn. sciences. – SPb, 2009. – 302 p. 42. Artemova M. A., Ivanov E. V., Maslov A. A. Chlorophyll derivatives extraction from the Hypericum herb with two-phase extragents system in the pulsation machine // Personnel training for the Pharmaceutical Industry. Collection of scientific works of the jubilee conference in dedicated to the 60th birthday of the Faculty of Industrial Drug Technology. (St. Petersburg, December 9, 2005) – SPb., 2005. – P. 174-176. 43. Shikov A. N. New oil extracts technology and methodology to creating drugs based on them development: avtoref. dis. dr. pharm. sciences. – СПб., 2006. – 45 c. 44. Ivanov E. V., Babenko U. I. Extracting elementary model from porous particles under the effect pressure pulses on their surface // Applied Chemistry Journal. – 2005. – B. 78, № 9. – P. 1487-1492. 45. Sychev R. L., Punegov V. V. Pseudohypericin and hypericin extraction intensification in the microwave field from Hypericum perforatum L. herb // New advances in chemistry and chemical technology of plant raw materials: Materials of III All-Russian Conference in 3 books. (23-27 April 2007). – Barnaul, 2007. – B. 2. – P. 92-96. 46. Ivanov E. V., Artemova M. A., Maslov A. A. Raw materials extraction in a two-phase system of extragents at the machine oscillating vacuum boiling // Applied Chemistry Journal. – 2007. – B. 80, № 7. – P. 1127-1130. 47. Khaziev R. Sh., Tyncherova A. A. Flavonoids extractability in the Hypericum herb extracts // Pharmacy. – 2006. –№ 6. – P. 32-34. 48. Grigorovich N. A., Doroftienko S. F., Grigorovich T. M. Dimexide clinical use // Medical news. – 2009. – № 16. – P. 53-55. 49. Gavrilin M. V., Senchukova G. V., Kompantseva E. V. Preparation and analysis methods of

dimethylsulfoxide (review) // Chemical-Pharmaceutical Journal. – 2000. – №9. – P.35-39. 50. Kukushkin U. N. Dimethylsulfoxide - the most important aprotic solvent // Soros Educational Journal. – 1997. – № 9. – P. 54-59. 51. Illarionova E. A., Syrovatsky I. I., Fedotov S. V. The new version of the spectrophotometric determination of acyclovir // Siberian Medical Journal. – 2011. – № 3. – P. 44-46. 52. Makovetska E. U. Hypericum herb constrained polyphenols research // Chemical-Pharmaceutical Journal. – 2000. – № 2. – P. 55. 53. Emshanova S. V., Sadchikova N. P., Zuev A. P. Size and shape drugs particles control about // Chemical-Pharmaceutical Journal. – 2007. – № 1. – P. 41- 49. 54. Moiseev D. V., Marchenko S. I., Moiseeva A. M. et al. HPLC method in biopharmaceutical research pyrimidine derivatives drugs using (review)// Chemical-Pharmaceutical Journal. – 2007. – № 1. – P. 26-34. 55. Petrov P. T., Trukhacheva T. V., Moiseev D. V. et al. Purine bases with antiherpetic activity determination by HPLC (review) // Chemical-Pharmaceutical Journal. – 2004. – № 7. – P. 44-53. 56. Mustafin R. A., Nasybullina N. M., Potselueva L. A. Study of the rheological properties of meloxicam formulations for skin use // The success of modern science. - 2010. - № 1. - P. 11-14. 57. Michnik O. V., Stepanova E. F, Eladyshev V.V. Study of the rheological properties of ointments containing different phytocomplex // Chemical-Pharmaceutical Journal. – 1993. – № 6. – P. 21-24

УДК: 579.62, ББК: 28.428.4

РАЗРАБОТКА НОВОГО ГОМОПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА, ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ СВИНОВОДСТВА

Н.В.Позолотина[1], И.В.Дармов [2], И.В.Маракулин[2]

[1]ФГБОУ ВО ВятГУ, Россия, 610025, Киров, Мостовицкая, 5а, biologiavgu@yandex.ru, 89513523157
[2]ФГБОУ ВО ВятГУ, Россия, 610000, Киров, Московская, 36, biologiavgu@yandex.ru, 89513523157

От здоровых поросят-отъемышей выделен гомопробиотический штамм Lactobacillus paracasei B-11821. На его основе разработаны три формы пробиотического препарата (жидкая, сухая и фугатная). Усовершенствована технология биопрепарата за счет сокращения этапа приготовления посевных культур. В научно-производственном опыте показано влияние препарата на кишечную микрофлору, сохранность поголовья, среднесуточные привесы и прирост живой массы поросят-отъемышей.

Ключевые слова: гомопробиотик, лактобациллы, среднесуточные привесы, поросята-отъемыши

Одной из актуальных задач в отечественной биотехнологии является разработка новых экологически безопасных эффективных препаратов, способствующих нормальному развитию животных и получению качественной продукции. В настоящее время практически не реализованы преимущества биопрепаратов на основе гомопробиотических штаммов лактобацилл, выделенных из организма того же вида животных, в отношении которых предполагается использование пробиотиков на их основе. Гомопробиотические бактерии наиболее приспособлены к условиям желудочно-кишечного тракта животного по спектру вырабатываемых ферментов и структуре адгезивных рецепторов. Это обеспечивает высокий процент их выживаемости, в результате чего нормализуются физиологические процессы пищеварения и усвоения питательных веществ корма. В связи с этим целью данной работы является выделение гомопробиотического штамма лактобацилл и разработка на его основе ветеринарного биопрепарата для свиноводства.

Для достижения поставленной цели из кишечного содержимого здоровых поросят-отъемышей был выделен гомопробиотический штамм LactobacillusparacaseiB-11821 (депонирован в ВКПМ ГосНИИГенетики). Данный штамм обладает высокой антагонистической активностью в отношении ряда энтеропатогенных бактерий (P. aeruginosa, P. vulgaris, P. mirabilis, S pullorum, S. odorifera), выделенных из кишечного содержимого отстающих в росте поросят-отъемышей; высокой адгезивной активностью в отношении эритроцитов свиньи ((50,8±3,4)%), обеспечивающей способность длительно персистировать в составе микробиоты кишечника [1].

На основе выделенного штамма разработаны три формы лабораторного образца пробиотического препарата: жидкая, сухая и фугатная. Жидкая форма представляет собой нативную культуру с концентрацией живых бактерий $(4,1\pm0,5)\cdot10^9$ КОЕ/мл и с добавление в качестве стабилизатора сахарозы [2], фугатная – супернатант нативной культуры (не более 10^3 КОЕ/мл), сухая – лиофильно высушенная биомасса бактерий ($(4,8\pm0,2)\cdot10^{10}$ КОЕ/г). Технология биопрепарата отличается относительной простотой за счет сокращения этапа приготовления посевной культуры, которая готовится заранее и может храниться в замороженном состоянии в течение 1 года

при стабильном сохранении биологических свойств. Благодаря такому упрощению технология может быть реализована непосредственно в лабораториях животноводческих хозяйств.

Эффективность полученных форм биопрепарата оценивали в рамках научно-производственного опыта на поросятах-отъемышах. При курсовом выпаивании поросятам отъемышам к концу пробиотикотерапии нормализуется видовой и количественный состав микрофлоры кишечника; в группах, получающих жидкую, «фугатную» и сухую формы биопрепаратов к 60 суткам опыта увеличиваются среднесуточные привесы (на 22,0% 15,1% и 4,4,% соответственно), прирост живой массы (на 18,0%, 12,5% и 6,3% соответственно) и сохранность поголовья (на 10,0%, 8,7% и 2,7% соответственно) по сравнению с животными контрольной группы.

Литература.
1. Дармов, И. В. Выделение и сравнительная характеристика штаммов лактобацилл – представителей нормальной кишечной микрофлоры поросят / И. В. Дармов, И. В. Маракулин, И. П. Погорельский, Н. В. Позолотина // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2015. – №2. – С.3-10. 2. Позолотина, Н.В. Технология приготовления жидкой формы ветеринарного пробиотического препарата на основе штамма Lactobacillus paracasei / Н. В. Позолотина, И. В. Дармов, И. В. Маракулин, И. П. Погорельский // Фундаментальные исследования. – 2015. – №2.ч 10. – С. 2164-2169.

DEVELOPING A NEW HOMOPROBIOIC FOR INCREASING SWINE REARING PRODUCTION

Pozolotina[1], I.Darmov [2], I.Marakulin [2]

1FSBEI of Higher Education VyatSU, Russia, 610025, Kirov, Mostovitckaya, 5a
2FSBEI of Higher Education VyatSU, Russia, 610000, Kirov, Moskovskaya, 36

From healthy weanling pigs the strain Lactobacillus paracasei B-11821 was extracted. On its basis three forms of a probiotic (liquid, dry, and centrate) were developed. The technology is improved by means of shortening the period of inoculum preparation. Research and production experience shows a positive influence of the product on gut microflora, on survivability of the livestock, as well as on the average daily gain and weight gain of weanling pigs.

Key words: homoprobiotic, lactobacilli, average dailty weight gain, weanling pigs

One of the most up-to-date tasks of domestic biotechnology is developing new ecologically safe preparations contributing to normal development of domestic animals and getting high quality production. Nowadays the strong points of biopreparations on the basis of homoprobiotic strains of lactobacilli extracted from organisms of the animal species subjected to using the probiotics in question has not yet been realised. Homoprobiotic bacteria are the most used to the conditions of the animal gastro-intestinal tract, as for the variety of enzymes and the adhesive receptors structure. This fact provides a high degree of survivability, as a result, physiological processes of digestion and nutrient intake improve. Thus the aim of this research consists in developing a lactobacilli homoprobiotic strain and working out a swine rearing veterinary biopreparation on its basis.

To achieve the aim a homoprobiotic strain Lactobacillus paracasei B-11821 (deposited in Russian Nationa Collection of Industrial Microorganisms of the State Research Institute of Genetics) was extracted from the intestinal content of healthy weanling pigs. This strain is highly antagonistic to a set of enteropathogenic bacteria (P. aeruginosa, P. vulgaris, P. mirabilis, S pullorum, S. odorifera) extracted from intestinal content of growth-retarded weanling pigs; it also is characterized by a high adhesive activity to pig erythrocytes ((50.8±3.4)%) which provides the ability to a long persistence in gut microbiota [1].

On the basis of the strain three laboratory sample forms of the probiotic were developed: liquid, dry, and centrate. Liquid form is a native culture with living bacteria concentration $(4.1\pm0.5)\cdot10^{9}$ CFU/ml with added saccharosa as a stabilizer [2], centrate form is a supernatant of the native culture (not more than 10^{3} CFU/ml), dry form is a cool dehumidified bacteria biomass ($(4.8\pm0.2)\cdot10^{10}$ CFU/g). Biopreparation technology is marked for relative simplicity caused by shortening the period of inoculum preparation which is to be prepared beforehand and can be stored frozen for a year preserving all its biological properties. Due to simplifying the technology can be used in laboratories of livestock farms.

Productivity of the biopreparation forms was estimated by means of a research-production testing of weanling pigs. At course bottle-feeding weanling pigs with the biopreparation by the end of the probiotic-therapy species and quantitative content of gut microflora improves; in groups getting the biopreparation in a liquid, centrate, or

dried form by the 60th day of the experiment average daily weight gain increases (by 22.0%, 15.1%, and 4.4% accordingly), weight gain (by 18.0%, 12.5%, and 6.3% accordingly), and livestock survivability (by 10.0%, 8.7%, and 2.7% accordingly) as compared with the animals in the control group.

References:
Literature 1. Darmov, I. V. Выделение и сравнительная характеристика штаммов лактобацилл – представителей нормальной кишечной микрофлоры поросят / I. V. Darmov, I. V. Marakulin, I. P. Pogorelskiy, N. V. Pozolotina // Aktualnye voprosy veterinarnoy biollogii. – 2015. – №2. – S.3-10. 2. Pozolotina, N.V. Technology of preparation of a liquid form of a veterinary probiotic on the basis of the strain Lactobacillus paracasei / N. V. Pozolotina, I. V. Darmov, I. V. Marakulin, I. P. Pogorelskiy // Fundaentalnye issledovaniya. – 2015. – №2. ch. 10. – S. 2164-2169.

УДК: 663.15, ББК: 30.16

СИНТЕЗ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОСТИ ГИДРОЛИЗАТОВ

А.С.Понкратов, Р.Т.Валеева

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Россия, 420061, Казань, космонавтов, 40, APonkratov24@gmail.com, +79178763150

Синтез технологической системы включает в себя инженерно-аппаратурное оформление и внедрение ресурсосберегающих технологий, позволяющих более эффективно использовать крахмалистое сырье на стадиях дрожжегенерации и брожения за счет использования дешевых сред на основе гидролизатов растительного сырья. Инженерно-аппаратурное оформление технологической системы включает: универсальную лабораторную установку для наработки больших объемов гидролизатов из лигноцеллюлозного сырья, орбитальный шейкер-инкубатор с функциями нагрева и охлаждения ISF1-X для исследования ростового процесса в качалочных колбах, установку измерения бродильной активности AFM-монитор спиртового брожения, позволяющую проводить шесть параллельных ферментаций при анаэробных условиях и точно сравнивать скорости химического превращения углерода и выхода продуктов реакции. Разработана методика оценки биологической доброкачественности гидролизатов на основе измерения бродильной активности сахаромицетов.

Ключевые слова: биохимическая переработка растительного сырья; кислотный гидролиз; ферментолиз; промышленная биотехнология; биотопливо; доброкачественность гидролизата

За последние годы в Российской Федерации произошла переориентация в использовании сырьевых ресурсов для биотехнологических производств с невозобновляемых источников (синтетические спирты и органические кислоты, полученные из нефти и газа) на возобновляемые сырьевые ресурсы. Сырье, применяемое для получения топлива из возобновляемого сырья, должно ежегодно воспроизводиться в количествах, достаточных для промышленной переработки, иметь высокое содержание перерабатываемых веществ, например, таких как целлюлоза, крахмал, сахара, а также хорошо сохраняться и быть относительно дешевым. Данные факторы будут обеспечивать экономическую целесообразность такого производства.

Физические и химические свойства сырья имеют большое значение при исследовании процессов гидролиза и в дальнейшем для получения качественного гидролизата. Такие физические параметры сырья, как структура, влагоемкость, влажность, определяют скорость, степень гидролиза и выход редуцирующих веществ. Для реализации процессов гидролиза с целью получения гидролизатов необходимо учитывать кинетику реакций гидролиза полисахаридного сырья, поскольку выход продуктов гидролиза зависит от соотношения скоростей их синтеза и распада, определяемых физико-химическими условиями (температура, давление, концентрации гидролизующих агентов, гидромодуль, интенсивность перемешивания и др.).

Практический интерес представляет создание кинетической модели гидролиза растительного сырья, так как полученные данные позволяют выбрать оптимальные режимы проведения процесса, спрогнозировать параметры гидролиза, способствующие более высокому выходу и качеству целевого продукта. Математическое моделирование дает возможность выявить основные закономерности процесса и описать кинетику во всем интервале изменений технологических параметров.

Следующей целью является синтез технологической системы для измерения доброкачественности

гидролизатов растительных отходов как вторичных материальных ресурсов для производства биоспиртов и разработка алгоритма оценки доброкачественности гидролизатов на основе измерения бродильной активности сахаромицетов.

Объект исследования представляет собой технологическую систему для оценки доброкачественности гидролизатов, которая включает следующее инженерно-аппаратурное оформление: универсальную лабораторную установку для наработки больших объемов гидролизатов из лигноцеллюлозного сырья [10], орбитальный шейкер-инкубатор с функциями нагрева и охлаждения ISF1-X (Climo-Shaker) для исследования ростового процесса в качалочных колбах [11], установку измерения бродильной активности AFM-монитор спиртового брожения, позволяющую проводить шесть параллельных ферментаций при анаэробных условиях и точно сравнивать скорости химического превращения углерода и выхода продуктов реакции.

На первом этапе в универсальной установке гидролиза (УГРС) происходит химический гидролиз лигноцеллюлозного сырья с выделением гидролизатов. На втором этапе реализуется культивирование в орбитальном шейкер-инкубаторе ISF1-X (Climo-Shaker) для исследования ростового процесса в качалочных колбах. Третий этап – сбраживание реализуется с помощью установки измерения бродильной активности AFM-монитора спиртового брожения, позволяющей проводить несколько параллельных ферментаций при анаэробных условиях и точно сравнивать скорости химического превращения углерода и выхода продуктов реакции.

Авторами проведен ряд экспериментальных исследований по получению гидролизатов из пшеничной соломы разными гидролизующими агентами, такими кислотами как: соляная, фосфорная, серная и сернистая. Концентрации РВ в полученных гидролизатах соломы обеспечивают рост биомассы сахаромицетов примерно до 18 кгАСД/м3.

Дальнейшая оценка биологической доброкачественности среды может быть оценена путем сравнения показателей процессов роста и брожения с показателями, полученными при использовании полноценных сред, например, среды Ридера и модифицированной среды Ридера.

Бродильная активность дрожжей может быть количественно охарактеризована величиной скорости продуцирования углекислого газа, поскольку показано, что стехиометрически продукция углекислого газа и этилового спирта связаны в соотношении 1 : 1.045.

Кроме того, с помощью тестового засева (культуры дрожжей, выращенной в воспроизводи-мых постоянных условиях), измерение бродильной активности позволяет контролировать качество сусла, а с помощью тестовой синтетической среды заданного состава – активность посевного материала.

Методика основана на сравнении удельных скоростей роста в тестовом и контрольном эксперименте. Если удельная скорость роста в тестовом эксперименте больше или равна удельной скорости роста в контрольном эксперименте, то гидролизат является доброкачественным. В противном случае, доброкачественность по отношению к сахаросодержащей среде (глюкозной или сахарозной) рассчитывается по формуле: DK = 100 μтест / μконтроль.

Литература.

1. Васильев Р.Г. Биотехнология как основа инновационной экономики // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2012. — Т. 8, № 1. — С. 63-67. 2. Римарева Л.В. Воронцова Н.Н. Микробиологический контроль спиртового и ферментного производств : монография М.: Россельхозакадемия, 2005. 200 с. 3. Скиба Е.А. Методика определения биологической доброкачественности гидролизатов из целлюлозосодержащего сырья с помощью штамма Saccharomyces cerevisiae ВКПМ Y-1693 // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. — 2016. —Т.16, № 1— С.34-44. 4. Нуртдинов Р.М. Эффективность процессов осахаривания соломы и оценка качества гидролизатов для культивирования сахаромицетов: Дис. …канд. техн. наук. — Казань, 2012. 5. Alcohol Fermentation Monitor. URL:http:// www.applikon-biotechnology.us (дата обращения: 20.12.2016) 6. Галеева А.А., Валеева Р.Т., Мухачев С.Г. Исследование кинетики и оптимизация условий проведения процессов гидролиза соломы соляной кислотой // Вестник Казанского технологического университета.— 2013. Т. 1, № 19.— С. 246. 7. Валеева Р.Т., Мухачев С.Г., Михайлова С.Ю. Высокотемпературный гидролиз пшеничной соломы фосфорной кислотой // Вестник Казанского технологического университета.— 2014.— Т. 17, № 10.— С. 101. 8. Валеева Р.Т., Шурбина М.Ю., Нуретдинова Э.И., Понкратов А.С., Красильникова О.В. Сравнительная оценка процессов роста спиртовых и кормовых дрожжей на сернокислотных и сернистокислотных гидролизатах растительного сырья // Вестник Казанского технологического университета.— 2015—. Т. 18,№ 21.— С. 152. 9. Мухачев С.Г., Мельников В.Н. Инструментальное определение бродильной активности // Тез. докл. Современные ресурсо- и энергосберегающие технологии в спиртовой и ликеро-водочной промышленности.— Казань. —2000.— С. 18.

THE SYNTHESIS OF TECHNOLOGICALCAL SYSTEM FOR ANALYSIS GOODNES OF HYDROLYZATES

A.Ponkratov, R.Valeeva

Kazan national research technological university, Russia, 420061, Kazan, Kosmonavtov, 40

A technological system synthesis includes engineering devices design and introduction of resource-conscious production technologies which allows serving more effectively starchy materials in the processes of yeasts growth and fermentation. This effectiveness is provided by the utilization of the cheaper culture medium basis of the plant raw materials hydrolysate. The engineering devices design consist of an universal hydrolysis reactor system for accumulation high volume of lignocellulosic biomass hydrolysate , stackable incubator shaker ISF1-X with functions of heating and cooling for research of growth process in the bulbs, unit for fermentation activity measuring AFM-display of ethanolic fermentation which provides six parallel fermentation processes under anaerobic conditions and allows precise comparing chemical reaction rates of carbon and the chemical yields.We created the methodic of the biological quality assessment of hydrolysate by measuring fermentation activity of the saccharomycetes.

Key words: biochemical processing of vegetable raw materials; acid hydrolysis; enzymatic hydrolysis;industrial biotechnology; biofuels; goodness of hydrolyzate

In recent years in Russia there was a reorientation the usage raw material resources in the biotechnology industry from nonrenewable feedstocks (synthetic alcohols and organic acids, which was obtained from oil fuel and gas) towards renewable feedstocks. This feedstock should have a high content of recycled materials such as cellulose, starch, sugars, and it should be well stored and be a relatively cheap.

The physical and chemical properties of the feedstock is of great importance for research the processes of hydrolysis and further for hydrolyzate producing. Such physical properties as structure, water capacity and humidity determine growth rate, degree of hydrolysis and the yield of reducing substances. It is necessary to regard kinetics of hydrolysis reactions of polysaccharides for realize the process of hydrolysis for achieving the goals of obtaining hydrolysate. It is because the yield of reducing substances depends on speed ratio of their synthesis and disintegration, which are based on the physical and chemical conditions (temperature, pressure, hydrolyzable agents concentrations, duty of water, stirring intensity, etc.).

The practical interest in modelling of kinetics of plant raw material hydrolysis because the received data allow to choose the process optimal modes, predict the characteristics of the hydrolysis, which contributing higher yield and better quality of the target product. The simulation analysis gives the possibility to identify the main regularities and describe kinetics in all range of changes of technological parameters.

The following goals are the technological system synthesis of quality assessment of the raw plant materials hydrolysates as recycled feedstocks for producing bioalcohol; create the methodic of the biological quality assessment of hydrolysate by measuring fermentation activity of the saccharomycetes.

The subject of research is the technological system synthesis of quality assessment of the hydrolysates.

The system includes the engineering devices design which consist of an universal laboratory unit for accumulation high volume of lignocellulosic biomass hydrolysate, Stackable incubator shaker ISF1-X with functions of heating and cooling for research growth process in the bulbs , unit for fermentation activity measuring AFM-display of ethanolic fermentation which provides six parallel fermentation processes under anaerobic conditions and allows precise comparing chemical reaction rates of carbon and the chemical yields.

At the first stage chemical hydrolysis of lignocellulosic feedstock with yielding of hydrolyzates takes place in the universal hydrolysis reactor system (UHRS). At the second stage bacterial cultivation realizes in the Stackable incubator shaker ISF 1-X (Climo-Shaker) for research of growth process in the bulbs. At the third stage the fermentation implements in the unit for fermentation activity measuring AFM-display of ethanolic fermentation which provides several parallel fermentation processes under anaerobic conditions and allows precise comparing chemical reaction rates of carbon and the chemical yields.

The authors undertook the experimental researches of the hydrolyzates obtaining from wheat straw by different hydrolyzable agents - hydrochloric acid, phosphoric acid, sulphuric acid and sulphurous acid. The concentration of the reducing substances in received hydrolizates of straw provides growth of saccharomycetes' biomass about 18 kg absolute dry yeast/ m3.

Next the biological quality assessment of medium may be evaluated by measuring growth rates characteristics and fermentation activity with the results of experiments with complete mediums as Ryder's medium or modified Ryder's medium.

The yeast' fermentation activity may be determined by the rate of CO2 yield, because as it was shown that yield of CO2 and ethanol's yield are stoichiometrically linked in the ratio of 1:1.045.

Also measuring of fermentation activity in the test seeding (yeast culture which was cultivated at reproducible constant environment) allows to control must's quality. Also we control growth activity of the seed material in the test synthetic medium with predetermined composition.

The method is based on comparing specific growth rates in test and control experiments. If the specific growth rate in the test experiment is above or equal to the specific growth rate in the check experiment then the hydrolysate has 100% purity. Otherwise the quality assessment of sacchariferous medium (glucose or sucrose) is calculated by the formula:DK = 100 μtest / μcheck

References:
1. Vasilov R.G. Biotechnology as a basis of innovative economy // Herald of biotechnology and physico-chemical biology a.n. Yu.A. Ovchinnikov. 2012. V. 8, № 1. P. 63-67. 2. Rimareva L.V. Voronzzova N.N. The microbiological control of alcohol and enzyme production: monograph M.: Rosselkhozakademia. 2005. 200 P. 3. Skiba E.A. DETERMINATION PROCEDURE FOR BIOLOGICAL GOODNESS OF HYDROLYZATES FROM CELLULOSIC BIOMASS USING SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y-1693 STRAIN // Izvestiya vysshikh uchednykh zavedenii. Applied chemistry and biotechnology. 2016. V.16. № 1.P.34-44. 4. Nurtdinov R.M. Efficiency straw shugar processes and quality assessment of hydrolyzates for the cultivation of Saccharomyces:PhD thesis. Kazan.2012. 5. Alcohol Fermentation Monitor. URL:http:// www.applikon-biotechnology.us (date: 20.12.2016) 6. Galeev A.A. Valeeva R.T. Muhachev S.G. Research of the kinetics and optimization of the conditions of the process of hydrolysis of straw with hydrochloric acid // Herald of Kazan Technological universiteta.- 2013. V. 1. № 19.P.246. 7. Valeeva R.T. Muhachev S.G. Mikhailova S.Y. High-temperature hydrolysis of wheat straw with phosphoric acid // Herald of Technological universiteta. 2014. V. 17. № 10. P. 101 8.Valeeva R.T., Shurbina M.Y., Nuretdinova E.E., Ponkratov A.S., Krasilnikova O.V. Comparative evaluation of the growth processes of alcohol and fodder yeasts on sulfurous acid and sulfuric acid hydrolyzates of vegetative raw materials // Herald of Technological university. 2015. V.18. № 21. P. 152-154. 9. Muhachev S.G. Melnikov V.N. Instrumental determination of fermentative activity // Proc. rep. Modern resource- and energy-saving technologies in the alcohol and alcoholic beverage production. Kazan. 2000. P. 18.

УДК: 577.29, ББК: 28.0

МЕТАГЕНОМНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ИНДУСТРИИ И ШИРОКОГО КРУГА ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

А.С.Попенко[1], Н.С.Клименко[1], А.В.Тяхт[1], Д.Г.Алексеев[1], Ю.Ю.Бережная[2], О.И.Волох[2], П.С.Нестерова[2]

[1]ООО Кномикс, Россия, 121069, Москва, Малая Никитская, 31, kirika77@gmail.com, +79165704582
[2]ООО ПепсиКо Холдингс, Россия, 125315, Москва, Ленинградский проспект, 72 к 4, Yulia.Berezhnaya@pepsico.com, +79168166400

Метагеномика – современный метод анализа микробных симбионтов человека с применением высокопроизводительного секвенирования. Наиболее обширное и разнообразное из сообществ обитает в нашем кишечнике, оказывая влияние на множество процессов, включая метаболизм, иммунитет и даже высшую нервную деятельность. Компания «Кномикс» занимается проведением современных исследований в области метагеномики как для крупных корпораций, так и для индивидуальных клиентов, желающих расширить понимание о составляющих своего здоровья.

Ключевые слова: метагеном; микробиота кишечника; 16S

Компания «Кномикс» ориентирована на проведение метагеномных исследований, в частности, микробиоты кишечника человека. Мы успешно реализуем два своих направления: коммерческие исследования для промышленных компаний и разработка индивидуального теста микробиоты кишечника для широкого круга клиентов.

Проект OhMyGut – первая широкомасштабная инициатива по индивидуальному анализу микробиоты кишечника россиян, в которой мог принять участие любой желающий благодаря формату Интернет-краудфандинга. В исследовании приняло участие более 250 участников. Для каждого из участников был проведен сбор образцом микробиоты до и после 2-недельного периода следования персонализированным рекомендациям по диете. В результате проведенного метагеномного секвенирования в формате 16S рРНК и последующего статистического анализа данных для каждого их них был получен подробный персонализированный отчет с интерпретацией состава микробиоты. Он

содержал описание состава кишечной микробиоты и ее метаболического потенциала, включая синтез витаминов и короткоцепочечных жирных кислот, а также оценки степени защищенности от некоторых заболеваний, полученные на основе мета-анализа опубликованных ассоциативных исследований микробиоты. Данный проект представляет собой самое масштабное интервенционное исследование кратковременного изменения диеты на кишечную микробиоту. Объединенный анализ данных по всем индивидуальным профилям совместно с опросниками по диете позволил выявить и кратковременные ассоциации состава микробиоты как с кратковременной, так и с долговременной диетой, а также выявить сигнатуры микробиоты индивидов-"респондеров" – тех, чья микробиота наиболее сильно изменила свой видовой состав под воздействием кратковременной диеты.

Разработанные подходы были использованы в ходе клинического исследования эффективности и безопасности кисломолочных продуктов, проводимого АО "Вимм-Билль-Данн". Нами было проведено метагеномное исследование изменения состава кишечной микробиоты у 150 добровольцев в результате 30-дневного курса приема йогуртов, обогащенных микробной культурой Bifidobacterium animalis subsp. lactis. Сравнительный анализ метагенома до и после курса показал значительные изменения относительной представленности для ряда микробных видов. В частности, помимо роста доли Bifidobacterium, Streptococcus and Lactobacillus, входящих в состав закваски продукта, наблюдалось увеличение вида бифидобактерий B. bifidum, изначально населяющих кишечник человека. В совокупности с обнаруженным повышением долей видов Slackia isoflavoniconvertens и Adlercreutzia equolifaciens, способных синтезировать эквол [1], эти результаты указывают на многогранность потенциально положительного влияния приема изученных продуктов на численность микробов, ассоциированных с положительным воздействием на гормональные и сердечно-сосудистые, а также воспалительные биомаркеры.

Метагеномика - перспективный инструмент для изучения взаимосвязи между составом микробиоты, здоровьем человека и образом жизни. Метагеномные исследования могут носить как фундаментальный характер, так и прикладной: существует запрос со стороны промышленности в связи с уточнением влияния различных пищевых и фармацевтических продуктов на здоровье человека, а также со стороны рядовых потребителей, заботящихся о своем здоровье. В Европе и США ранее стартовали подобные программы – uBiome [2] и American Gut [3]. Теперь же аналогичный продукт доступен и в России.

Литература.
1. Matthies A, Blaut M, Braune A. Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(6):1740-4. 2. https://ubiome.com 3. McDonald D, Birmingham A, Knight R. Context and the human microbiome. Microbiome. 2015;3:52.

METAGENOMIC STUDIES OF HUMAN GUT MICROBIOTA FOR FOOD INDUSTRY AND DIRECT-TO-CONSUMER SERVICES

A.Popenko[1], N.Klimenko[1], A.Tyakht[1], D.Alexeev[1], Y.Berezhnaya[2], O.Volokh[2], P.Nesterova[2]

[1]Knomics LLC, Russia, 121069, Moscow, Malaya Nikitskaya, 31
[2]PepsiCo Holdings, Russia, 125315, Moscow, Leningradsky p-kt, 72 k 4

Metagenomic approach is a modern way to analyze microbial symbionts of human using high-throughput DNA sequencing. The most vast and diverse microbial community lives in our intestine and influences multiple processes including metabolism, immunity and even higher nervous activity. Knomics, LLC conducts state-of-art metagenomic studies for global corporations as well as for individual clients willing to extend their knowledge about healthy lifestyle.

Key words: gut microbiota; metagenome; 16S

Knomics is focused on conducting metagenomic research, particularly, of human gut microbiota. We successfully implement our work in two areas: commercial research for industrial companies and a development of individual gut microbiota test for a wide range of clients.

OhMyGut project is the first large-scale initiative on individual gut microbiota analysis for Russian population openly accessible to anybody thanks to an Internet-based crowdfunding platform. Over 250 volunteers took part in the study. For each of the participants, microbiota sample were collected before and immediately after a 2-week period of following personalized dieatry advice. A detailed personalized report with interpretation of microbiota composition was provided to each participant as a result of 16S rRNA sequencing of the samples and subsequent statistical analysis. The report

included a description of the microbial community structure and its metabolic capabilities including the potential for synthesis of vitamins and short-chain fatty acids, as well as an evaluation of a degree of protection against certain diseases derived from a meta-analysis of published microbiota associative studies. The project represents the largest intervention study of short-term changes in diet on the gut microbiota to date. A combined analysis of data on all individual profiles in conjunction with dietary questionnaires revealed associations with the microbiota composition of both short-term and a long-term diet, as well as allowed to identify the signature of the microbiota of «responders» - the individuals for whom their microbiota changed in the most significant way under the influence of diet.

The developed approaches have been applied in a clinical study of an efficacy and safety of fermented dairy products conducted by JSC «Wimm-Bill-Dann». We carried out a metagenomic study of changes in the composition of the gut microbiota using the stool samples collected from 150 volunteers before and after a 30-days of oral intake of a yoghurt fortified with Bifidobacterium animalis subsp. lactis. Comparative analysis of the metagenomes before and after the course showed a significant change in the relative abundance for a number of microbial species. Particularly, in addition to the increase of Bifidobacterium, Streptococcus and Lactobacillus included in the starter culture of the yoghurt, an increase of bifidobacteria species B. bifidum endogeneous to the human intestine was observed. In combination with the observed increase of proportions of Slackia isoflavoniconvertens and Adlercreutzia equolifaciens species capable of synthesizing equol [1], these results suggest that consumption of the product has potentially positive effect on the gut microbiota by increasing the species associated with positive effects on hormonal, cardiovascular and inflammatory biomarkers.

Metagenomics is a promising tool for studying the relationship between the microbiota composition, human health and lifestyle. Metagenomic studies can have both fundamental and practical applications: there is a demans from food and pharmaceutical industries to identify the impact of various products on human health, as well as a request from individual customers who care about their health. In Europe and the United States similar programs have been established - uBiome [2] and the American Gut [3]. Now a similar product is available in Russia.

References:
1. Matthies A, Blaut M, Braune A. Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(6):1740-4. 2. https://ubiome.com 3. McDonald D, Birmingham A, Knight R. Context and the human microbiome. Microbiome. 2015;3:52.

УДК: 676.082:54.77.022.822, ББК:

РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО БИОПОЛИМЕРА НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ЛИГНИНА И АЛЮМОКРЕМНИЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ.

А.Е.Присмакова, А.Б.Дягилева

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна» Высшая школа технологии и энергетики., Россия, 198095, Санкт-Петербург, ул.Ивана Черных, 4, prismakova@bk.ru, 89214198154

Исследованы реологические свойства ряда образцов нового биополимера полученного золь-гель методом на основе модифицированного лигнина. Установлено, что механизм формирования и свойства новых нанокомпозитов существенно зависят от pH среды, концентрации основных компонентов и времени созревания гелевого продукта.

Ключевые слова: **Ключевые слова**: биополимер, лигнин, реологические свойства, нанокомпозит, лесная биотехнология.

В соответствии с «Российской лесной технологической платформой развития лесного комплекса до 2030 года» [1] био-рефайнинг является наиболее перспективным, инновационным направлением развития лесной биотехнологии. Под этим термином принято понимать глубокую комплексную переработку биомассы древесины непосредственно в регионе ее произрастания с получением наукоемкой продукции с высокой добавленной стоимостью [2]. Анализируя НДТ в области переработки воспроизводимого растительного сырья [3], перед исследователями стоит задача по разработке перспективных методов извлечения ценных компонентов из биомассы древесины и созданию продуктов на их основе. Именно к такой технологии можно отнести спо-

соб синтеза биополимера на основе модифицированного лигнина золь-гель методом [4]. Результатом процесса является создание органоминеральной композиции с взаимопроникающими связями в матрице, где доминирующая составляющая матрицы задается в виде лигнина или минеральной композиции, выбранной по требуемой степени участия компонентов. Исследование реологических свойств в момент формирования нового биополимера позволяет оценить напряжение сдвига в сформированной структуре. Информация о вязкости нанокомпозита необходима для обоснования технологических приемов последующей переработки и определения целевого назначения конечного продукта. В связи с этим целью данной части работы является комплексное исследование реологических свойств новых биополимеров.

Установлено, что напряжение сдвига, а следовательно, и прочность новых связей биополимера в зависимости от pH системы и времени созревания геля существенно изменяется. Это свидетельствует о том, что формирование новой структуры протекает во времени и гибкостью макромолекулярных элементов может определять назначение конечного продукта

Литература. 1. Материалы межд. Конф. «PAP-FOR — 2012», Россия, г. СПБ, 8–11. 11.2012г. 2. Аким Э.Л., Мандре Ю.Г. Био-рефайнинг — прорывная технология переработки древесины//Оборудование и инструмент для профессионалов. Сер. Деревообработка —2016—№3. 3. Справочники НДТ 2015. URL: http://www.burondt.ru/informacziya/dokumentyi/dokument.html?DocType=4 (дата обращения: 17.12.2016) 4. Смирнова А.И., Дягилева А.Б. Механизм формирования органоминеральных структур на основе сульфатного лигнина и алюмосодержащих компонентов. // Лесной журнал —2011— № 6.

RHEOLOGICAL PROPERTIES OF THE NEW BIOPOLYMER BASED ON MODIFIED LIGNIN AND ALUMI NIUM- SILICON COMPOUNDS

A.Prysmakova, A.Diaghileva

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Saint Petersburg State University of Industrial Technologies and Design». Higher School of Technology and Energy, Russia, 198095, St. Petersburg, st. Ivana Chernykh, 4

The rheological properties of series samples of the new biopolymer obtained by sol-gel method based on the modified lignin are researched. It is found that the mechanism of the formation and properties of new nanocomposites significantly dependent on pH, concentrations of major components and the gel product ripening time.

Key words: Key words: biopolymer, lignin, rheological properties, nanocomposite, forest biotechnology.

According to the «Russian Forest Technology Platform forest sector development until 2030» [1] Bio-Refining is the most perspective, innovative direction of development of forest biotechnology. This term is commonly understood as a deep complex processing of wood biomass directly in the region of its growth to produce a high-tech products with high added value [2]. Analyzing the BAT in direction of processing of plant reproducible materials [3], the researchers task is to develop of perspective methods for the extraction of valuable components from wood biomass and creating products based on them. Method of synthesis of the biopolymer based on modified lignin by sol-gel method is a such technology [4]. The result of the process is creation of organic mineral composition with interpenetrating links in the matrix, wherein a dominant component of the matrix is given as lignin or mineral composition selected for the required degree of component interaction. Researching of rheological properties at the time of formation of the new biopolymer allows to estimate the shear stress in the formed structure. Information about the viscosity of the nanocomposite is needed for a substantiation subsequent processing of technological methods and determination of purpose of the final product. In this regard, the aim of this part of work is a complex researching of the rheological properties of new biopolymer.

It is found that shear stress and hence strength of new ties of the biopolymer dependent on pH of the system and the gel product ripening time change substantially. This demonstrates that the formation of new structure and occurs over time with flexibility macromolecular elements can determine the appointment of the final product.

References:
1. Content of Intl. Conf. «PAP-FOR - 2012» Russia, St. Petersburg, 8-11. 11.2012g. 2. Akim E.L., Mandre Y.G. Bio-Refining - breakthrough technology of wood processing // Equipment and tools for professionals. Ser. Woodworking -2016-№3. 3. References: of BAT 2015 URL:http://www.burondt.ru/informacziya/dokumentyi/dokument.html?DocType=4 (date of the application: 17.12.2016) 4. Smirnova A.I., Diaghileva A.B. The mechanism of the formation of organic-based structures sulphate lignin and aluminum-containing components. // Forestry journal-2011- № 6.

УДК: 546.26, 546.05, 544.022.532, 543.426, ББК:

СИНТЕЗ ЛЮМИНЕСЕНТНЫХ МЕТОК НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛАХ МЕТОДОМ АВТОКЛАВИРОВАНИЯ

Е.С.Прихожденко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83, prikhozhdenkoes@gmail.com, +7(953)634-11-89

Представлен метод синтеза люминесцентных углеродных наночастиц в обращенных мицеллах, содержащих воду или водный раствор декстрана сульфата методом автоклавирования. Источником образования люминесцентных НЧ в первом случае является Бридж L4, используемый в системе в качестве поверхностно-активного вещества (ПАВ). Проведено сравнение спектров люминесценции образцов и измерена ее стабильность во времени.

Ключевые слова: углеродные наночастицы, люминесценция, обращенные мицеллы, декстрана сульфат, Бридж L4.

Люминесцентные метки на основе углеродных наночастиц (УНЧ), в силу яркости и фотостабильности, являются перспективным материалом для использования в сфере медицинской диагностики [1]. УНЧ в ближайшее время способны стать альтернативой использованию квантовых точек, содержащих токсичные тяжелые металлы, например, кадмий. Люминесцентные УНЧ синтезируют различными химическими методами, например, карбонизацией углеводородов [2, 3], пиролизом в СВЧ-печи [4]. К недостаткам таких способов синтеза можно отнести большой разброс получаемых УНЧ по размерам и низкую стабильность люминесценции УНЧ во времени. В данной работе мы предлагаем метод получения УНЧ в ограниченном объеме обращенных мицелл с помощью автоклавирования. В качестве источника углерода использовали декстран сульфат (ДС), в качестве стабилизатора – ПАВ на границе раздела водной и масляной фаз.

В ходе работы были получены образцы обращенных мицелл, состава гексан:Бридж L4:вода и гексан:-Бридж L4:водный раствор ДС. Для получения УНЧ образцы были подвергнуты процедуре автоклавирования, затем были измерены спектры люминесценции полученных суспензий, а также стабильность люминесценции в течение 3 недель с момента синтеза. Результаты измерений представлены на рисунке 1.

Таким образом, было обнаружено, что получение УНЧ возможно при автоклавировании обращенных мицелл, как содержащих, так и не содержащих водный раствор ДС. Отличие синтезированных УНЧ состоит в интенсивности и стабильности их люминесценции. УНЧ, полученные автоклавированием содержащих ДС мицелл, обладают более высокой интенсивностью и меньшей стабильностью: их интенсивность упала на 18% ко второй неделе и осталась на достигнутом значении к третьей. УНЧ, полученные из мицелл с водой, обладают более низкой интенсивностью, которая практически не изменилась в течение 3 недель наблюдения. В дальнейшем планируется гидрофилизация полученных УНЧ для их последующего применения в качестве люминесцентных меток в клетках.

Литература.
1. Bhunia S. K. et al. Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes //Scientific reports. – 2013. – Т. 3., №. 1473. – С. 1-7. 2. Yang Z. C., Li X., Wang J. Intrinsically fluorescent nitrogen-containing carbon nanoparticles synthesized by a hydrothermal process //Carbon. – 2011. – Т. 49., №. 15. – С. 5207-5212. 3. Peng H., Travas-Sejdic J. Simple aqueous solution route to luminescent carbogenic dots from carbohydrates //Chemistry of Materials. – 2009. – Т. 21., №. 23. – С. 5563-5565. 4. Wang X. et al. Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents //Journal of Materials Chemistry. – 2011. – Т. 21., №. 8. – С. 2445-2450.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (РНФ проект № 16-13-10195).

SYNTHESIS OF CARBON NANOPARTICLE-BASED LUMINESCENT LABELS IN REVERSED MICELLES BY AUTOCLAVING

E.Prikhozhdenko

State Federal-Funded Educational Institution of Higher Professional Training "Saratov National Research State University named after N. G. Chernyshevskiy" , Russia, 410012, Saratov, Astrakhanskaya, 83

The synthesis method of luminescent carbon nanoparticles by autoclaving of the reversed micelles containing either water, or water solution of a dextran sulfate is presented. A source of luminescent NP formation in the first case is brij L4 used in system as surfactant. Comparison of sample luminescence spectra is carried out and its stability in time is measured.

Key words: carbon nanoparticles, luminescence, reversed micelles, dextran sulfate, brij L4

Luminescent labels based on carbon nanoparticles (CNP) are considered to be very promising material to be used in the medical diagnostics due to its brightness and photostability [1]. CNP can potentially be an alternative to use of the quantum dots containing toxic heavy metals, for instance, cadmium. Luminescent CNP can be synthesized by various chemical methods, for example, carbonization of carbohydrates [2, 3], pyrolysis in the microwave oven [4]. There are some disadvantages of these methods like large size spread of obtained CNP and its low luminescence stability in time. In this work, we offer the synthesis method of CNP in the confined volume of the reversed micelles by means of autoclaving. Dextran sulfate (DS) was used as carbon source and surfactant on the water-oil surface acted as the stabilizer.

In this work several samples of reversed micelles with structures of hexane:brij L4:water and hexane:brij L4:DS water solution were synthesized. Both samples were autoclaved to obtain CNP following by luminescent spectra measurement. Stability of sample luminescence during three weeks was checked. The results are shown in the figure 1.

Thus it was discovered that CNP synthesis is possible after autoclaving of reversed micelles which both are containing, and not containing the DS water solution. The difference between obtained CNP lies in its luminescence intensity and stability. CNP synthesized by autoclaving of micelles containing DS have higher intensity and lower stability: its intensity has decreased by 18% to the second week and remained on the reached value to the third one. CNP synthesized from micelles with water have lower intensity which has practically not changed within 3 weeks of observation. Further the hydrophilization of the obtained CNP for its subsequent application as luminescent labels in cells is planned.

References:
1. Bhunia S. K. et al. Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes //Scientific reports. – 2013. – Vol. 3., No. 1473. – P. 1-7. 2. Yang Z. C., Li X., Wang J. Intrinsically fluorescent nitrogen-containing carbon nanoparticles synthesized by a hydrothermal process //Carbon. – 2011. – Vol. 49., No. 15. – P. 5207-5212. 3. Peng H., Travas-Sejdic J. Simple aqueous solution route to luminescent carbogenic dots from carbohydrates //Chemistry of Materials. – 2009. – Vol. 21., No. 23. – P. 5563-5565. 4. Wang X. et al. Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents //Journal of Materials Chemistry. – 2011. – Vol. 21., No. 8. – P. 2445-2450.

Grant: The research was supported by Russian Science Foundation (RSF project No.16-13-10195).

УДК: 547.415.5:547.922, ББК: 24.239

СИНТЕЗ И ТРАНСФИЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПОЛИКАТИОННОГО АМФИФИЛА С ДИСУЛЬФИДНЫМ ЛИНКЕРОМ

П.А.Пучков[1], Е.В.Шмендель[2], А.С.Лунева[2], Н.Г.Морозова[2], М.А.Зенкова[3], М.А.Маслов[4]

[1]Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, Москва, Россия, Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского, 86, puchkov_pa@mail.ru, 89778192930
[2]Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, Москва, Россия, Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского, 86
[3]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия, Россия, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
[4]Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, Москва, Россия, Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского, 86

Синтезирован новый поликатионный амфифил с дисульфидным линкером, на основе которого сформированы катионные липосомы. Изучены физико-химические свойства липосом и показана их высокая способность к доставке нуклеиновых кислот в эукариотические клетки.

Ключевые слова: катионные липосомы; катионные амфифилы; дисульфидный линкер, генная терапия

Генная терапия располагает высоким потенциалом для лечения наследственных и приобретенных заболеваний за счет введения терапевтических нуклеиновых кислот. Для введения требуются специальные средства доставки, защищающие нуклеиновые кислоты от воздействия биологических факторов. К перспективными и безопасными системам доставки относятся катионные липосомы, формируемые на основе катионных амфифилов. Однако их эффективность остается недостаточной для клинического применения. Один из подходов к повышению количества доставляемой нуклеиновой кислоты в клетки заключается во введении в структуру катионного амфифила функциональных групп, способных разрушаться под действием внутриклеточных факторов. Подобное разрушение катионного амфифила приводит к дестабилизации его комплекса с нуклеиновой кислотой и более полному ее высвобождению.1 Например, дисульфидные группы разрушаются под действием внутриклеточных восстановителей, прежде всего, глутатиона.2

В данной работе нами получен поликатионный амфифил, который состоит из поликатионной матрицы на основе спермина и двух гидрофобных доменов, содержащих дисульфидные группы, которые должны приводить к лучшему высвобождению нуклеиновой кислоты. Для получения поликатионной матрицы провели селективное блокирование спермина с последующим моноалкилированием терминальных аминогрупп в условиях реакции Фукуямы. Сборку целевого поликатионного амфифила осуществили конденсацией поликатионной матрицы и гидрофобных доменов в присутствии конденсирующего агента EEDQ (2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин) с последующим удалением защитных групп. Структуру всех соединений подтверждали с помощью ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

На основе полученного поликатионного амфифила и липида-помощника DOPE (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин) были сформированы катионные липосомы. С помощью метода динамического светорассеяния был определен размер липосом (91.5 нм) и поверхностный заряд (27.9 мВ). Для оценки трансфицирующей активности катионных липосом проводили эксперименты по доставке плазмидной ДНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок, в клетки HEK 293, а также по доставке малой интерферирующей РНК (siРНК) в клетки BHK IR780, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок. Оказалось, что при доставке ДНК эффективность трансфекции, как и в случае нашего аналогичного амфифила без дисульфидного линкера, превосходит показатели коммерческого препарата Lipofectamine 2000. При доставке siРНК показатели нового амфифила существенно превосходят как результаты коммерческого препарата Lipofectamine 2000, так и липосом без дисульфидного линкера. Таким образом, катионные липосомы на основе полученного поликатионного амфифила с дисульфидным линкером являются перспективной системой, способной переносить как протяженные, так и короткие нуклеиновые кислоты в эукариотические клетки.

Таким образом, катионные липосомы на основе полученного поликатионного амфифила с дисульфидным линкером являются перспективной системой, способной переносить как протяженные, так и короткие нуклеиновые кислоты в эукариотические клетки.

Литература.
1. Guo X., Szoka F. C. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery // Jr. Acc. Chem. Res. 2003. V. 36. P. 335-341. 2. Winther J. R. et al. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol // J. Cell Biol. 2004. V. 166. P. 337-345.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-7946.2016.11.

SYNTHESIS AND TRANSFECTION EFFICIENCY OF A NOVEL POLYCATIONIC AMPHIPHILE WITH DISULPHIDE LINKER

P.Puchkov[1], E.Shmendel[2], A.Luneva[2], N.Morozova[2], M.Zenkova[3], M.Maslov[4]

[1]Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow Technological University, Moscow, Russia, Russia, 119571, Moscow, Vernadsky ave., 86
[2]Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow Technological University, Moscow, Russia, Russia, 119571, Moscow, Vernadsky ave., 86

[3]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia, Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev ave., 8
[4]Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow Technological University, Moscow, Russia, Russia, 119571, Moscow, Vernadsky ave., 86

A novel polycationic amphiphile with disulphide linker was developed and used for cationic liposomes preparation. Biological experiments demonstrated high nucleic acid transfer mediated by the liposomes prepared.

Key words: cationic liposomes, cationic amphiphiles, disulphide linker, gene therapy

Gene therapy is a tool for the treatment of both inherited and acquired diseases by nucleic acid transfer. For this purpose, a special vehicle is needed for nucleic acid protection against nucleases and other damaging factors. One of the most promising and safe vehicle are cationic liposomes based on cationic amphiphiles. Unfortunately, they do not possess a high enough efficiency for clinical applications. One approach to improve delivery efficiency is to modify the cationic amphiphile structure with labile functional groups, degradable after the internalisation of cationic liposomes into the cells. Intracellular cationic amphiphile degradation may lead to nucleic acid release from it liposomal complexes and a more effective endosomal escape.1 For example, a disulphide linker is degradable by intracellular reducing agents such as glutathione.2

In this work, we designed and synthesised a policationic amphiphile consisting of polycationic matrix, two hydrophobic domens and two disulphide groups in attempt to improve nucleic acid release. The polycationic matrix was obtained by a selective protection of spermine molecule followed by terminal amino groups monoalkylation in Fukuyama reaction conditions. Condensation of the polycationic matrix and hydrophobic domens in presence of EEDQ (2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline) followed by protecting groups removal gave a key polycationic amphiphile. Structures of all compounds were confirmed by physico-chemical methods of analysis such as NMR-spectroscopy and mass-spectrometry.

Cationic liposomes were prepared by the thin film hydration method from the disulfide polycationic amphiphile and zwitter-ionic helper lipid DOPE (1,2-dioleoyl-

sn-glycero-3-phosphoethanolamine). Size of liposomes (91.5 nm) and its surface charge (27.9 mV) were measured by dynamic light scattering studies. Transfection efficiency of cationic liposomes was investigated by a delivery of plasmid DNA encoding enhanced green fluorescent protein into HEK 293 cells, as well as by a delivery of small interfering RNA (siRNA) into BHK IR780 cells expressing green fluorescent protein. Disulphide cationic liposomes showed better DNA transfer in comparison with Lipofectamine 2000 and similar liposomes composed of amphiphile without disulphide linker. The results of siRNA delivery experiments were significantly superior to both Lipofectamine 2000 and non-disulphide liposomes. In conclusion, cationic liposomes based on a novel polycationic amphiphile with disulphide linker are promising vehicles for delivery of both long and short nucleic acids into eukaryotic cells.

In conclusion, cationic liposomes based on a novel polycationic amphiphile with disulphide linker are promising vehicles for delivery of both long and short nucleic acids into eukaryotic cells.

References:
1. Guo X., Szoka F. C. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery // Jr. Acc. Chem. Res. 2003. V. 36. P. 335-341. 2. Winther J. R. et al. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol // J. Cell Biol. 2004. V. 166. P. 337-345.

Grant: This work was supported by the President's Program In Support Of Leading Scientific Schools SS-7946.2016.11.

.....

УДК: 636.082 , ББК: 45/46

ДНК-МАРКЕРЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ЛИНИЙ СВИНЕЙ

А.В.Радюк, М.А.Леонова, Л.В.Гетманцева

ФГБОУ ВО Донской государственный аграрный университет, Россия, 346493, п.Персиановский, Кривошлыкова, 1, donanimalgene@mail.ru, 8(950)8685787

В работе представлены результаты исследования влияния полиморфизма генов ESR, LIF, MC4R, PRLR и GH на откормочные, мясные и воспроизводительные качества гибридных свиней F1. Определены желательные генотипы, связанные с высокими показателями продуктивности.

Ключевые слова: свиньи, селекция, полиморфизм, ген, аллель, продуктивность.

Основным методом разведения в свиноводстве является гибридизация. Для эффективной реализации метода гибридизации необходимо создавать специализированные линии свиней, позволяющие получать высокопродуктивное гибридное потомство. Эффект зависит от генетической конструкции, уровня продуктивности исходных линий и их сочетаемости. Особый научный и практический интерес приобретает разработка методов, позволяющих оценивать эти параметры не только по фенотипическому проявлению признаков, но и непосредственно на генетическом уровне, используя ДНК–технологии [1-3].

В связи с этим цель работы – оценить влияние полиморфизма генов рецептора эстрогена (ESR), лейкемия-ингибирующего фактора (LIF), рецептора меланокортина-4 (MC4R), рецептора пролактина (PRLR) и гормона роста (GH) на продуктивные качества гибридных свиней F1 и определить желательные генотипы, связанные с высокими показателями продуктивности.

Исследования проводили на гибридных свиноматках F1(n=150), полученных на первом этапе гибридизации при скрещивании свиноматок породы ландрас и хряков крупной белой породы в условиях ЗАО «Племзавод–Юбилейный» Тюменской области. Полиморфизм генов определяли методом ПЦР–ПДРФ.

Откормочные и мясные качества свиней оценивали по результатам контрольного выращивания по следующим показателям: скороспелость, (дн.), длина туловища (см) и толщина шпика (мм); воспроизводительные качества - по количеству поросят при рождении (гол.) и многоплодию (гол.).

В результате изучения распределения частот аллелей и генотипов ДНК-маркеров у гибридных свиней F1 установлено наличие полиморфизма по всем рассматриваемым генам.

В качестве желательных генотипов, связанных с лучшими показателями откормочной и воспроизводительной продуктивности, определены генотипы AA/ESR, AB/LIF, AG/MC4R, AB/PRLR и AG/GH.

Эффекты отдельно по каждому гену составили:

– AA/ESR по кол-ву поросят при рождении +1,1 - и многоплодию +1,15 гол.;

– AB/LIF по толщине шпика -0,97 мм; по кол-ву поросят при рождении и многоплодию +0,99 и +0,61 гол. соответственно;

– AG/MC4R по длине туловища +1,34 см; по кол-ву поросят при рождении и многоплодию +0,72 и +0,9 гол. соответственно.

– AB/PRLR по многоплодию +0,4гол. и по скороспелости, длине туловища и толщине шпика -4,55 дн.; +1,73 см; -1,26 мм соответственно;

– AG/GH по кол-ву поросят при рождении +0,94 - и многоплодию +0,9 гол.

В результате проведенных исследований установлены желательные генотипы по генам ESR, LIF, MC4R, PRLR, GH, которые могут выступать в качестве эффективных инструментов при создании специализированных линий свиней, для получения высокопродуктивного гибридного потомства.

Литература.
1. Munoz, G., E. Alcazar, A. Fernandez, C. Barragan, A. Carrasco, E. De pedro, I. Silio, J.L. Sanchez, M.C. Rodriguez. 2011. Effects of porcine MC4R and LEPR polymorphisms, gender and Duroc sire line on economic traits in Duroc × Iberian crossbred pigs. Meat Sci., 88: 169-173. 2. Klimenko, A., A. Usatov, L. Getmantseva, Yu. Kolosov, O. Tretyakova, S. Bakoev, O. Kostjunina, N. Zinovieva. 2014. Effects of melanocortin-4 receptor gene on growth and meat traits in pigs raised in Russia. Am. J. Agric. Biol. Sci., 9(2): 232-237. 3. Fan, Y., W. Qiong Ping, W. Ming Hui, H. Kan, P.Yu Chun. 2012. Associations between gene polymorphisms in two crucial metabolic pathways and growth traits in pigs. Chinese Science Bulletin, 57: 2733-2740.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке гранта по программе У.М.Н.И.К. №972ГУ/2015 и гранта победителя Всероссийского конкурса молодежных проектов Федерального агентства по делам молодежи «Росмолодежь» 2016 г.

DNA MARKERS FOR THE ESTABLISHMENT OF SPECIALIZED LINES OF PIGS

A.Radyuk, M.Leonova, L.Getmantseva

Don State Agrarian University, Russia, 346493, Persianovsky, Krivoshlykova, 1

Results of polymorphism genes ESR, LIF, MC4R, PRLR and GH on growth, meat and reproductive traits of pigs are represented in the work. Determined genotypes associated with high productivity traits.

Key words: pig, selection, polymorphism, gene, allele, productivity.

The main method in pig breeding is hybridization. For effective implementation of the hybridization method, you must establishment of specialized lines of pigs that allow obtaining highly productive hybrid offspring. The effect depends on the genetic construct, the level of productivity of the baselines and their compatibility. Of particular scientific and practical interest attaches to the development of methods to assess these parameters not only phenotypic manifestation of symptoms, but also directly at the genetic level, using DNA technology [1-3].

The purpose of the work was to evaluate the influence of gene polymorphisms estrogen receptor (ESR), leukemia inhibitory factor (LIF), melanocortin receptor 4 (MC4R), receptor prolactin (PRLR) and growth hormone (GH) on the productive traits of hybrid pigs F1 and identify genotypes associated with high productivity rates.

Investigations were carried out on hybrid sows F1 (n = 150), obtained in the first step of hybridization in crosses of Landrace sows and boars of Large White breed in the conditions of «Plemzavod-Jubilee» of the Tyumen region. Polymorphism of genes is determined by PCR-RFLP.

The following productivity traits were measured: The number of Days to 100-kg (Days to 100-kg), Length of Body (LB), Backfat Thickness (BF), Total Number of piglets Born (TNB), Number of piglets Born Alive (NBA).

With better growth and reproductive traits determined genotypes AA/ESR, AB/LIF, AG/MC4R, AB/PRLR and AG/GH. The effects of genotypes on productive traits of pigs were as follows:

-AA/ESR by the TNB +1.10 and NBA +1.15;

- AB/LIF by the BF -0,97; TNB +0.99 and NBA +0.61;
- AG/MC4R by the LB +1.34; TNB +0.72 and NBA +0.90;
- AB/PRLR by the Days to 100 kg -4.55; LB +0,4; BF -1.26 and NBA +0.40;
- AG/GH by the TNB +0.94 and NBA +0.90.

The result are installed the genotypes for the genes ESR, LIF, MC4R, PRLR, GH, which can serve as effective tools to establishment of specialized lines of pigs that allow obtaining highly productive hybrid offspring .

References:

1. Munoz, G., E. Alcazar, A. Fernandez, C. Barragan, A. Carrasco, E. De pedro, I. Silio, J.L. Sanchez, M.C. Rodriguez. 2011. Effects of porcine MC4R and LEPR polymorphisms, gender and Duroc sire line on economic traits in Duroc × Iberian crossbred pigs. Meat Sci., 88: 169-173. 2. Klimenko, A., A. Usatov, L. Getmantseva, Yu. Kolosov, O. Tretyakova, S. Bakoev, O. Kostjunina, N. Zinovieva. 2014. Effects of melanocortin-4 receptor gene on growth and meat traits in pigs raised in Russia. Am. J. Agric. Biol. Sci., 9(2): 232-237. 3. Fan, Y., W. Qiong Ping, W. Ming Hui, H. Kan, P.Yu Chun. 2012. Associations between gene polymorphisms in two crucial metabolic pathways and growth traits in pigs. Chinese Science Bulletin, 57: 2733-2740.

Grant: This work was supported by the grant program UMNIK №972GU / 2015 and grant Allrussian competition of Youth projects of the winner of the Federal Agency for Youth «Rosmolodezh» 2016.

.....

УДК: 543.9, ББК: 36-1

АПТАМЕРНЫЙ ПОЛЯРИЗАЦИОНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ С УСИЛЕНИЕМ СИГНАЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНА А

А.В.Самохвалов

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33, 03alexeysamohvalov09@gmail.com, 89688146058

Разработан поляризационный флуоресцентный анализ охратоксина А с применением ДНК-аптамера в качестве рецептора. Предложен способ усиления сигнала, основанный на использовании аптамер-белковых комплексов и повышающий чувствительность анализа в 40 раз. При апробации разработанной методики на пробах белого вина предел обнаружения охратоксина А составил 1,1 мкг/кг.

Ключевые слова: вино, микотоксины, охратоксин А, поляризация флуоресценции, аптамеры

Аптамеры представляют собой короткие последовательности РНК или одноцепочечных ДНК, способные афинно и специфично связывать соединения разной природы. Они являются перспективными рецепторами для мониторинга контаминант пищевой продукции. Охратоксин А (ОТА) – широко распространенный токсичный контаминант многих сельскохозяйственных растений и производимых на их основе пищевых продуктов (пшеница, рожь, овес, орехи, сухофрукты, вино и др.). Для его детекции преимущественно используются сложные методы – высокоэффективная жидкостная хроматография и иммуноферментный анализ, требующие длительного времени. Задачей исследования являлась разработка одностадийного аптамерного поляризационного флуоресцентного анализа для экспрессной детекции ОТА.

В работе использовали ДНК-аптамер 5'-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCG-TAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-биотин-3' (11,7 кДа). Методом спектроскопии кругового дихроизм показано, что он образует трехмерную структуру – антипараллельный квадруплекс, необходимую для селективного связывания аналита. Синтезирован конъюгат ОТА с 4´-(аминометил)флуоресцеином. Предложенная методика анализа основана на конкуренции между свободным (содержащимся в пробе) ОТА и конъюгатом ОТА–флуорофор за ограниченное количество сайтов связывания аптамерного рецептора. Реакционную смесь облучали плоскополяризованным светом с λex = 480 нм и измеряли флуоресценцию при λem = 535 нм. Степень деполяризации регистрируемой флуоресценции зависит от соотношения свободного и связанного с аптамером меченого ОТА, что позволяет определять содержание ОТА в пробе.

Принципиальная особенность разработки – применение комплексов аптамера с белками для увеличения поляризации флуоресценции связанного с рецептором конъюгата ОТА–флуорофор. Использование комплекса аптамер–стрептавидин–иммуноглобулин Gпозволило снизить предел обнаружения в 40 раз, достоверно выявлять ОТА в буферных растворах в концентрациях до 3 нМ (1.2 мкг/кг). Разработанная методика апробирована для тестирования проб белого вина. Предварительно вино было двукратно очищено на сорбенте поливинилпирролидоном от полифенольных компонентов. Минимальная достоверно выявляемая концентрация ОТА составила 2,8 нМ (1,1 мкг/кг), что меньше нормативных требований РФ и ЕС (2–5 мкг/кг). Продолжительность анализа – 15 мин.

Благодаря экспрессности, простоте проведения и чувствительности разработанная методика представляется эффективным средством контроля безопасности пищевой продукции.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 14-14-01131.

FLUORESCENCE POLARIZATION APTAMER ASSAY WITH SIGNAL ENHANCEMENT FOR OCHRATOXIN A DETECTION

A.Samokhvalov

Russia, 119071 , Moscow, Leninsky prospect , 33

Fluorescence polarization assay for ochratoxin A was developed with the use of DNA aptamer sd a receptor. New approach for signal enchantment based on the aptamer–protein complexes application was proposed. It allows 40-fold increasing assay sensitivity. The assay was applied for ochratoxin A detection in white wine samples. The reached limit of detection was 1.1 μg/kg.

Key words: wine, mycotoxins, ochratoxin A, fluorescence polarisation, aptamers

Aptamers are short sequences of RNA or of single-stranded DNA which can bind different compounds with high affinity and selectively. They are promising receptors for monitoring of contaminants in food. Ochratoxin A (OTA) is an ubiquitous toxic contaminant of variouscrops and food stuffs of plant origin, such as wheat, rye, oats, nuts, dried fruits, wine etc. The mainly used methods for OTA detection are high performance liquid chromatography and enzyme-linked immunoassay, but they are time consuming and labouring ones. The purpose of our study was the development of one-stage aptamer-based fluorescence polarisation assay for rapid detection of OTA.

Anti-OTA DNA-aptamer having sequence 5'-GAT-CGG-GTG-TGG-GTG-GCGTAA-AGG-GAG-CAT-CGG-ACA-biotin-3' (11.7 kDA) was used in the study.Circular dichroism spectroscopy showed the formation of antiparallel quadruplex structure by this aptamer that is necessary for selective binding of the analyte. OTA was conjugated with 4’-(aminomethyl)fluorescein. The proposed assay is based on the competition between free OTA (contained in sample) and fluorescently labeled OTA for limited binding sites of aptameric receptor. The reaction mixture was irradiated by plane-polarized light with λex = 480 nm, andthe emission was measured at λem = 535 nm. The depolarization degree of registered fluorescence depends of free/bound state ratio of labeled OTA which allows determining OTA concentration in the tested sample.

The principal feature of the development is the application of aptamer–protein complexes to enhance the fluorescence polarization signal of the OTA-fluorophore conjugate being bound with the aptameric receptor. The use of aptamer–streptavidin– immunoglobulin G complex allows 40-fold reducing the limit of detection.The OTA can bereliably detected at concentrations in buffer above 3 nM (1.2 μg/kg). The developed method was tested for OTA detection in white wine samples. The limit of OTA detection was 2.8 nM (1.1 μg/kg), which is lower than maximal residue limits for OTA in Russia Federation and European Union (2-5 μg/kg). The assay time is 15 minutes.

The developed assay is rapid, sensitive and easy to use which make it a promising tool for food safety control.
Grant: This study was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 14-14-01131).

УДК: 577.152.53, ББК:

ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО ИНТЕРАКТОМА СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА ТРОМБОКСАНОВ И ПРОСТАЦИКЛИНОВ МЕТОДАМИ АФФИННОГО ОБОГАЩЕНИЯ И SHOTGUN-ПРОТЕОМИКИ

А.В.Свирид[1], М.А.Шапиро[1], В.Э.Сяхович[3], А.В.Флоринская[4], А.А.Гилеп[5], С.А.Усанов[5]

[1]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Беларусь, 220141, Минск, Купревича, д. 5, корп. 2, svirid@iboch.bas-net.by, +375 (17) 267-87-61
[2]Национальная антидопинговая лаборатория, Беларусь, 223040, Минский район, аг. Лесной, д. 31
[3]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Россия, 119121, Москва, Погодинская, д. 20, стр. 8
[4]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Беларусь, 220141, Минск, Купревича, д. 5, корп. 2

Разработан подход к получению аффинных сорбентов с иммобилизованными на стрептавидине биотинилированными CYP5A1 (тромбоксан синтаза) и CYP8A1 (простациклин синтаза). Проведено аффинное обогащение сорбента белками из лизата тромбоцитарной массы. Определен ряд белков, связывающихся с CYP5A1 и CYP8A1 и предположительно участвующих в белок-белковых взаимодействиях с данными ферментами внутри клетки.

Ключевые слова: интерактомика; аффинная сорбция; CYP5A1; CYP8A1; масс-спектрометрия высокого разрешения.

Процесс формирования тромбоцитов и их активации зависит от множества факторов и синхронизированной работы ряда регуляторных каскадов. Несмотря на значительный объем исследований данных процессов и важность для фармацевтики на сегодняшний день отсутствует достаточная информация по взаимодействию различного типа активаторов и ингибиторов активации тромбоцитов (зачастую метастабильных соединений) и вызываемых ими изменениями в клетке [1]. Все это затрудняет понимание цельной картины происходящего при созревании и активации тромбоцита. Таким образом, целью данной работы было разработка подхода к определению интерактома ключевых ферментов-антагонистов участвующих в регуляции этого процесса – CYP5A1 (тромбоксан синтаза) и CYP8A1 (простациклин синтаза).

Получение аффинного сорбента заключалось в иммобилизации на CNBr-активированной сефарозе 4B стрептавидина с последующей инкубацией в растворе биотинилированных CYP5A1 и CYP8A1. Сайт-специфичное биотинилирование по С-концевому участку белка стало возможно после добавления в экспрессионный вектор (pCWOri+) специфической последовательности (Avi-tag), узнаваемой биотин лигазой E. coli.

Аффинное обогащение происходило за счет нанесение на полученные аффинные сорбенты осветленного лизата тромбоцитарной массы (тромбоцитов не менее 1x1010, лейкоцитов не более 1x107, конечная концентрация белка не более 2 мг/мл). Элюция белков, образующих комплексы с CYP5A1 или CYP8A1, осуществлялась буфером с высокой ионной силой и детергентом (1% CHAPS). Элюаты подвергались обработке трипсином и полученные пептиды разделяли и детектировали с помощью LC-MSna LTQOrbiTrapDiscovery. Валидация и анализ данных осуществлялся в программном пакете MaxQuant [2].

Таким образом, в настоящей работе были получены аффинные сорбенты, несущие CYP5A1 и CYP8A1. Применение сайт-специфичного биотинилирования и добавление подвижной линкерной последовательности позволило произвести направленную иммобилизацию с сохранением нативной конформации белков – что выгодно отличает этот подход от традиционной прямой иммобилизации на CNBr-активированной агарозе по ε-аминогруппам поверхностных лизинов. С помощью метода аффинного обогащения в сочетании с методами shotgun-протеомики (AP-MS или «молекулярного фишинга») [3] в растворимой фракции лизата тромбоцитов был определен ряд белков (в том числе, участвующих в регуляции процессов пролиферации процессов пролиферации и трансдукции внеклеточных сигналов), связывающиеся с CYP5A1 и CYP8A1, и предположительно участвующих в белок-белковых взаимодействиях с данными ферментами внутри клетки.

Полученные результаты помогут пролить свет на белок-белковые взаимодействия в системе биосинтеза важнейших метастабильных метаболитов, ответственных за созревание и активацию тромбоцитов.

Литература.
1. Дормешкин Д.О. и др. Пептидный фаговый дисплей в скрининге пептидомиметиков тромбоксан синтазы // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2015. Т. 59. № 2. С. 53-60. 2. Tyanova S. et al. Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant // Proteomics. 2015. V. 15. № 8. P. 1453–1456. 3. Ivanov A.S. et al. Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: practical realization and further SPR validation. // Proteomics. 2014. V. 14. № 20. P. 2261–74.

Финансирование: Настоящие исследования осуществлены при финансовой поддержке: БРФФИ Грант №Х16Р-062 РФФИ Грант №16-54-00097 Бел_а

NOVEL APPROACH TO THE DETERMINATION OF PROTEIN INTERACTOME OF THROMBOXANE AND PROSTACYCLIN BIOSYNTHESIS SYSTEM BY AFFINITY ENRICHMENT AND SHOTGUN-PROTEOMICS

A.Svirid[1], M.Shapiro[1], V.Syahovich[2], A.Florinskaya[3], A.Gilep[4], S.Usanov[4]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220141, Minsk, Kuprevicha, 5, building 2
[2]National antidoping laboratory, Belarus, 223040, Minsk region, Lesnoy, 31
[3]Orechovich Institute of Biomedical Chemistry, Russia, 119121, Moscow, Pogodinskaya, 20, building 8
[4]Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220141, Minsk, Kuprevicha, 5, building 2

In this work an approach to the preparation of affinity sorbents with biotinylated CYP5A1 (thromboxane synthase) and CYP8A1 (prostacyclin synthase) immobilized on streptavidin-sepharose was developed. We carried out sorbent affinity enrichment by proteins from lysates of platelets and identified a number of proteins that bind to CYP5A1 and CYP8A1, and presumably involved in protein-protein interactions with these enzymes in cell.

Key words: interactomics; affinity adsorption; CYP5A1; CYP8A1; high resolution mass-spectrometry

The process of formation of platelets and their activation depends on many factors and the synchronized operation of several regulatory cascades. Despite the considerable amount of research and the importance of these processes for pharmaceuticals to date there is no sufficient information on the interaction of different types of activators and inhibitors of platelet activation (frequently they are metastable compounds) and changes they cause in the cell [1]. All this makes it difficult to understand the whole picture of what is happening during the maturation and activation of platelets. Thus, the aim of this study was to develop an approach to the definition of the interactome of the key antagonists enzymes involved in the regulation of this process - CYP5A1 (thromboxane synthase) and CYP8A1 (prostacyclin synthase).

Preparation of affinity sorbent consisted of immobilization of streptavidin on CNBr-activated Sepharose 4B, followed by incubation in solution of biotinylated CYP5A1 and CYP8A1. Site-specific biotinylation on C-terminus of the protein became possible after the addition of specific sequence (Avi-tag), recognizable by E. coli biotin ligase to expression vector (pCWOri +).

Affinity enrichment was carried out by application of clarified lysate of platelets (platelet count of at least 1x1010, white blood cells no more than 1x107, final protein concentration ~ 2 mg/ml) to the obtained earlier affinity sorbents. Elution of proteins forming complexes with CYP5A1 and CYP8A1 was performed with a buffer of high ionic strength and detergent (1% CHAPS). The eluates then were treated with trypsin and the resulting peptides were separated and detected by LC-MS on a LTQ OrbiTrap Discovery. Validation and analysis of the data was carried out in MaxQuant software package [2].

Thus, in the present study we obtained affinity sorbents carrying CYP5A1 and CYP8A1. The use of site-specific biotinylation and addition of mobile linker sequence allowed to achieve directed immobilization and preserve the native conformation of proteins - that distinguishes this approach from traditional immobilization on CNBr-activated agarose by ε-amino groups of surface lysines. Using the method of affinity enrichment in combination with the methods shotgun-proteomics (AP-MS or «molecular fishing») [3] we determined in the soluble fraction of platelet lysate a number of proteins (including those involved in the regulation of proliferation and transduction of extracellular signals) that bind CYP5A1 and CYP8A1, and presumably involved in protein-protein interactions with these enzymes in cells.

Obtained results will help to elucidate protein-protein interactions in the major biosynthetic system of metastable metabolites responsible for platelet maturation and activation.

References:
1. Dormeshkin D. et al. Screening of thromboxane synthase peptidomimetics by peptide phage display // Proceedings of National Academy of Sciences of Belarus. 2015. V. 59. № 2. P. 53-60. 2. Tyanova S. et al. Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant // Proteomics. 2015. V. 15. № 8. P. 1453–1456. 3. Ivanov A.S. et al. Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: practical realization and further SPR validation. // Proteomics. 2014. V. 14. № 20. P. 2261–74.

Grant: The work was supported by the Belarussian and Russian Foundations for Basic Research: BFBR grant X16P-062 RFBR grant 16-54-00097 Бел_а

УДК 602.68:57.083 575.153 577.29 616-092.6 616-006.04

ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК-21 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР ГЛИОМ

Сазанов А. А., Виноходов Д. О., Селлами Б.

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Московский пр., д. 26, Санкт-Петербург, 190013, Россия
e-mail: badsellami@gmail.com, +7-951-681-50-16

Исследование посвящено поиску новых биомаркеров злокачественных новообразований головного мозга. Исследованы уровни экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови больных глиомой в стадии прогрессирования и практически здоровых волонтеров методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Выявлено статистически достоверное превышение уровней экспрессии исследуемого гена у пациентов с глиомой по сравнению со здоровыми волонтерами. На основе полученных данных предложено создание системы молекулярной диагностики глиомы.

Ключевые слова: молекулярная диагностика, микроРНК, miR-21, профилирование экспрессии генов, полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), глиома.

Введение. В злокачественных глиомах выявлено несколько аномально экспрессирующихся микроРНК. В част-ности, для первичных глиобластом характерна гиперэкспрессия miR-221, в то время как уровень miR-128, miR-181a, miR-181b и miR-181c микроРНК, активно экспрессирующихся в нормальных тканях мозга, существенно снижен. Уровень miR-124 и miR-137 снижен не только в первичных глиобластомах, но и в анапластических астроцитомах, что, по всей видимости, указывает на их онкосупрессорную роль в опухолях данного типа. Считается, что функ-ционально эти микроРНК ингибируют клеточную пролиферацию в глиобластомах. MiR-21 имеет антиапоптотическую и проинвазивную функции в биологии глиом.

Целью исследования было профилирование экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови больных глиомой для выявления биологических маркеров, связанных с индукцией или супрессией апоптоза опухолевых клеток.

Материал и методы. В работе было использовано 17 образцов периферической крови, стабилизированной ЭДТА, полученных от пациентов с глиомами различной степени злокачественности в стадии прогрессии заболе-вания, и 8 образцов, полученных от практически здоровых волонтеров. Все пациенты находились под наблюдени-ем в институте мозга РАН имени Н. П. Бехтерева. Тотальную РНК выделяли из плазмы крови с использованием реагента TriReagent (MRC, США), согласно стандартной методике производителя. Комплементарную ДНК (кДНК) получали на основе технологии «StemLoop» с использованием набора для обратной транскрипции «ОТ-1» (Син-тол, Москва). Реакцию проводили раздельно с праймерами для гена микроРНК-21 и референтного гена U6 (малая ядерная РНК) в амплификаторе ДТ-Лайт (ДНК-Технологии, Москва) по следующей программе: 16° С — 30 мин, 42° С — 30 мин, 85° С — 5 мин с последующим охлаждением смеси до 4° С. Исследование экспрессии гена микроРНК-21 проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием набора «2,5х Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green» (Синтол, Москва) в конечном объеме 25 мкл. Программа амплификации была следующая: 95° С — 5 мин, затем 45 циклов (95° С — 15 с и 60° С — 1 мин). Расчет относительного уровня экспрессии гена микроРНК-21 проводился по стандартной методике — ΔΔCt.

Основные результаты. Выявлено статистически достоверное ($P < 0,05$) превышение уровня экспрессии гена микроРНК-21 в плазме крови больных глиомой по сравнению с контрольной группой.

Заключение. Предложенная система диагностики глиомы на основе профилирования экспрессии микроРНК-21 может иметь перспективы для использования в скрининговых исследованиях с целью выявления глиом на ранних стадиях.

Литература:
1. *Ambros V. The functions of animal microRNAs //Nature. 2004. V. 431. P. 350-355.*
2. *Мацко Д.Е., Коршунов А.Г. Атлас опухолей центральной нервной системы. СПб.: РНХИ им. проф. А. Л. Поленова, 1998. 197 с.*
3. *Коновалов А. Н., Потапов А. А., Лошаков В. А. [и др.] Стандарты, рекомендации и опции в лечении глиальных опухолей головного мозга у взрослых // Вопросы нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко. 2006. Т. 2. С. 3-11.*
4. *Karsy M., Arslan E., Moy F. Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme // Genes Cancer. 2012. V. 3. P. 3-15.*
5. *Slaby O., Lakomy R., Fadrus P., Hrstka R., Kren L., Lzicarova E., Smrcka M., Svoboda M., Dolezalova H., Novakova J., Valik D., Vyzula R., Michalek J. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients //Neoplasma. 2010. V. 57. P. 264-269.*
6. *Xu L.F., Wu Z.P., Chen Y., Zhu Q.S., Hamidi S., Navab R. MicroRNA-21 (miR-21) regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in lung squamous carcinoma, Gejiu City, China // PLoS One. 2014. V. 9. P. e103698.*
7. *Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells // Cancer Researches. 2005. V. 65. P. 6029-6033.*
7. *Zhou X., Ren Y., Moore L., Mei M., You Y., Xu P., Wang B., Wang G., Jia Z., Pu P., Zhang W., Kang C. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppressesthe growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status // Laboratory Investegations. 2010. V. 90. P. 144-155.*
9. *Corsten M.F., Miranda R., Kasmieh R., Krichevsky A.M., Weissleder R., Shah K. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas // Cancer Research. 2007. V. 67. P. 8994-9000.*
10. *Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2ΔΔCt method // Methods. 2001. V. 25. P. 402-408.*

UDC 602.68:57.083 575.153 577.29 616-092.6 616-006.04

EVALUATION OF EXPRESSION LEVEL OF MICRORNA-21 AS POTENTIAL BIOMARKER OF GLIOMAS

Sazanov A. A., Vinokhodov D. O., Sellami B.

St. Petersburg State Technological Institute (technical university), Moskovskiy pr., 26, Saint Petersburg, 190013, Russia
e-mail: badsellami@gmail.com, +7-951-681-50-16

This investigation is devoted to the search for new biomarkers of malignant tumors of the brain. Levels of gene expression of microRNA-21 were profiled in blood plasma in patients with glioma at stage of progression and in healthy volunteers by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). A statistically significant excess of the levels of expression of the gene under study in patients with glioma compared with healthy volunteers. On the basis of the data suggested the development of molecular diagnosics of glioma.

Key words: molecular diagnostics, microRNA, miR-21 gene expression profiling, polymerase chain reaction in real time (RT-PCR), glioma.

Introduction. Several abnormally expressed microRNAs was revealed in malignant gliomas. In particular, overexpression of miR-221 is characterized for primary glioblastoma, whereas the level of miR-128, miR-181a, miR-181b and miR-181c — miRNA is actively expressed in normal tissues of the brain, is significantly reduced. The level of miR-124 and miR-137 is reduced not only in primary glioblastomas, but also in the anaplastic astrocytomas, that, apparently, indicates their oncosuppressor role in tumors of this type. MiR-21 has anti-apoptotic and proinvasive functions in the biology of gliomas. In some works it was shown that inhibition of miR-21 in cell lines of glioblastoma induces activation of caspases and, consequently, the induction of apoptosis.

Material and methods. In work we were used 17 samples of peripheral blood, stabilized with EDTA, obtained from patients with gliomas of different malignancy grade in the stage of progression of the disease, and 8 samples, obtained from healthy volunteers. All the patients were under supervision at the N.P. Bekhtereva Institute of the Human Brain. Total RNA was isolated from plasma using reagent TriReagent (MRC, USA) according to the standard method of the manufacturer. Complementary DNA (cDNA) was obtained on the basis of technology «StemLoop»

using the kit for reverse transcription of «RT-1» (Syntol, Moscow). The reaction was carried out separately with primers for gene microRNA-21 and the reference gene U6 (small nuclear RNA) the reaction was carried out in the amplifier DT-Lite (DNA-Technology, Moscow) according to the following program: 16°C – 30 min, 42°C for 30 minutes, 85°C – 5 min, followed by cooling the mixture to 4°C. Study gene expression of miRNA-21 was performed using polymerase chain reaction (PCR) in real time using a kit of «2.5-fold reaction mix for PCR-RV in the present EVA Green dye " (Syntol, Moscow) in final volume of 25 µl. The amplification program was as follows: 95°C – 5 min, then 45 cycles (95°C 15 seconds and 60°C – 1 minute). Calculation of relative gene expression level of microRNA-21 was carried out according to standard methods ΔΔCt

Results. A statistically significant (P< 0.05) expression level excess of gene microRNA-21 in plasma of glioma patients in comparing with the control group.

Conclusion. The proposed system of diagnosis of glioma based on expression profiling of microRNA-21 may have promise for use in screening studies to identify the early stages of gliomas.

References.
1. *Ambros V. The functions of animal microRNAs //Nature. 2004. V. 431. P. 350-355.*
2. *Macko DE, Korshunov AG Atlas of tumors of the central nervous system. SPb. RNHI im. teacher. Alabama Polenov. 1998. 197 C.*
3. *A. N. Konovalov, AA Potapov lochakov V. A. et al .Standards, guidelines and options in the treatment of glial brain tumors in adults // Neurosurgery Questions im. N.N. Bourdenko 2006; 2: 3-11.*
4. *Karsy M., Arslan E., Moy F. Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme // Genes Cancer. 2012. V. 3. P. 3-15.*
5. *Slaby O., Lakomy R., Fadrus P., Hrstka R., Kren L., Lzicarova E., Smrcka M., Svoboda M., Dolezalova H., Novakova J., Valik D., Vyzula R., Michalek J. MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozolomide in glioblastoma patients //Neoplasma. 2010. V. 57. P. 264-269.*
6. *Xu L.F., Wu Z.P., Chen Y., Zhu Q.S., Hamidi S., Navab R. MicroRNA-21 (miR-21) regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in lung squamous carcinoma, Gejiu City, China // PLoS One. 2014. V. 9. P. e103698.*
7. *Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells // Cancer Researches. 2005. V. 65. P. 6029-6033.*
7. *Zhou X., Ren Y., Moore L., Mei M., You Y., Xu P., Wang B., Wang G., Jia Z., Pu P., Zhang W., Kang C. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppressesthe growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status // Laboratory Investegations. 2010. V. 90. P. 144-155.*
9. *Corsten M.F., Miranda R., Kasmieh R., Krichevsky A.M., Weissleder R., Shah K. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas // Cancer Research. 2007. V. 67. P. 8994-9000.*
10. *Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2ΔΔCt method // Methods. 2001. V. 25. P. 402-408.*

УДК: 579.64, ББК:

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

М.П.Селюк, Е.Ю.Торопова

Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», Россия , 630039, Новосибирск, Добролюбова, 160, selyuck.marina@yandex.ru, 8-961-875-07-04

Высококачественная почва сельскохозяйственных угодий должна быть плодородной и здоровой, обладать супрессивностью к конкретным фитопатогенам. Только такая почва в состоянии обеспечить получение программируемого и экологически безопасного урожая. Исследования проводились с целью оценки здоровья окультуренных почв и их целинных аналогов по заселенности пропагулами возбудителей корневых гнилей яровой пшеницы, фитотоксичности и супрессивности почвы.

Ключевые слова: почва, фитопатоген, фитомелиорант, фитотоксичность, супрессивность.

По данным ФАО мировые площади деградированных и больных (кондуктивных) почв превысили 1,2 млрд. га, а прямые убытки от почвоутомления, фитотоксичности почвы и вредоносности почвенных фитопатогенов составляют ~25% потерь мирового урожая. Увеличение ареала кондуктивных почви их заселе-

ние возбудителями корневых гнилей важнейших сельскохозяйственных культур, превратилось в мировую проблему, вызывая необходимость мониторинга показателей здоровья почвы [1-3].

Обеспечение благоприятного фитосанитарного состояния почв агроценозов, минимизация их фитотоксичности и ограничение длительности выживания покоящихся структур возбудителей корне-клубневых инфекций достигается индукцией и поддержанием супрессивности почвы [4-7]. Фитомелиорация относится к одному из экологически безопасных методов улучшения здоровья почв и представляет собой комплекс приемов по улучшению природной среды с помощью культивирования или поддержания растительных сообществ, отмечено позитивное влияние фитомелиорации на улучшение свойств почв и их плодородие [8-11].

Исследования по заселенности почвы фитопатогенами проводили в 2010-2016 гг. после разных предшественников яровой пшеницы и фитомелиорантов, определение фитотоксичности и супрессивности почвы проводили в 2014-2016 гг. Отбор почвенных образцов проводили весной в хозяйствах лесостепной зоны Западной Сибири в Томской и Новосибирской областях, почва – выщелоченный и южный черноземы, серая лесная. Плотность пропагул фитопатогенов проводили методом флотации. Фитотоксичность почвы оценивали методом фитоиндикации. Супрессивность оцевали с помощью нового авторского метода [12].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что практически все почвы в значительной степени заселены пропагулами почвенных фитопатогенов [13, 14]. Было выявлено 14% целинных почв свободных от пропагул Bipolaris sorokiniana. Высокопродуктивные окультуренные почвы были заселены конидиями в среднем в 2,5 раза ниже, чем почвы с пониженной продуктивностью и в 5,6 раза выше по сравнению с примыкающими к ним залежными участками. По плотности конидий можно судить о культуре земледелия (структура севооборотов, засоренность посевов) и интенсивности поступления в почву органических остатков, необходимых для жизнедеятельности антагонистов [13].

Значительная часть земельных угодий Западной Сибири представлена фитотоксичными почвами, на целине таких почв оказалось достоверно меньше. По результатам обследований окультуренных почв региона доля фитотоксичных (более 20% ингибирования) почв составила 63% по образцам. Полагаем, что именно этот фактор служит существенной причиной снижения урожайности яровой пшеницы: все почвы низко продуктивных полей оказались средне- или сильнофитотоксичными [13].

Установлены достоверные различия показателей супрессивности окультуренной и целинной почв в отношении B. sorokiniana. Более низкая супрессивность окультуренных почв – следствие ограниченного поступления растительных остатков, а также негативного действия на сапротрофную микрофлору пестицидов и агрохимикатов. Фитомелиоранты (рапс масличный, донник двухлетний) снижают плотность пропагул возбудителей корневых гнилей путем увеличения супрессивности и биологической активности почвы [8, 15,16].

Радикальное оздоровление почв агроценозов от возбудителей коневых гнилей злаковых культур предусматривает ведение севооборотов с прерыванием возделывания восприимчивых культур, включения в севообороты фитосанитарных предшественников и фитомелиорантов, применение органических и минеральных удобрений.

Литература.
1. Торопова Е.Ю. Экологические основы защиты растений от болезней в Сибири. - Новосибирск, 2005. - 272 с. 2. Глинушкин А.П. Фитапатогеный комплекс пшеницы и меры борьбы с ним: Автореф. дис. д-р с.-х. наук. – М., 2013. - 38 с. 3. Торопова Е.Ю., Казакова О.А., Воробьева И.Г., Селюк М.П. Фузариозные корневые гнили зерновых культур в Западной Сибири и Зауралье // Защита и карантин растений. - 2013. - № 9. - С. 23-26. 4. Dixon G. R., Tilston E. L. Soil-Borne Pathogens and Their Interactions with the Soil Environment // Soil Microbiology and Sustainable Crop Production. 2010. P. 197-271. 5. Toropova E.Yu., Kirichenko A.A., Stetsov G.Ya, Suhomlinov V.Y. Soil Infections of Grain Crops with the Use of The Resource-saving Technologies in Western Siberia, Russia // Biosciences Biotechnology Research Asia. 2015. V. 12. № 2. P. 1081-1093. 6. Торопова Е.Ю., Соколов М.С, Глинушкин А.П. Индукция супрессивности почвы – важнейший фактор лимитирования вредоносности корневых инфекций // Агрохимия. 2016. - № 8.- С. 46–57. 7. Buyer J.S., Roberts D.P., Russek-Cohen E. Soil and plant effects on microbial community structure // Can. J. Microbiol. 2002. № 48. P. 955–964. 8. Торопова Е.Ю., Кириченко А.А., Остроухова Е.Г., Корзун А.М. Биологическая активность и фитотоксичность окультуренных и залежных почв Западной Сибири // Модернизация аграрного образования: интеграция науки и практики: сборник научных трудов по материалам II-ой Международной научно-практической конференции (Новосибирск, 21-25 окт. 2014 г.). - Новосибирск, 2014. – С.63-66. 9. Bailey K. L., Lazarovits G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments // Soil & Tillage Research. 2003. V. 72. № 2. P. 169-180. 10. Торопова Е.Ю. Роль донника желтого в повышении биологического разнообразия агроценозов южной лесостепи Новосибирской области / Е.Ю. Торопова, С.Н. Посаженников, Е.Ю. Мармулева // Плодоводство и ягодоводство России. - 2014. - Том XXXIX. - С. 223-228. 11. Торопова Е.Ю., Селюк М.П., Киричеко А.А. Фитосанитарное состояние и фитотоксичноность почвы в Западной Сибири // Защита зерновых культур от болезней, вредителей, сорняков: достижения и проблемы: материалы Междунар. Научно-практической конференции с элементами научной школы для молодых ученых, аспирантов и студентов (18-19 дек. 2016 г.). – Большие Вяземы, 2016. – С. 338-342. 12. Патент РФ № 2568913 C1 от 20.11.2015 13. Селюк

М.П., Остроухова Е.Г., Корзун А.М. Влияние современных обработок почвы на выживаемость и патогенез возбудителей корневой гнили яровой пшеницы в лесостепи Новосибирской области // Инновации молодых учёных аграрных вузов - агропромышленному комплексу Сибирского региона: материалы IX регион. науч.-практ. конф. молодых ученых вузов Сиб. федерал. Округа (июнь, 2011 г.). – Омск, 2011. - С. 36-39. 14. Селюк М.П., Штро Е.Н., Торопова Е.Ю. Влияние предшественников и основной обработки почвы на состояние популяции Bipolaris sorokiniana // Молодежная наука 2012: технологии, инновации: материалы Всероссийской научн.-практ. конф. (с междунар. участием) молодых ученых, аспирантов и студентов (март, 2012 г.). - Пермь, 2012. - С.100-102. 15. Селюк М.П., Торопова Е.Ю. Влияние сельскохозяйственных растений на микробиоценоз почвы в технологии No-till // Ботаника и природное разнообразие растительного мира: материалы Всероссийской научн. Интернет-конференции с междунар. участием (дек. 2014 г.). - Казань, 2014. - С. 191-193. 16. Селюк М.П. Фитосанитарное здоровье почв в технологии No-till в Новосибирской области // Научный потенциал студентов и молодых ученых Новосибирской области (янв., 2016 г.). – Новосибирск, 2016. – С. 29-30.

OPTIMIZATION BIOTECHNOLOGIES OF REMEDIATION OF SOILS IN WESTERN SIBERIA

M.Selyuck, E.Toropova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Novosibirsk State Agrarian University», Russia, 630039, Novosibirsk, Dobrolyubova, 160

High-quality soil of farmlands should be fertile and healthy, have a suppressivity to specific phytopathogens. Only this kind of soil to get a programmable and environmentally friendly harvest. The studies were conducted to assess the health of cultivated soils and their virgin counterparts on population propagules pathogens of root rot of spring wheat, phytotoxicity and suppressive soil.

Key words: soil, phytopathogen, fitomeliorant, phytotoxicity, suppressivity.

According to FAOglobal areas of degraded and sick (conductive) soil exceeded 1.2 billion hectares, while direct losses from soil sikness, phytotoxicity and damage of soil phytopathogens are ~ 25% of the global harvest losses. Increasing the range of conductive soils and their colonization of root rot pathogens of major crops has become a global problem, causing the need of soil health indicators monitoring [1-3].

Providing a favorable phytosanitary conditions agrocenoses soil, minimization of their phytotoxicity and limiting the duration of survival of resting structures pathogens root-tuber infection is achieved by induction and maintenance of suppressive soils [4-7].

Phytomelioration refers to one of the environmentally safe methods to improve soil health and it is a complex set of techniques to improve the environment by culturing or maintaining plant communities, noted the positive impact of phytomelioration to improve soil properties and their fertility [8-11].

Studies on populations of soil phytopathogens were carried out in 2010-2016 after various predecessors of spring wheat and phyitomeliorants, definition of phytotoxicity and suppressivity of soil was carried out in 2014-2016. Soil sampling was conducted in the spring of farms steppe zone of Western Siberia in Tomsk and Novosibirsk regions, the soil - leached and southern black soils, gray forest.The density of propagules of phytopathogens was carried by flotation. Phytotoxicity was evaluated by soil phytoindication. Supressivity was carried by a new author's method [12].

Our data indicates that almost all the soil is largely populated with propagules of soil phytopathogens [13, 14]. It was found that 14% of virgin soil is free of propagules Bipolaris sorokiniana. Highly cultivated soils were populated with conidia on average 2.5 times lower than the soil with low productivity and 5.6 times higher than in adjoining fallow areas. According to the density of conidia the farming standards (crop rotation structure, contamination of crops) and intensity into the soil organic matter, needed to antagonists of life, can be judged [13].

A significant part of the land in Western Siberia is presented by phytotoxic soil, there were significantly less soils in the virgin lands. As a result of the region's cultivated soils surveys, phytotoxic share (more than 20% inhibition) of soil was 63% in the samples. We believe that this factor is a significant cause of lower yields of spring wheat: all soils of low productive fields were of medium or strong phytotoxicity [13].

There were significant differences in performance of supressivity indications of cultivated and virgin soils in relation to B. sorokiniana. Lower supressivity of cultivated land - a consequence of the limited income of crop residues as well as the negative effect on saprotrophic microflora of the pesticides and agrochemicals. Fitomeliorants (oilseed rape, two-year clover) decrease the density of propagules of pathogens of root rot by

increasing suppressivity and soil biological activity [8, 14, 16].

Radical improvement soil of agrocenoses from pathogens of root rot cereals involves conducting crop rotation with cultivation interruption of susceptible crops, included in crop rotation phytosanitary precursors and fitomeliorants, the use of organic and mineral fertilizers.

References:
1. Toropova E. Yu. Ekologicheskie osnovy zashchity rastenii ot boleznei v Sibiri. – Novosibirsk, 2005. - 272 s. 2. Glinushkin A.P. Fitapatogenyi kompleks pshenitsy i mery borby s nim: Avtoref dis. d-r s. –kh. Nauk. - M., 2013. - 38 s. 3. Toropova E.Yu., Kazakova O.A., Vorobeva I.G., Seliuk M.P. Fuzarioznye kornevye gnili zernovykh kultur v Zapadnoi Sibiri i Zaurale // Zashchita i karantin rastenii. – 2013. - № 9. – S. 23-26. 4. Dixon G.R., Tilston E.L. Soil-Borne Pathogens and Their Interactions with the Soil // Environment Soil Microbiology and Sustainable Crop Production. – 2010. – P. 197-271. 5. Toropova E.Yu., Kirichenko A.A., Stetsov G.Ya., Suhomlinov V.Y. Soil Infections of Grain Crops with the Use of The Resource-saving Technologies in Western Siberia // Russia Biosciences Biotechnology Research Asia. 2015. V. 12. № 2. P. 1081-1093. 6. Toropova E.Yu., Sokolov M.S., Glinushkin A.P. Induktsiia supressivnosti pochvy vazhneishii faktor limitirovaniia vredonosnosti kornevykh infektsii // Agrokhimiia. – 2016. - № 8. – S. 46-57. 7. Buyer J.S., Roberts D.P., Russek-Cohen E. Soil and plant effects on microbial community structure // Can. J. Microbiol. 2002. № 48. P. 955-964. 8. Toropova E. Yu., Kirichenko A.A., Ostroukhova E.G., Korzun A.M. Biologicheskaia aktivnost i fitotoksichnost okulturennykh i zalezhnykh pochv Zapadnoi Sibiri / Modernizatsiia agrarnogo obrazovaniia: integratsiia nauki i praktiki: sbornik nauchnykh trudov po materialam II-oi Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii. - Novosibirsk (21-25 okt. 2014 g.). – Novosibirsk, 2014. – S. 63-66. 9. Bailey K.L., Lazarovits G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments // Soil Tillage Research. 2003. V. 72. №2. P. 169-180 10. Toropova E.Yu., Posazhennikov S.N., Marmuleva E. Yu . Rol donnika zheltogo v povyshenii biologicheskogo raznoobraziia agrotsenozov iuzhnoi lesostepi Novosibirskoi oblasti // Plodovodstvo i iagodovodstvo Rossii. – 2014. - Tom XXXIX. – S. 223-228. 11. Toropova E. Yu., Seliuk M.P., Kiricheko A.A. Fitosanitarnoe sostoianie i fitotoksichnonost pochvy v Zapadnoi Sibiri // Zashchita zernovykh kultur ot boleznei vreditelei sorniakov dostizheniia i problem: materialy Mezhdunar Nauchno-prakticheskoi konferentsii s elementami nauchnoi shkoly dlia molodykh uchenykh aspirantov i studentov (18-19 dek. 2016 g). - Bolshie Viazemy, 2016. – S. 338-342. 12. Patent RF 2568913 S1 ot 20.11.2015. 13. Seliuk M.P., Ostroukhova E.G., Korzun A.M. Vliianie sovremennykh obrabotok pochvy na vyzhivaemost i patogenez vozbuditelei kornevoi gnili iarovoi pshenitsy v lesostepi Novosibirskoi oblasti // Innovatsii molodykh uchenykh agrarnykh vuzov - agropromyshlennomu kompleksu Sibirskogo regiona: materialy IX region nauch. –prakt. Konf. molodykh uchenykh vuzov Sib. Federal. Okruga (iiun 2011 g.). – Omsk, 2011. – S. 36-39. 14. Seliuk M.P., Shtro E.N., Toropova E.Yu. Vliianie predshestvennikov i osnovnoi obrabotki pochvy na sostoianie populiatsii Bipolaris sorokiniana // Molodezhnaia nauka 2012: tekhnologii, innovatsii: materialy Vserossiiskoi nauchn.–prakt. конf. s mezhdunar. uchastiem molodykh uchenykh aspirantov i studentov (mart 2012 g.) - Perm, 2012. – S. 100-102. 15. Seliuk M.P., Toropova E.Yu. Vliianie selskokhoziaistvennykh rastenii na mikrobiotsenoz pochvy v tekhnologii No-till // Botanika i prirodnoe raznoobrazie rastitelnogo mira: materialy Vserossiiskoi nauchn. Internet-konferentsii s mezhdunar. uchastiem (dec, 2014 g/). – Kazan, 2014. – S. 191-193. 16. Seliuk M.P. Fitosanitarnoe zdorove pochv v tekhnologii No-till v Novosibirskoi oblasti // Nauchnyi potentsial studentov i molodykh uchenykh Novosibirskoi oblasti (ianv., 2016 g.). – Novosibirsk, 2016. - S. 29-30.

КОМПЛЕКС МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ДОКСОРУБИЦИНОМ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.С.Семкина

ФГБУ «ФМИЦПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, Россия, 119991, Москва, Кропоткинский переулок, 23, alevtina.semkina@gmail.com, 89857771089

Главным недостатком традиционной химиотерапии являются серьезные побочные эффекты, связанные с неспецифичностью действия химиопрепарата на клетки опухоли. Чтобы нейтрализовать этот недостаток, можно использовать наночастицы, обеспечивающие направленную доставку лекарства в пораженную ткань. В рамках данного исследования нам удалось получить векторные магнитные наночастицы оксида железа, загруженные противоопухолевым препаратом Доксорубицином, способные обеспечить эффективную терапию, а также МРТ-диагностику рака молочной железы.
Ключевые слова: магнитные наночастицы, доксорубицин, рак, доставка лекарств, химиотерапия, МРТ

Целью настоящего исследования было получение комплекса противоопухолевого препарата доксорубицина (Докс) с магнитными наночастицами, конъюгированными с моноклональными антителами к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), охарактеризовать его химико-биологические свойства, а также эффективность в терапии и диагностике аденокарциномы молочной железы.

Магнитные наночастицы оксида железа получали путем термического разложения ацетилацетоната железа (III). Полученные наночастицы покрывали оболочкой из бычьего сывороточного альбумина (путем адсорбции и последующей ковалентной сшивки) и полиэтиленгликоля (путем конъюгирования). Загрузку Докс осуществляли путем адсорбции лекарства на поверхности магнитных наночастиц (МНЧ). Контроль размеров комплекса МНЧ-Докс, а также измерения дзета-потенциала наночастиц проводили с помощью метода динамического светорассеяния. Параллельно производили синтез векторных комплексов МНЧ-VEGF-Докс, конъюгируя предварительно МНЧ с моноклональными антителами к VEGF. Цитотоксичность комплексов определялась в ходе МТТ-теста на линии клеток 4Т1 мыши. Интернализацию наночастиц исследовали с помощью конфокального микроскопа Nikon A1R MP+. Захват препарата клетками анализировали методом проточной цитофлуориметрии (FACS). Эксперименты in vivo проводили на самках мышей породы Balb/c с экспериментальной аленокарциномой молочной железы 4Т1.

Нами были получены устойчивые при физиологических условиях, низкотоксичные МНЧ, покрытые оболочкой. Емкость загрузки Докс в МНЧ составила 8% по массе. Лекарство иммобилизуется на поверхности МНЧ в основном за счет электростатических взаимодействий. Высвобождение Докс из наноконтейнера является pH-зависимым. При синтезе векторных наночастиц МНЧ-VEGF было показано сохранение иммуно-химических свойств антител после конъюгации. С помощью микроскопии было подтверждено накопление векторных и невекторных наночастиц в клетках аденокарциномы 4Т1 мыши. Цитотоксичность комплексов МНЧ-Докс и МНЧ-VEGF-Докс оказалась сравнимой с активностью свободного Докс. По данным FACS наночастицы, векторизованные антителами к фактору роста эндотелия сосудов, захватывались клетками почти в 4 раза более эффективно. Введение этого препарата привело к увеличению медианы выживаемости у мышей с экспериментальной аденокарциномой молочной железы по сравнению с Докс в отсутствии наночастиц. Помимо этого, МНЧ успешно визуализировали опухолевый очаг при МРТ-исследовании, облегчая процесс идентификации границ опухоли.

Были получены МНЧ, загруженные Докс и конъюгированные с антителами к VEGF, которые могут обеспечить эффективную терапию и МРТ-диагностику аденокарциномы молочной железы.

Финансирование: Работа была выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-6371.2016.7)

MAGNETIC NANOPARTICLES COMPLEX WITH DOXORUBICIN FOR BREAST CANCER THERAPY AND DIAGNOSTICS

A.Semkina

Serbsky Medical Research Center of Psychiatry and Narcology, Russia, 119991, Moscow, Kropotkinsky per., 23

The main drawback of conventional chemotherapy is serious side effects, which are connected with nonspecific drug effect on tumor cells. To solve this problem we can use different types of nanoparticles, which can provide more effective anticancer drug transport to the tumor region. In this research we were able to obtain targeted iron oxide magnetic nanoparticles, loaded by anticancer drug Doxorubicin, which can provide effective therapy and MRI-diagnostics of breast cancer.

Key words: magnetic nanoparticles, cancer, drug delivery, chemotherapy, MRI, doxorubicin

The goal of this research is to obtain the complex of Doxorubicin (Dox) with iron oxide magnetic nanoparticles (MNP), modified by monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor (VEGF), to research its biochemical properties and anti-tumor efficiency (therapy and diagnostics) during in vivo experiments.

Iron oxide magnetic nanoparticles were synthesized by thermal decomposition of iron acetyl acetonate (III). The coating of these nanoparticles by bovine serum albumin and polyethylene glycol molecules was carried out. Doxorubicin loading was carried out by adsorption of anticancer drug molecules on MNP surface. The sizes of MNP, MNP-Dox and zeta-potential values were analyzed by method of dynamic light scattering. The synthesis of antibody modified MNP (MNP-VEGF) was conducted in parallel. Cytotoxic activity of MNP-Dox and MNP-VEGF-Dox was determined with MTT-assay by using 4T1 cell line. Internalization of Dox-loaded nanoparticles in living 4T1 cells was proved by confocal microscopy on Nikon A1R MP+. Nanoparticles cellular uptake was measured by flow cytometry (FACS). In vivo experiments were carried out with Balb/c female mice, which have experimental tumor 4T1.

At first, low toxicity, stable under physiological conditions magnetic nanoparticles with coating were obtained. Dox-loading in MNP was 8% by weight. Zeta-potential on MNP-Dox surface increased, with increase of Dox-loading. Electrostatic interactions were proposed as driving force of MNP-Dox complexation process. Under acidic condition Dox-release was more intensive compared to physiological conditions. It was shown, that both types

of nanoparticles (without/with antibody) were accumulated in 4T1 adenocarcinoma cells. MNP-Dox and MNP-VEGF-Dox showed quite similar cytotoxicity against 4T1 cells compared to free Dox in MTT cell viability assay. Cellular uptake of MNP-VEGF-Dox in adenocarcinoma 4T1 cells was nearly four times higher than the untargeted nanoparticles, as detected by flow cytometry. After MNP-VEGF-Dox intravenous administration survivability of breast adenocarcinoma mice was increased compared with Dox, MNP-Dox and untreated mice. Moreover MNP were able to successfully visualize tumor region during MRI examination.

Thus, we obtained nanocomplex MNP-VEGF-Dox, which can provide effective therapy of breast adenocarcinoma and its MRI-visualization.

References:

Grant: RF President grant (MK-6371.2016.7)

УДК: 57.571.27, ББК:

РОЛЬ БЕЛКА PGLYRP1/TAG-7 В АКТИВАЦИИ МЕХАНИЗМОВ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ЛИСТЕРИОЗЕ

Д.А.Слонова[1], А.В.Посвятенко[2], А.В.Кибардин[2], С.С.Ларин[3]

[1]Московский физико-технический институт (государственный университет), Россия, 141701, Долгопрудный, Институтский пер., 9, darya.romanenko@phystech.edu, +7-903-53-47-669
[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Россия, 119334 , Москва, Вавилова, 34/5
[3]ФГБУ «ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Россия, 117997 , Москва, Саморы Машела, 1

Получен рекомбинантный человеческий пептидогликан-распознающий белок PGLYRP1/Tag-7, активирующий защитные механизмы врожденного иммунитета. Показано, что он предохраняет эукариотические клетки от заражения листериями.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, инфекция, пептидогликан-распознающие белки, Tag-7, PGLYRP1, Listeria monocytogenes

Листериоз – инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое широко распространенными грамположительными бактериями Listeria monocytogenes. Листериоз характеризуется разнообразием путей его передачи, клинических проявлений и высокой летальностью. L. monocytogenes являются внутриклеточным патогенами, обладающими механизмами ускользания от иммунного ответа [1].

Врожденный иммунитет распознает консервативные молекулярные структуры патогенов (например, пептидогликан – элемент клеточной стенки бактерий), с помощью специфических рецепторов. У млекопитающих, в частности у людей, четыре пептидогликан-распознающих белка [2, 3, 4, 5]. Три из них содержат трансмембранные домены и потенциально локализуются на мембранах клеток. Четвертый белок PGLYRP1/Tag-7, который может секретироваться и действовать как аутокринно, так и паракринно привлек наше внимание. В данной работе было проведено исследование возможного участия белка PGLYRP1/Tag-7 в модуляции взаимодействия L. monocytogenes с иммунокомпетентными клетками.

С помощью эукариотической экспрессионной системы был получен рекомбинантный человеческий белок PGLYRP1/Tag-7. Используя лабораторные штаммы и различные клинические изоляты, была показана способность белка PGLYRP1/Tag-7 связываться с клеточными стенками грамположительных и грамотрицательных бактерий. Анализ влияния PGLYRP1/Tag-7 на рост бактерий L. monocytogenes показал, что исследуемый белок не проявляет бактерицидной и бактериостатической активности при использованных концентрациях. Однако присутствие PGLYRP1/Tag-7 может усиливать чувствительность L. monocytogenes к некоторым антибактериальным препаратам.

С использованием модельной клеточной системы мышиных макрофагоподобных клеток ANA-1 продемонстрировано, что присутствие PGLYRP1/Tag-7 стимулирует фагоцитоз бактерий. На инфекционной модели in vitro показано, что PGLYRP1/Tag-7 ингибирует внутриклеточное выживание L. monocytogenes, предохраняя эукариотические клетки от заражения. Аналогичные результаты были получены на модели перитонеальных макрофагов мыши.

С помощью иммуноферментного анализа было зафиксировано значительное увеличение секреции интерлейкина 6 (ИЛ-6) клетками ANA-1 после обработки L. monocytogenes белком PGLYRP1/Tag-7. ИЛ-6 играет важную роль в стимуляции иммунного ответа, поэтому повышение его уровня в ответ на обработку

патогена пептидогликан-распознающим белком даёт основания полагать, что PGLYRP1/Tag-7 может запускать ИЛ-6 зависимые пути активации иммунной системы.

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о том, что эволюционно консервативные паттерн-распознающие рецепторы являются перспективным инструментом для разработки новых подходов к терапии инфекционных заболеваний.

Литература.
1. Тартаковский Игорь Семенович, Малеев В В и Ермолаева Светлана Александровна Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. - Москва : Медицина для всех, 2002. 2. Kustikova OS, Kiselev SL, Borodulina OR, Senin VM, Afanas'eva AV, Kabishev AA Cloning of the tag7 gene expressed in metastatic mouse tumors // Genetika. - May 1996 г. 3. Kibardin AV, Mirkina II, Baranova EV, Zakeyeva IR, Georgiev GP, Kiselev SL. The differentially spliced mouse tagL gene, homolog of tag7/PGRP gene family in mammals and Drosophila, can recognize Gram-positive and Gram-negative bacterial cell wall independently of T phage lysozyme homology domain. // Journal of Molecular Biology. - 2003 г. 4. Kibardin AV, Mirkina II, Korneeva EA, Gnuchev NV, Georgiev GP, Kiselev SL. Molecular cloning of a new mouse gene tagL containing a lysozyme-like domain. // Dokl Biochem. - 2000 г. 5. Liu Chao, Xu Zhaojun, Gupta Dipika, Dziarski Roman Peptidoglycan Recognition Proteins. A NOVEL FAMILY OF FOUR HUMAN INNATE IMMUNITY PATTERN RECOGNITION MOLECULES. // The Journal of Biological Chemistry. - 14 September 2001 г. - стр. 34686-34694.

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФИ №15-04-07649

THE ROLE OF THE HUMAN SHORT PEPTIDOGLYCAN RECOGNITION PROTEIN (PGLYRP1/TAG-7) IN EARLY STEPS OF IMMUNE RESPONSE TO LISTERIA MONOCYTOGENES

D.Slonova[1], A.Posvyatenko[2], A.Kibardin[2], S.Larin[3]

[1]FSAEI HE Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Russia, 141701, Dolgoprudny, Institutskiy per., 9
[2]Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Russia, 119334, Moscow, Vavilova, 34/5
[3]National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology name of Dmitry Rogachev, The Ministry of Health of the Russian Federation, Russia, 117997, Moscow, Samory Mashela, 1

PGLYRP1/Tag-7 is a member of the mammalian pattern recognition receptor family called peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). We demonstrated that human recombinant PGLYRP1/Tag-7, derived from an eukaryotic expression system, could interact with Listeria monocytogenes, activate the defense mechanisms of the innate immune and participate in the host protection from intracellular infection.

Key words: PGLYRP1, Tag-7, PGRP-S, Listeria monocytogenes, peptidoglycan recognition protein

Listeria monocytogenes is the Gram positive bacterium which causes a foodborne infection, called listeriosis [1]. In humans the major clinical signs of listeriosis are sepsis, meningitis and meningoencephalitis [2]. L. monocytogenes is a facultative intracellular pathogen that developed a number of special mechanisms to escape the innate immune response [3].

Innate immunity recognizes specific conservative structures of pathogens by pattern recognition receptors. Eukaryotes possess several types of receptors, which recognize peptidoglycan, the conservative part of the bacteria cell wall. Among these receptors there is a family of peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) [4]. PGLYRP1 has no transmembrane domain [5,6], it can be secreted out of the cells and may interact with other members of the innate immunity system by paracrine signaling. We propose, that peptidoglycan recognition protein PGLYRP1/Tag-7 can protect host during early steps of infection.

Human recombinant protein PGLYRP1/Tag-7 was derived from eukaryotic expression system. Its binding to cell walls of Gram-positive and Gram-negative bacteria was demonstrated. Analysis of L. monocytogenes growth showed that PGLYRP1/Tag-7 does not display direct bactericidal or bacteriostatic activity at used concentrations. However, the increase of L. monocytogenes sensitivity to some antibiotics was found in the presence of PGLYRP1/Tag-7 by the disk diffusion method. Stimulation of L. monocytogenes phagocytosis by macrophage-like cell line ANA-1 was demonstrated in the presence of PGLYRP1/Tag-7 by flow cytometry.

Using in vitro infection model it was shown that PGLYRP1/Tag-7 treatment inhibits the intracellular bacteria survival, protecting eukaryotic cells from infection. Enzyme-linked immunosorbent assay displayed that such treatment enhances level of proinflammatory cytokine IL-6 produced by ANA-1 after bacteria exposure. IL-6 plays

an important role in the activation of the immune response. This fact allows to imply that PGLYRP1/Tag-7 may activate the immune system through this cytokine.

Thus our results supports hypothesis concerning participation of PGLYRP1/Tag-7 in host protection by decreasing intracellular infection and enhancing the work of anti-inflammatory mechanisms.

References:
1. Wing Edward J, Gregory Stephen H. Listeria monocytogenes: Clinical and Experimental Update // The Journal of Infectious Diseases. - 2002 г. - стр. S18-S24. 2. Allerberger F, Wagner M Listeriosis: a resurgent foodborne infection // Clinical Microbiology and Infection. - January 2010 г. - стр. 16-23. 3. Calame Daniel G, Mueller-Ortiz Stacey L, Wetsel Rick A Innate and adaptive immunologic functions of complement in the host response to Listeria monocytogenes infection // Immunobiology. - 16 July 2016 г. - стр. 1407-1417. 4. Dziarski Roman Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. // Cellular and Molecular Life Sciences. - September 2003 г. - стр. 1793–1804. 5. Kustikova OS, Kiselev SL, Borodulina OR, Senin VM, Afanas'eva AV, Kabishev AA Cloning of the tag7 gene expressed in metastatic mouse tumors // Genetika. - May 1996 г. 6. Liu Chao, Xu Zhaojun, Gupta Dipika, Dziarski Roman Peptidoglycan Recognition Proteins. A NOVEL FAMILY OF FOUR HUMAN INNATE IMMUNITY PATTERN RECOGNITION MOLECULES. // The Journal of Biological Chemistry. - 14 September 2001 г. - стр. 34686-34694.

Grant: This work was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research №15-04-07649

УДК: 577.218, ББК: 28.070

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА HIF В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА НА АНГИОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

А.М.Смирнова, И.С.Захарова, М.К.Живень, А.И.Шевченко, С.М.Закиян

Новосибирский государственный университет; ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10, ann777sm@yandex.ru, +79537626512

Данная работа посвящена влиянию активации HIF-альфа в нормоксических условиях, реализованной с использованием систем CRISPR/Cas9, в плюрипотентных стволовых клетках (ПСК) человека на ангиогенные свойства их эндотелиальных производных. Разрабатывается модель взаимосвязи активации HIF-альфа в ПСК человека на реализацию ангиогенных сигнальных каскадов в их дифференцированных эндотелиальных производных.

Ключевые слова: фактор, индуцируемый гипоксией, плюрипотентные стволовые клетки человека, эндо телиальные производные, ангиогенез

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) - ДНК-связывающий транскрипционный фактор,играющий ключевую роль в регуляции ангиогенеза. В настоящее время модуляция HIF-пути является перспективной терапевтической стратегией для управления различными заболеваниями. Данная работа направлена на исследование эффектов повышения экспрессии и стабилизации субъединиц HIF-1альфа и HIF-2альфа в эндотелиальных производных плюрипотентных стволовых клеток человека. Подобраны последовательности направляющих РНК для сайленсинга Int6/eIF3–ингибитора HIF-2α – с использованием системы CRISPR/Cas9.Последовательности направляющих РНК, предназначенные для ингибирования Int6/eIF3, заклонированы в векторы и доставлены в ИПСК человека линии iMA-1L с помощью нуклеофекции. Методом проточной цитометрии произведен сортинг GFP-позитивных колоний, содержащих целевую встройку, проведены раунды субклонирования и анализ экспрессии HIF-1α, HIF-2α, Int6/eIF-3e в полученных субклонах.

Результаты данного исследования внесут значительный вклад в понимание фундаментальных молекулярных механизмов HIF-зависимого ангиогенеза, расширят представления о сигнальных каскадах, запускаемых при целевой активации HIF, что необходимо для разработки эффективных стратегий модуляции экспрессии HIF для терапевтического ангиогенеза и лечения ряда онкологических заболеваний.

THE STUDYING OF ACTIVATION EFFECTS OF HIF TRANSCRIPTION FACTOR IN HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS ON THE POTENTIAL OF ENDOTHELIAL ANGIOGENIC DERIVATIVES

A.Smirnova, I.Zakharova, M.Jiven, A.Shevchenko, S.Zakian

Novosibirsk State University; The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics The Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Ave., 10

This work is devoted to the influence of HIF-alpha activation in normoxic conditions, realized by using CRISPR/Cas9 systems, in human pluripotent stem cells (PSC) on angiogenic properties of their endothelial derivatives. The model of the connection between HIF-alpha activation and the realization of angiogenic signal cascades in their differentiated endothelial derivatives is being developed.

Key words: hypoxia inducible factor, human pluripotent stem cells, endothelial derivatives, angiogenesis

Hypoxia-inducible factors (HIFs) are DNA-binding transcriptional factors, which play a crucial role in angiogenesis regulation. Nowadays, HIF-pathway modulation is a superior therapeutic strategy for various disease control. This work is aimed at the study of the effects, connected with the expression and stabilization enhancement of HIF-1alpha and HIF-2alpha subunits in endothelial derivatives of human pluripotent stem cells (PSC). The sgRNAs sequences for Int6/eIF3 – HIF-2α inhibitor silencing have been obtained by using CRISPR/Cas9 system. We have cloned the sgRNAs sequences into special vectors for Int6/eIF3 inhibiting. We have delivered vectors in human iPSC iMA-1L lines by using nucleofection. GFP-positive cell colonies, containing target insertion, were sorted by a flow cytometry method. The round of subcloning and the analysis of HIF-1α, HIF-2α, Int6/eIF-3e expression in obtained subclones have been completed.

The results of this research contribute to the fundamental understanding of molecular mechanisms of HIF-dependent angiogenesis and expand the conception of signaling cascades, triggered during the intentional HIF activation, which is important for effective strategies of HIF expression modulation development for therapeutic angiogenesis and various oncology disease treatments.

УДК: 661.11, ББК: 24

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ БИОПОЛИМЕРА НА ОСНОВЕ ЛИГНИНА И МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ

А.И.Смирнова[1], А.Б.Дягилева[2]

[1]Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Высшая школа энергетики и технологии, Россия, 198095, Санкт-Петербург, Ивана Черных улица, 4, smirnova_nasty87@mail.ru, 8-911-785-57-98
[2]Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Высшая школа энергетики и технологии, Россия, 198095, Санкт-Петербург, Ивана Черных улица, 4, abdiag@mail.ru,

Доказана возможность получения биомодифицированного лигнина золь-гель способом с помощью алюмосодержащих отходов.
Ключевые слова: золь-гель способ, модификация, сульфатный лигнин, нефелиновый концентрат, зола

Комплексное использование сырья и создание безотходных технологий являются основными задачами современных производств. Значительная часть растительной биомассы - отходы лесного и сельского хозяйства - используются нерационально. Количество некоторых углеродсодержащих отходов столь велико, что их следует рассматривать как важное технологическое сырье, например, сульфатный лигнин (СЛ). На современных предприятиях ЦБП предусматривается сжигание щелоков с лигнином для технологических нужд [1].

Несмотря на широкую область возможного использования биополимера лигнина, как в чистом виде, так и его модифицированных форм, проблема эффективного его использования остается актуальной [2, 3]. Основной трудностью переработки выделяемых лигнинов в основной технологии остается высокая стоимость реагентов, применяемых для их модификации, а также энергоёмкость предлагаемых методов. Современные исследования в области утилизации отходов деревоперерабатывающей отрасли направлены на поиск менее энергоёмких способов переработки лигнина, а также определение новых рынков

использования его модифицированных форм.

Для получения новых продуктов из лигнина возможно использование золь-гель технологии, которая позволяет сформировать новую структуру биополимера, с включением в ее матрицу дополнительных минеральных центров. Это придает специфические свойства новому полимеру. Принципиальная возможность сочетания органических полимеров и кремнийсодержащих компонентов активно обсуждается в научной литературе [4]. В наших предварительных исследованиях водных дисперсий лигнина показана возможность его модификации этим способом [5]. В качестве добавок можно использовать нефелиновый концентрат (НФК), а также зольные отходы. Акцент выбора реагента заключается в том, что в его состав должны входить SiO_2, $A1_2O_3$, TiO_2 и др. Эти компоненты обеспечивают получения гибридного продукта на основе биополимера с дополнительным набором функциональных групп.

На основании спектральных исследований установлено, что модифицированные лигнины имеет набор специфических функциональных групп, а также редкосетчатую структуру, и силикатные центры, отличные от исходных веществ.

Данный способ модификации лигнина рассматривается в качестве заявки на изобретение.

На основании спектральных исследований установлено, что модифицированные лигнины имеет набор специфических функциональных групп, а также редкосетчатую структуру, и силикатные центры, отличные от исходных веществ. Данный способ модификации лигнина рассматривается в качестве заявки на изобретение.

Литература.
1. ГОСТ Р 54097-2010 Ресурсосбережение. Наилучшие доступные технологии. Методология идентификации. http://docs.cntd.ru/document/1200085351 (дата обращения 15.12.2016). 2. Чудаков М.И. Промышленное использование лигнина. М.: Лесн.пром-ть, 1972.- 213 с. 3. Боголицын К.Г. «Зеленая» химия лигнина – новые аспекты //Физ. хим. лигнина: тез. докл.- Архангельск, 2007. - С. 16-21. 4. Шабанова Н.А. Основы золь-гель технологии нанодисперсного кремнезема. М.: ИКЦ Академкнига.- 2004.-2088 с. 5. Дягилева А.Б., Смирнова А.И. Модификация сульфатного лигнина золь-гель методом с получением гибридных продуктов // Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов: тезисы докл. конф. (Москва : 23 октября 2014). – Москва, РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2014, С. 134-136.

PROCESS FOR THE PREPARATION OF A MODIFIED FORM OF THE BIOPOLIMER LIGNIN-BASED AND MINERAL COMPONENTS

A.Smirnova[1], A.Dyagileva[2]

[1]St. Petersburg State University of Industrial Technology and Design, Graduate School of Energy and Technology, Russia, 198095, Saint-Petersburg, ivana chernykh ulitsa, 4
[2]St. Petersburg State University of Industrial Technology and Design, Graduate School of Energy and Technology, Russia, 198095, Saint-Petersburg, ivana-chernykh-ulitsa, 4

The possibility of producing biomodified forms of lignin sol-gel method using aluminum-containing waste.

Key words: sol-gel method, modification, kraft lignin, nepheline concentrate, ash

Integrated use of raw materials and the creation of non-waste technologies are the main tasks of modern industries. A significant portion of plant biomass - waste wood and agriculture - are used irrationally. Number of some carbon-containing waste is so great that they should be regarded as an important technological materials such as kraft lignin (SL). In modern pulp and paper mills provided lye burning the lignin for technological needs [1].

Despite the wide range of possible use of the biopolymer lignin, both in pure form and its modified form, the problem of effective use remains an urgent [2, 3]. The main difficulty of processing allocated lignins in the core technology is the high cost of reagents used for modifying them, as well as the energy consumption of the proposed methods. Current research in the field of recycling of waste wood processing industry aimed at finding a less energy-intensive methods of processing of the lignin, and the definition of new markets use its modified forms.

For new products from lignin is possible to use sol-gel technology, which allows you to create a new structure of the biopolymer, with the inclusion in its array of additional mineral centers. This gives the specific properties of the new polymer. The theoretical possibility of a combination of organic polymers and silicon components being actively discussed in the literature [4]. In our preliminary studies aqueous dispersions lignin modifying

it shows that the method [5]. The additives can be used nepheline concentrate (NFC), and waste ash. Accent selection reagent is that it should include SiO_2, $A1_2O_3$, TiO_2, and so on. These components enable obtaining hybrid biopolymer-based product with an additional set of functional groups.

Based on the spectral studies show that the modified lignin is a set of specific functional groups and redkosetchatuyu structure and silicate centers other than the starting materials.

This method of modifying the lignin is considered as an application for the invention.

Based on the spectral studies show that the modified lignin is a set of specific functional groups and redkosetchatuyu structure and silicate centers other than the starting materials. This method of modifying the lignin is considered as an application for the invention.

References:
1. GOST R 54097-2010 Resource. Best Available Techniques. identification methodology. http://docs.cntd.ru/document/1200085351 (reference date 15/12/2016). 2. Chudakov M.I. Industrial use of lignin. M .: Lesn.prom Th, 1972.- 213 p. 3. Bogolitsyn K.G. «Green» chemistry of lignin - new aspects // Def. Chem. Lignin: mes. dokl.- Arkhangelsk, 2007. - P. 16-21. 4. Shabanova N.A. Fundamentals of sol-gel nanosized silica technology. M .: ICC Akademkniga.- 2004.-2088 s. 5. Dyagileva A.B., Smirnova A.I. Modification of lignin sulfate sol-gel method to produce a hybrid product // Chemical Technology and Biotechnology of new materials and products: Abstracts. Conf. (Moscow, October 23, 2014). - Moscow, MUCTR. Mendeleev, 2014, pp 134-136.

.....

УДК: 543.9, ББК: 28.4

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ HELICOBACTER PYLORI

Д.Н.Смирнова, Н.В.Богачева

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, Россия (магистрант), Россия, 610000, Киров, ул. Московская, 36, cards1993@mail.ru, 8-982-387-03-93

Разработана иммунохроматографическая тест-система для детекции белка патогенности cagA H.pylori, пригодная для тестирования различного биологического материала (культуры микроорганизма, кала, содержимого зубодесневых карманов) на наличие указанного микроорганизма.

Ключевые слова: иммунохроматография, тест-система, H.pylori, cagA, коллоидное золото

По состоянию на сегодняшний день хеликобактериоз является одной из наиболее распространенных инфекций человека. Установлено, что

H.pylori в 70-80% случаев является причиной развития хронического гастрита, в 50-60% - язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка, более чем у 90% пациентов вызывает развитие MALT-лимфомы желудка [1]. В России доля лиц, страдающих MALT-лимфомой желудка, составляет среди мужчин 30,4, среди женщин - 13,3 человек на 100 000 населения (РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2006). Установлено, что инфицирование H.pylori является причиной как минимум 327 тыс. новых случаев рака желудка в год [2].

Среди современных методов, применяемых для диагностики инфекционных заболеваний, в том числе диагностики хеликобактериоза, широкое распространение получили иммунохимические тесты. Отсутствие отечественных иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для диагностики белков патогенности H. pylori, обосновывают актуальность работы.

Целью работы является разработка иммунохроматографической тест-системы для выявления H.pylori.

В результате проведенных теоретических и практических исследований разработан экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы для детекции белка cagA H.pylori, состав мультимембранного композита и основные иммунохимические компоненты которого представлены на рисунке 1.

Разработанную иммунохроматографическую тест-систему протестировали с различным биологическим материалом на предмет наличия белка cagA H.pylori.

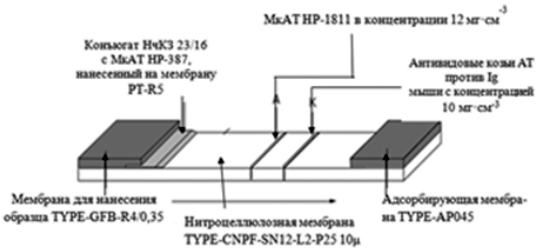


Рисунок 1 - Внешний вид и основные компоненты разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для диагностики хеликобактериоза.

На первом этапе оценили специфичность и чувствительность тест-систем с культурой H.pylori, находящейся в коллекции культур кафедры микробиологии ВятГУ. На втором этапе проанализировали тест-систему с суспензией кала и содержимым зубодесневых карманов, выделенных у серопозитивных к H.pylori доноров.

По результатам работы было установлено, что разработанная тест-система чувствительна к H.pylori. При нанесении 100 мкл любого биологического образца, содержащего соответствующую культуру микроорганизма, на нитроцеллюлозной мембране появляется две окрашенные линии в тестовой и контрольной зонах, что свидетельствует о положительном результате иммунохимического анализа. Разработанная тест-система специфична – не дает положительных результатов в реакции с гетерогенными культурами микроорганизмов.

Разработанная иммунохроматографическая тест-система не имеет аналогов на отечественном рынке, пригодна для анализа культур H.pylori, а также для исследования биологического материала (кала и содержимого зубодесневых карманов) у лиц, страдающих гастритом, язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, на предмет наличия антигена (белка cagA H.pylori) с целью обоснования назначения и контроля эрадикационной терапии.

Литература.
1. Ford A.C., Axon A.T. Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implications// Helicobacter. 2010.Vol.15 (Suppl. 1). P.1-6. 2. Сеньчукова М.А., Стадников А.А. О роли бактерий в этиологии и патогенезе злокачественный новообразований // Сибирский онкологический журнал. – 2009. – №2(32). – С. 79-85

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY-SYSTEM OF DETECTING HELICOBACTER PYLORI

D.Smirnova, N.Bogacheva

Vyatka State University, Kirov, Russia , Russia, 610000, Kirov, Moskovskaya Str. , 36

The immunochromatographic assay-system of detecting pathogenicity protein cagA H.pylori has been developed. It is applicable for testing various biomaterial (microorganism culture, faeces, gingival pocket content) for the presence of the above mentioned microorganism.

Key words: immunochromatography, test-system, H.pylori, cagA, colloidal gold

Nowadays helicobacteriosis is one of the most widely spread human infections. It was stated that 70-80% cases of acute gastritis, 50-60% cases of peptic ulcer, as well as 90% cases of stomach MALT-lymphoma are caused by H.pylori [1]. In Russia 30.4 men and 13.3 women out of 100 000 have stomach MALT-lymphoma (Russian Cancer Research Centre named after N. N. Blokhin RAMS, 2006). It was stated that, at a minimum, infecting with H.pylori causes 327 new cases of stomach cancer yearly [2].

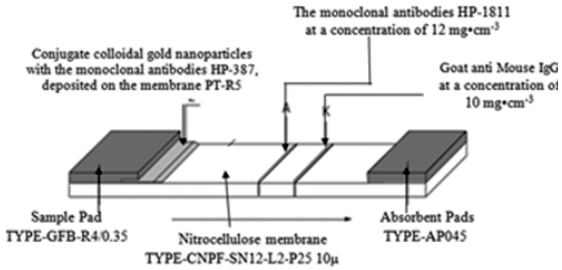
Of the methods of diagnostics of infectious diseases, helicobacteriosis included, immunochemical assays are widely used. There have not been any domestic immunochromatographic assay-systems for detecting pathogenicity proteins H.pylori, thus this work is up-to-date and topical.

The aim of the work is working out the immunochromatographic assay-system of detecting H.pylori.

As a result of theoretical and practical studies an experimental sample of immunochromatographic assay-

system for detecting the protein cagA H.pylori was developed. The content of multimembranous composite and the main immunochemical components are shown in Pic. 1.

The immunochromatographic assay-system was tested with different biomaterials for the presence of the protein cagA H.pylori.



Picture 1 — The view and the main components of the worked out experimental sample of the immunochromatographic assay-system for detecting helicobacteriosis.

At the first stage the specificity and sensitivity of assay-systems with the culture H.pylori from the collection of cultures of the Microbiology Department of the VyatSU was estimated. At the second stage the assay-system with a faeces suspension and with gingival pocket content taken from H.pylori antibody-positive donors was analysed.

As a result it was stated that the assay-system is H.pylori sensitive. After introducing 100 mcL of any bio-sample containing the culture in the control zone and in the test zone of the nitrocellulose membrane two coloured lines appear, it suggests a positive result of the immunochemical analysis. The worked out assay-system is specific and it does not show any positive results in reaction with heterogeneous cultures of microorganisms.

On the domestic market there are no analogs of the worked out immunochromatographic assay-system applicable in H.pylori cultures analysis, as well as in analysis of bio-material (like faeces and gingival pocket content) of people with gastritis and peptic ulcer as for the presence of the anti-gene (protein cagA H.pylori) with the aim of grounding their prescription and control over eradicative therapy.

References:
1. Ford A.C., Axon A.T. Epidemiology of Helicobacter pylori infection and public health implications// Helicobacter. 2010. Vol.15 (Suppl. 1). P.1-6. 2. Sen'chukova M.A., Stadnikov A.A. On the role of bacteria in etiology and pathogenesis of malignant neoplasms // Sibirskiy onkologicheskiiy zhurnal. – 2009. – №2(32). – C. 79-85

УДК: 57.083.12 , ББК: 28.492

ХАРАКТЕРИСТИКА ЖЕЛЕЗОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ.

Д.А.Соколова, Г.Г.Няникова

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Россия, 190013 , Санкт-Петербург, Московский проспект, 26, sokolovadashenka@mail.ru, +79062746745

Из природных источников выделены железоокисляющие бактерии, которые отнесены к роду Siderococcus. Изучены морфологические и физиолого-биохимические признаки выделенных микроорганизмов.

Ключевые слова: железобактерии; морфологические свойства; культивирование.

Существенную роль в преобразовании железа в природе, а именно, в переводе нерастворимых соединений в растворимые и обратно, играют микроорганизмы. Способностью осаждать оксиды железа на поверхности клеток обладают многие бактерии, которые различаются морфологическими и физиологическими признаками и принадлежат к разным таксономическим группам.

Железобактерии широко распространены в природе и могут существовать в большом диапазоне условий. Они обнаружены в подземных водах сульфидных месторождений, кислых водах железистых источников и кислых озерах с высоким содержанием закисного железа.

Целью данной работы было выделение железобактерий из природных источников, их идентификация и изучение морфологических и физиолого-биохимических свойств.

Пробы воды отбирали из двух мест: Староладожский канал (г. Шлиссельбург, Ленинградская область) и Ирганайская ГЭС (технологическая подходная галерея к деривационному каналу).

Для выделения железобактерий использовали селективную питательную среду следующего состава (г/л): (NH4)2SO4 – 0,5, NaNO3 – 0,5, K2HPO4 – 0,5, MgSO4×7H2O – 0,5, лимонная кислота – 10, сахароза – 2,0, триптон – 1,0, FeSO4×7H2O – 5,9, вода – до 1 л.

Характер роста культуры определяли на плотных и в жидких средах.

Результаты микроскопирования: мелкие кокковидные клетки (диаметр 0,2-0,5 мкм), одиночные или небольшими агрегатами. Вокруг клеток отложения железа в виде яркой желто-оранжевой корочки.

Морфология колоний: колонии мелкие (диаметр 1-5 мм), имеют круглую форму, молодые колонии светло-бежевого цвета, а старые – красно-коричневые; поверхность гладкая, край колонии ровный, профиль колонии – выпуклый, молодые колонии блестящие, старые матовые, структура колонии однородная, колонии легко снимаются с агара. Цвет среды становится красным в результате окисления железа. По данным микроскопирования, морфологическим признакам колоний и культуральным характеристикам выделенные микроорганизмы были отнесены к роду Siderococcus.

В жидких средах изучали динамику изменения pH и роста микроорганизмов. По результатам эксперимента можно сделать выводы. Значение pH с 7,3 к концу культивирования повысилось до 10,0. Причем наибольший скачок в значении pH происходил в первые двое суток. Наибольший рост микроорганизмов наблюдался на вторые сутки и составил $2{,}2\times10^9$ КОЕ/мл.

Было определено отношение выделенных железоокисляющих микроорганизмов к кислороду. По результатам эксперимента данные бактерии отнесены к факультативным анаэробам.

CHARACTERISTICS OF IRON BACTERIA ISOLATED FROM NATURAL SOURCES

D.Sokolova, G.Nianikova

St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), Russia, 190013 , St. Petersburg, Moskovsky Prospekt, 26

Iron bacteria were obtained from natural sources and were classified as Siderococcus spp. Morphological and physiological and biochemical properties of isolated microorganisms were studied.

Key words: iron bacteria; morphological properties; cultivation

Microoragnisms significantly influence the natural converting of iron, specifically – conversion of insoluble compounds into soluble and back. Many bacteria, which have different morphological and physiological characteristics and belong to different taxonomic groups, are able to precipitate iron oxides on the surface of cells.

Iron bacteria are widely spread in nature and are able to exist in a large range of conditions. They were found in groundwater of sulfidic deposits, in acidic waters of the ferruginous sources and in acidic lakes with a high content of ferrous iron.

The main purpose of current work was to isolate iron bacteria from natural sources, to identify them and to study their morphological, physiological and biochemical properties.

Samples were taken from two places: Staroladozhsky channel (Shlisselburg, Leningrade area) and Igranayskaya HPP (the approaching technological gallery to the derivational channel).

A selective culture medium of the following composition was used for isolating of iron bacteria (g/L): (NH4)2SO4 – 0.5, NaNO3 – 0.5, K2HPO4 – 0.5, MgSO4×7H2O – 0.5, citric acid – 10, saccharose – 2.0, tryptone – 1.0, FeSO4×7H2O – 5.9, water – up to 1 L.

The nature of culture's growth was determined on solid and in liquid culture mediums.

The results of microscopic examination: small coccoid cells (diameter 0.2-0.5 mm), single or in small units. Iron sediments as bright yellow-orange crusts were found around the cells.

The morphology of the colonies: small colonies (diameter 1-5 mm), which have a circular shape; young colonies were of light beige colour, old – of red-brown; the surface of the colonies was smooth, the edge of the colonies was also smooth, the profile of the colonies – convex; young colonies were glossy, old – matt; the structure of the colony was homogeneous; colonies could be easily removed from the agar. The colour of the culture medium became red due to the oxidation of iron. According to the results of the microscopic examination and cultural characteristics, isolated microorganisms were classified as Siderococcus spp.

The dynamics of pH change and of microbial growth was studied in the liquid culture mediums. According to

the experiment results we can conclude that by the end of cultivation the value of pH has increased from 7.2 to 10.0. Moreover, the biggest leap in the pH value occurred in the first two daysThe largest growth of microorganisms has been observed on the second day and was amounted to 2.2×10^9 CFU/ml.

The attitude to the presence of oxygen of the isolated iron-oxidizing microorganisms was determined. According to the results of the experiment investigated bacteria were classified as facultative anaerobes

УДК: 579.254.4, ББК: 03.00.28

ГЕНОМНЫЙ И МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ФАГОВЫХ ПУТЕЙ ПЕРЕДАЧИ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В МИКРОБИОТЕ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Е.В.Старикова

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Россия, 119435, Москва, Малая Пироговская, 1а, hed.robin@gmail.com, +79165177021

Колокализованы фаговые гены и гены антибиотикорезистности в метагеномах кишечника человека. Обнаружены гены антибиотикорезистентности в составе метагеномных последовательностей свободных вирусных частиц. Обнаружены гомологи генов антибиотикорезистентности в составе последовательностей профагов в геномах бактерий рода Enterococcus.
Ключевые слова: метагеномика; геномика; антибиотикорезистентность; трансдукция

Широкое применение антибиотиков в медицине и промышленности приводит к распространению антибиотикорезистентности в микробных сообществах. Известно, что гены антибиотикорезистентности могут возникать de novo в результате мутации или распространяться путем горизонтального переноса, который осуществляется мобильными генетическими элементами.

Целью нашей работы являлось обнаружение свидетельств потенциального переноса генов антибиотикорезистентности (АР) бактериофагамив микробиоте кишечника человека. Поиск свидетельств велся с использованием трех in silico подходов: анализа колокализации генов АР и вирусных генов в метагеномах кишечника человека, картирования метавиромных ридов на базу данных генов антибиотикорезистентности и анализа геномов изолятов бактерий рода Enterococcus на основе поиска гомологии кодирующих последовательностей.

В рамках данной работы нами были аннотированы фаговые гены и гены антибиотикорезистентности в рамках глобального каталога генов человеческого кишечника IGC, включающего 10 млн кодирующих последовательностей. Колокализация фаговых генов и генов антибиотикорезистентности производилась путем картирования парных метагеномных ридов на каталог IGC (1). В результате колокализации в 760 метагеномах было обнаружено 150 пар фаговых генов и генов АР, находящихся внутри одного метагенома на расстоянии порядка размера вставки между парными ридами.

Поиск генов АР в составе последовательностей свободных вирусных частиц производился путем анализа 257 вирусных метагеномов, полученных из различных микробных окружений. Метавиромные риды картировались на последователности генов базы данных антибиотикорезистентности CARD (2) (v1.1.3). Гены с высокой степенью покрытия ридами считались присутствующими в образце. В результате метавиромного подхода было обнаружено 75 генов АР различных типов в 21 (8%) из 257 проанализированных метавиромов. Среди обнаруженных генов более чем в одном образце встречались гены TEM-3, TEM-4, TEM-33, TEM-116, TEM-135 из группы бета-лактамаз, метилтрансферазы ErmC и ErmF, а также гены устойчивости к тетрациклину TetQ и TetC.

Поиск генов АР в составе последовательностей умеренных фагов и в их окружений производился на основе аннотаций профагов в геномных сборках бактерий рода Enterococcus с помощью программы PHASTER (3). Гены АР аннотировались с помощью программы Resistance Gene Identifier. С помощью этого подхода было обнаружено 57 умеренных фагов в геномах 20 штаммах E. faecalis и E. faecium. При этом в 3 штаммах из 20 обнаруживалась неполная фаговая последовательность, кодирующая гены эффлюкс-системы efrAB. В одном из штаммов обнаруживался гомолог мембранного белка mprF, также обладающего свойствами антибиотикорезистентности.

Полученные результаты могут свидетельствовать о горизонтальном переносе ряда генов антибиотикорезистентности при участии бактериофагов.

Литература.
1. Li J. et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome //Nature biotechnology. – 2014. – T. 32. – №. 8. – C. 834-841. 2. McArthur A. G. et al. The comprehensive antibiotic resistance database //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – T. 57. – №. 7. – C. 3348-3357. 3. Arndt D. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool //Nucleic acids research. – 2016. – C. gkw387.

Финансирование: Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-54-21012).

GENOMIC AND METAGENOMIC ANALYSIS OF PHAGE CHANNELS OF ANTIBIOTICS RESISTANCE GENE TRANSFER IN HUMAN GUT MICROBIOTA

E.Starikova

FSBIS SRI PCM FMBA of Russia, Russia, 119435, Moscow, Malaya Pirogovskaya, 1a

Antibiotics resistance (AR) and phage genes were colocalized in human gut metagenomes. AR genes were discovered in metagenomic VLP (virus-like particles) sequences. Several AR genes' homologs were discovered as part of Enterococcus prophage sequences.

Key words: metagenomics; genomics; antibiotics resistance; transduction

Broad antibiotics usage in medicine and industry has led to increases in antibiotics resistance in microbial communities. Antibiotics resistance genes can emerge de novo as a result of mutation or spread through the process of horizontal gene transfer, which is carried out by mobile genetic elements.

The aim of our study was to search for evidence for potential bacteriophage-mediated antibiotics resistance (AR) gene transfer in human gut microbiota. This was performed using three in silico approaches: analysing phage genes and AR genes colocalization in human gut metagenomes, mapping metaviral reads on antibiotics resistance genes database sequences and analyzing Enterococcus isolates through coding sequences homology search.

As a part of our study we have annotated phage and AR genes in the integrated human gut microbiota genes catalog (IGC) (1) consisting of 10 mln coding sequences.

Phage and AR genes colocalization was performed through mapping metagenomic paired reads on the IGC catalog. After analyzing 760 metagenomes 150 phage/AR gene paires were discovered, being located in a distance of a paired reads insert size.

In order to find AR genes in virus-like particles sequences, 257 viral metagenomes obtained from various microbial environments were downloaded and analyzed. Metaviral reads were mapped on antibiotics resistance genes sequences from CARD database (release 1.1.3) (2). Genes highly covered with metaviral reads were considered as present in a sample. As a result, we detected 75 AR genes of several types in 21 (8%) of the 257 viromes analyzed. TEM-3, TEM-4, TEM-33, TEM-116, TEM-135 beta-lactamase genes occurred in more than one sample, as well as ErmC and ErmF methyltransferases and TetQ and TetC tetracycline resistance genes.

In order to find AR genes in prophage sequences and their environments, prophages were annotated in genomic assemblies of 20 Enterococcus strains using PHASTER (3) phage search tool. AR genes were annotated using Resistance Gene Identifier software. Using this approach, 57 prophages in 20 Enterococcus strains were identified. An incomplete prophage sequence carrying efrAB efflux pump genes were identified in 3 of the 20 analyzed strains and a membrane mprF protein homolog was identified in one of the strains.

The obtained results can be considered as evidence for phage-mediated antibiotics resistance genes transfer.

References:
1. Li J. et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome //Nature biotechnology. – 2014. – T. 32. – №. 8. – C. 834-841. 2. McArthur A. G. et al. The comprehensive antibiotic resistance database //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – T. 57. – №. 7. – C. 3348-3357. 3. Arndt D. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool //Nucleic acids research. – 2016. – C. gkw387.

Grant: The research was made possible by the financial support of RFBR (grant № 16-54-21012).

УДК: 571.27, ББК: 28.073

ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.М.Стойнова[1], Я.М.Станишевский[1], А.В.Зубков[2]

[1]Российский Университет Дружбы Народов (Институт биохимической технологии и нанотехнологии), Россия, 117198, Москва, Миклухо-Маклая, 6, stoinova17@mail.ru, +79252705552
[2]НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Россия, 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5/17, alex_zubkov@list.ru,

В данной работе проводили исследования по изучению биспецифичности аутоантитела к тиреоглобулину и тиреопероксидазе. Были разработаны высокочувствительные тесты для определения антител к тиреоглобулину и тереопроксидазе, используя иммуноферментный анализ (ИФА) с различными системами детекции.

Ключевые слова: антитела, аутоимунные заболевания, тиреоглобулин, тиреопероксидаза

Одним из первых проявлений аутоиммунной патологии, являются аутоантитела, выявляемые в сыворотке крови пациентов до обнаружения клинически диагностируемых симптомов. При аутоиммунной патологии щитовидной железы основными антигенами, к которым идёт формирование антител, являются тиреоглобулин (ТГ), тиреопероксидаза (ТПО) и рецептор тиреотропного гормона (рТТГ) [1].

В ряде работ показано, что аутоантитела к тиреоглобулину и тиреопероксидазе распознают общие антигенные детерминанты и возможно существование антител (АТ), обладающих биспецифичностью в отношении этих антигенов [2]. Однако в отдельных работах при исследовании человеческих моноклональных антител была выявлена полиреактивность, а не биспецифичность антител к ТГ и ТПО, но эти данные авторами были получены при анализе материала, полученного от одного пациента.

Целью работы является проведение исследований по изучению биспецифичности аутоантитела к тиреоглобулину и тиреопероксидазе.

Для этого были предварительно разработаны высокочувствительные тесты для определения антител к тиреоглобулину и тереопроксидазе, используя иммуноферментный анализ (ИФА) с различными системами детекции. Биспецифичность антител в образцах поликлональных (ПкАт) и моноклонаальных (МкАт) изучали в ИФА в различных модификациях, применяя препараты ТГ, ТПО и антител в оптимально подобранных концентрациях. Для всех вариантов ИФА использовали планшеты, иммобилизованные ТПО/ТГ или антителами в диапазоне концентраций 1,0 - 5,0 мкг/мл.

В результате анализа данных было обнаружено формирование биспецифических АТ при иммунизации кроликов, мышей ТГ (ТПО) в экспериментах. В заключение, следует отметить, что возможна индукция АТ на введенный антиген, сопровождающаяся повреждением щитовидной железы по типу аутоиммунной реакции, с последующим синтезом АТ к ТПО (ТГ).

Литература.
1. Rapoport B, MacLachlan, 2001 2. Kohno Y. et al, 1988, Naito N. et al., 1990, Ruf J. et al., 1993, Trasyvolides A., Lymberi P., 2004, Wenli Li et al. 2014

Финансирование: Российский Университет Дружбы Народов (Институт биохимической технологии и нанотехнологии)

HIGHLY SENSITIVE METHODS OF STUDY OF AUTOANTIBODIES AND IMMUNE RESPONSES IN AUTOIMMUNE DISEASES OF THE THYROID GLAND

A.Stoinova[1], Y.Stanishevskiy[1], A.Zubkov[2]

[1] RUDN University (Peoples, Russia, 117198, Moscow, Miklukho-Maklay, 6
[2] Research Institute of Vaccines and Serums I.I. Mechnikov, Russia, 105064, Moscow, Small Kozenyi lane, 5/17

In this study, we carried out a study on the bispecific autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase. Highly sensitive tests have been developed for detecting antibodies to thyroglobulin and tereoproksidaze using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with different detection systems.

Key words: antibodies, autoimmune diseases, thyroglobulin, thyroid peroxidase

One of the first manifestations of autoimmune disease are autoantibodies detected in the serum of the blood of patients before to detect a clinically diagnosable symptoms. When autoimmune thyroid pathology major antigens to which there is a formation of antibodies are thyroglobulin (TG), thyroid peroxidase (TPO) and thyroid-stimulating hormone (rhTSH) receptor [1].

Several studies have shown that the autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase recognize a common antigenic determinants and antibodies can exist (AT) having bispecific against these antigens [2]. However, in some studies it was found polireactivity of human monoclonal antibodies, rather than bispecific antibodies to Tg and TPO, but these data were obtained by the authors in the analysis of material obtained from one patient.

The aim is to carry out investigations on the bispecific autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase.

To do this it has been previously developed highly sensitive tests for the detection of antibodies to thyroglobulin and tereoproksidaze using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with different detection systems. bispecific antibodies in polyclonal samples (PkAt) and monoklonaalnyh (MAbs) were studied in the EIA in different modifications, using TG drugs and TPO antibodies optimally selected concentrations. For all embodiments used ELISA plates immobilized TPO / or TG antibodies in a concentration range of 1.0 - 5.0 g / ml.

As a result of analysis it has been found the formation of bispecific antibodies by immunization of rabbits, mice, Tg (TPO) in the experiments. In conclusion, it should be noted that the possible induction of antigen administered on AT accompanied by damage to thyroid autoimmunity type, followed by synthesis of antibodies to TPO (TG).

References:
1. Rapoport B, MacLachlan, 2001 2. Kohno Y. et al, 1988, Naito N. et al., 1990, Ruf J. et al., 1993, Trasyvolides A., Lymberi P., 2004, Wenli Li et al. 2014

Grant: RUDN University (Peoples' Friendship University of Russia), Institute of biochemical technology and nanotechnology

.....

УДК: 615.076.7+574.24, ББК:

ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИЙ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ НА БИОДОСТУПНОСТЬ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

К.В.Сюндюкова, Е.Д.Дмитриева

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Россия, 300012, Тула, пр. Ленина, 92, kristina-syundyukova@yandex.ru, +79190710550

Фракции гуминовых веществ торфов, не зависимо от происхождения, проявляют детоксицирующее действие по отношению к ионам тяжелых металлов. Максимальный прирост биомассы дрожжей D. hansenii ВКМ Y-2482 в присутствии Zn(II) наблюдается при концентрации фракций 100 - 125 мг/л.

Ключевые слова: фракция гуминовых веществ, инактивация тяжелых металлов, Debaryomyces hansenii

Гуминовые вещества являются основным компонентом окружающей среды, на их долю приходится 60-80% органического вещества почв и торфов. Повсеместное распространение гуминовых веществ оказывает существенное влияние на биологические системы, в том числе на микроорганизмы и их толерантность к экотоксикантам. Отличительной особенностью гуминовых веществ, как природных полимеров, является полидисперсность. Фракции с различными молекулярными массами, способны проявлять стимулирующий и ингибирующий эффект на рост микроорганизмов. В связи с этим актуальной задачей является изучение влияния фракций гуминовых веществ на рост микроорганизмов в присутствии тяжелых металлов.

Объектами следования являлись фракции гуминовых веществ черноольхового низинного (ЧНТ)

и сфагнового переходного (СПТ) торфов, полученные методом дробного осаждения [1], а модельным токсикантом - ионы Zn(II). В качестве тест-объектов выбраны, ранее не тестируемые, дрожжи DebaryomyceshanseniiВКМ Y-2482. Биологическое действие на клетки микроорганизмов анализировали в диапазоне концентраций фракций 25–150 мг/л. Тест-параметром служил выход биомассы микроорганизмов. Время культивирования 24 часа.

Максимальное увеличение выхода биомассы выбранного штамма (в 1,3-1,5 раза относительно контроля) при концентрации в культуральной среде 50 мг/л фракции гуминовых веществ независимо от их происхождения. При концентрации фракций выше 100 мг/л наблюдается угнетение роста микроорганизмов, прирост биомассы дрожжей ниже контроля. Уменьшение биомассы дрожжей при высоких концентрациях, что объясняется образованием полимолекулярного слоя на поверхности клеток,который препятствует поступлению питательных веществ в клетку, тем самым нарушая обмен веществ.

Токсицирующее действие ионов Zn(II) на клетки микроорганизмов D. hanseniiВКМ Y-2482 исследовали в диапазоне концентраций: 50-1000 мг/л. При 150 мг/л наблюдалось снижение роста дрожжей на 48-50%, что является наиболее подходящим условием для дальнейшего изучения детоксицирующих свойств фракций ГВ.

Фракций гуминовых веществ при концентрациях 25-50 мг/л оказывают минимальные действие на рост биомассы дрожжей в присутствии ионов Zn(II), максимальная инактивация токсичного действия ионов цинка наблюдается при концентрации фракций 100 и 125 мг/л.

Фракции гуминовых веществ, не зависимо от происхождения, проявляют детоксицирующее действие по отношению к ионам Zn(II). Максимальный прирост биомассы микроорганизмов в присутствии ионов металла наблюдается при концентрации фракций гуминовых веществ 100 - 150 мг/л. Детоксицирующий эффект проявляется в связывании токсиканта как в растворе, так и на фракциях сорбированных на поверхности клеток микроорганизмов, с последующей десорбцией нерастворимых комплексов токсикант-детоксикант в раствор.

Фракции гуминовых веществ, не зависимо от происхождения, проявляют детоксицирующее действие по отношению к ионам Zn(II). Максимальный прирост биомассы микроорганизмов в присутствии ионов металла наблюдается при концентрации фракций гуминовых веществ 100 - 150 мг/л. Детоксицирующий эффект проявляется в связывании токсиканта как в растворе, так и на фракциях сорбированных на поверхности клеток микроорганизмов, с последующей десорбцией нерастворимых комплексов токсикант-детоксикант в раствор.

Литература.
1. Siundiukova K.V. et al. Sorption ability of humic substances from different origin peats of the Tula region in relation to Pb(II) //Сорбционные и хроматографические процессы. – 2016. – Т. 16. – № 6. – С. 788-796.

INFLUENCE FRACTIONS OF HUMIC SUBSTANCES ON THE BIOAVAILABILITY OF HEAVY METALS

K.Siundiukova, E.Dmitrieva

Tula State University, Russia, 300012, Tula, prosp. Lenina , 92

The detoxifying effect of fractions to heavy metal ions doesn't depend on their origin. Maximum microbial biomass growth of yeast D. hansenii VKM Y-2482 in the presence of Zn(II) is observed at concentrations of fractionated humic substances 100-125 mg/L.

Key words: the fraction of humic substances, heavy metal inactivation, Debaryomyces hansenii

Humic substances are a major component of the environment. They account for 60-80% of organic matter soil and peat. The ubiquity of humic substances has a significant impact on biological systems, including microorganisms and their tolerance to toxicants. Humic substances are natural polymers, they are polydisperse. Fractions with different molecular weights demonstrate a stimulating and inhibitory effect on the growth of microorganisms. In that regard, the study of influence of the fractions of humic substances on growth of microorganisms in the presence of heavy metals is urgent task.

The objects of study were taken fractions of humic substances from peat eutrophic – formed by black Alder and mesotrophic – formed by Sphagnum. The fractions of HS were obtained by a fractional precipitation technique [1]. Zinc ions were selected as a model toxicant. Yeast Debaryomyces hansenii VKM Y-2482 were used as test object,

yeasts have not been previously tested. Test solutions contained from 25 to 150 mg L-1 of fractions. Biological parameter such as microbial biomass was used as indicators of biological activity. Cultivation time was 24 hours.

Maximum of microbial biomass was observed in the presence of solution containg 50 mg L-1 of fractions. Output of microbial biomass was increased 1.3- and 1.5-fold compared with the control. Output of microbial biomass do not depend on origin of humic substances. Inhibiting the growth of microorganisms was observed at concentrations above 100 mg L-1. Yeast biomass was below control. Reducing the yeast biomass at high concentrations is explained the formation of polymolecular layer on the surface of cells. The polymolecular layer impedes the flow of nutrients into the cell, thereby disrupting metabolism.

The Influence of toxic effect on the yeast of D. hansenii VKM Y-2482 was studied in the concentration range of Zn(II) from 50 to 1000 mg L-1. The decrease the growth of yeast at 48-50% was discovered at concentration 150 mg L-1, that is the most suitable condition for further study detoxifying properties of HS fractions.

Fractions of humic substances have minimal impact on the growth of yeast biomass at concentrations range from 25 to 50 mg L-1 in the presence of Zn(II). Maximum inactivation of toxic effect of zinc ions was observed at concentration of fractions 100 and 125 mg L-1.

Fractions of humic substances have a detoxifying effect in relation to ions of Zn(II), the detoxifying effect do not depend on origin of fractions. Maximum growth of yeast biomass in the presence of metal ions was observed at a concentration of fractions 100 - 150 mg L-1. The detoxifying effect appear in the binding in the toxicant in the solution and with sorbed fractions on the surface of microbial cells, then complex detoxicant-toxicant was desorbed in solution.

Fractions of humic substances have a detoxifying effect in relation to ions of Zn(II), the detoxifying effect do not depend on origin of fractions. Maximum growth of yeast biomass in the presence of metal ions was observed at a concentration of fractions 100 - 150 mg L-1. The detoxifying effect appear in the binding in the toxicant in the solution and with sorbed fractions on the surface of microbial cells, then complex detoxicant-toxicant was desorbed in solution.

References:
1. Siundiukova K.V. et al. Sorption ability of humic substances from different origin peats of the Tula region in relation to Pb(II) //Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protsessy – 2016. – T. 16. – № 6. – C. 788-796.

УДК: 579.66+547.597, ББК: 24.8

МЕХАНИЗМ СИНТЕЗА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕТУЛИНА НА ОСНОВЕ RHODOCOCCUS RHODOCHROUS ИЭГМ 66

Е.В.Тарасова[1], В.В.Гришко[2], И.Б.Ившина[3]

[1]Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Россия, 614081, Пермь, ул. Голева, 13, ekaterina.tarasova.87@mail.ru, (342)2808114
[2]Институт технической химии УрО РАН, Россия, 614013, Пермь, ул. Акад. Королева, 3, grishvic@gmail.ru, (342)2378265
[3]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 614099, Пермь, ул. Букирева, 15, ivshina@iegm.ru, (342)2808114

Исследованы закономерности взаимодействия родококков с бетулином, а также возможные пути его транспорта в бактериальную клетку и локализация ферментов, катализирующих окисление бетулина. Установлено влияние бетулина на жирнокислотный состав, а также морфометрические и морфофункциональные характеристики родококков.

Ключевые слова: бетулин, региоселективное окисление, Rhodococcus rhodochrous ИЭГМ 66, фармакологически значимые соединения

Биотрансформация полициклических терпеноидов с использованием микроорганизмов – эффективный способ одностадийного получения биологически активных соединений с высокой степенью регио- и стереоселективности [1]. Показана способность Rhodococcus rhodochrous ИЭГМ 66 к селективному окислению вторичной гидроксильной группы бетулина с образованием бетулона. Бетулон обладает выраженным (IC50 3,0 μM) противомалярийным действием [2] и перспективен в качестве интермедиата в синтезе противоопухолевых агентов [3]. Исследованы особенности взаимодействия родококков с гидрофобным тритерпеновым субстратом, возможные пути транспорта бетулина в бактериальную клетку и локализация ферментов, катализирующих окисление бетулина. С использованием совмещенной системы сканирования, включающей атомно-си-

ловой и конфокальный лазерный сканирующий микроскопы, проведено углубленное исследование процесса взаимодействия родококков с бетулином. Установлено, что родококки в присутствии бетулина характеризуются образованием гетерогенных клеточных агрегатов. Бактериальные клетки в составе агрегатов сохраняют высокий (более 80%) уровень жизнеспособности. Выявлено выраженное увеличение степени шероховатости поверхности родококков в присутствии бетулина. Экспериментально подтверждено, что процесс взаимодействия родококков с бетулином протекает путем прямого контакта бактериальных клеток с частицами тритерпенового субстрата, предположительно, в участках локализации адгезинов.

Обнаружена прямая зависимость между содержанием суммарных клеточных липидов, концентрацией бетулина и продолжительностью процесса. Выявленные особенности обеспечивают не только сохранение жизнеспособности родококков на высоком уровне, но и их каталитической активности (до 75%) в отношении бетулина. На основе полученного бетулона синтезированы новые тритерпеновые производные с выраженной противоопухолевой активностью.

По данным проведенных исследований разработан общий алгоритм процесса взаимодействия родококков с бетулином. Показано, что в результате действия неспецифических физико-химических сил образуются гетерогенные агрегаты из клеток и частиц бетулина, в дальнейшем происходит растворение адсорбированного бетулина в липидах клеточной стенки родококков, транспорт бетулина через цитоплазматическую мембрану и ферментативное окисление бетулина с образованием бетулона.

Литература.
1. Shah S.A., Tan H.L., Sultan S., Faridz M.A., Shah M.A., Nurfazilah S., Hussain M., Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients//Int. J. Mol. Sci. 2014. Vol. 15. № 7. P. 12027–12060. 2. Gachet M.S., Kunert O., Kaiser M., Brun R., Zehl M., Keller W., Muñoz R.A., Bauer R., Schuehly W. Antiparasitic compounds from Cupania cinerea with activities against Plasmodium falciparum and Trypanosoma bruceirhodesiense//J. Nat. Prod. 2011. Vol. 74. № 4. P. 559–566. 3. Koohang A., Majewski N.D., Szotek E.L., Mar A.A., Eiznhamer D.A., Flavin M.T., Xu Z.Q. Synthesis and cytotoxicity of 2-cyano-28-hydroxy-lup-1-en-3-ones//Bioorg. Medic. Chem. Lett. 2009. Vol. 19. № 8. P. 2168–2171.

Финансирование: Работа выполнена в рамках расширенного госзадания по биоресурсным коллекциям институтов ФАНО и Комплексной программы Уральского отделения Российской академии наук

MECHANISM OF SYNTHESIS OF PHARMACOLOGICALLY VALUABLE BETULIN DERIVATIVES USING RHODOCOCCUS RHODOCHROUS IEGM 66

E.Tarasova[1], V.Grishko[2], I.Ivshina[3]

[1]*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, 614081, Perm, Golev Str., 13*
[2]*Institute of Technical Chemistry, the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia, 614013, Perm, Ak. Korolev Str., 3*
[3]*Perm State National Research University, Russia, 614099, Perm, Bukirev Str., 15*

Interactions between rhodococci and betulin, possible ways of its transport into a bacterial cell, and localization of enzymes responsible for betulin oxidation were revealed. The effects of betulin on fatty acid composition of rhodococci and their morphometric and morphofunctional characteristics were studied.

Key words: betulin, regioselective oxidation, Rhodococcus rhodochrous IEGM 66, pharmacologically valuable compounds

Bacterial transformation of polycyclic terpenoids by microorganisms is an efficient method for single-stage production of biologically active compounds with high regio- and stereoselectivity [1]. The ability of Rhodococcus rhodochrous IEGM 66 to selective oxidation of the betulin secondary hydroxyl group resulting in betulone was shown. Betulone has a marked antimalarial action (IC50 3.0 μM) [2] and is a useful intermediate in the synthesis of antitumor agents [3]. Interactions between rhodococci and a hydrophobic triterpene betulin, possible ways of betulin transport into bacterial cells, and localization of enzymes responsible for betulin oxidation were studied. A detailed study on rhodococci and betulin interactions was performed using a combined system of scanning probe microscopy, including atomic force and confocal laser scanning microscopes. The formation of heterogeneous aggregates consisting of rhodococci and betulin particles was observed. The bacterial cells in aggregates have a high (up to 80.0%) level of viability. An increased surface roughness of rhodococci in the presence of betulin

was found. Our findings are an experimental evidence that rhodococci interact with betulin via direct contact, presumably in sites of adhesin localization.

A direct correlation between the total content of cellular lipids, betulin concentration and biotransformation duration was found. The detected features provide not only high level of cell viability, but also their catalytic activity (75%) towards betulin. The new triterpene derivatives with marked antitumor activities were synthesized using the obtained betulone.

Based on our findings, an algorithm of the interactions between rhodococci and betulin has been proposed. Due to non-specific physical and chemical forces, heterogeneous aggregates of bacterial cells and betulin particles are formed followed by the dissolution of adsorbed betulin in the cell wall lipids and its transport across the cytoplasmic membrane into a cell, and enzymatic oxidation of betulin to betulone.

References:
1. Shah S.A., Tan H.L., Sultan S., Faridz M.A., Shah M.A., Nurfazilah S., Hussain M., Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients//Int. J. Mol. Sci. 2014. Vol. 15. № 7. P. 12027–12060. 2. Gachet M.S., Kunert O., Kaiser M., Brun R., Zehl M., Keller W., Muñoz R.A., Bauer R., Schuehly W. Antiparasitic compounds from Cupania cinerea with activities against Plasmodium falciparum and Trypanosoma bruceirhodesiense//J. Nat. Prod. 2011. Vol. 74. № 4. P. 559–566. 3. Koohang A., Majewski N.D., Szotek E.L., Mar A.A., Eiznhamer D.A., Flavin M.T., Xu Z.Q. Synthesis and cytotoxicity of 2-cyano-28-hydroxy-lup-1-en-3-ones//Bioorg. Medic. Chem. Lett. 2009. Vol. 19. № 8. P. 2168–2171.

Grant: The research was supported by the extended state task on bioresource collections of FASO institutes and the Integrated Program of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

.....

УДК: 615.322 , ББК:

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ LYCOPUS EUROPAEUS L.

А.И.Тарусова, А.А.Рыбалко, А.Е.Рыбалко

Сочинский институт (филиал) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов», Россия, 354348, Сочи, ул. Куйбышева, 32, rybaser@mail.ru, 8-9996578958

Изучали условия получения больших партий лекарственного растения Lycopus europaeus L. Действующие вещества этого растения эффективны при лечении различных заболеваний в т.ч. и базедовой болезни. С целью разработки методики выращивания этого растения в контролируемых условиях изучали режимы введения в культуру in vitro. Семена собирали на территории научно-исследовательского института медицинской приматологии РАМН в Адлерском районе г. Сочи. Отработана методика проращивания семян и введения в культуру in vitro. При выращивании в ростовой камере со светодиодным освещением достигнут коэффициент размножения 11,7 ± 4,5 шт. за 30 дневный период, что важно для получения больших партий однородного посадочного материала в короткие сроки с целью создания промышленных насаждений.

Ключевые слова: Lycopus europaeus L., базедова болезнь, тахикардия, микроразмножение

Lycopus europaeus L. (зюзник европейский. семейство губоцветные) широко распространен в средней полосе России и на Кавказе. Настои из травы зюзника европейского по рекомендациям народной медицины применяют в качестве противовоспалительного, общеукрепляющего, болеутоляющего средства, для лечения базедовой болезни, снижения повышенного артериального давления и устранения тахикардии.Растение обладает противолихорадочным, кровоостанавливающим, сердечно-сосудистым и сильным успокаивающим действием.

Из массы этого растения выделены фенольные соединения: этиловый эфир кофейной кислоты, протокатеховый альдегид, 5,3¢,4¢-тригидрокси-6,7-диметоксифлавон, апигенин, этиловый эфир апигенин-7-глюкуронида, лютеолин, метиловый эфир лютеолин-7-глюкуронида, этиловый эфир лютеолин-7-глюкуронида, кофейную кислоту, розмариновую кислоту, метиловый эфир розмариновой кислоты. Сумма фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту и абсолютно сухой экстракт зюзника европейского составила 3,5% (Шелухина, Н.А., 2012).

В наших исследованиях семена зюзника европейского собирали на территории института медицинской приматологии РАМН в селе Гумария Адлерского р-на г Сочи. Семена замачивал в растворе дистил-

лированной воды с твин-20 (1:005) и проращивали в вермикулите. Проросло 82,9% .

Нодальные экспланты проростков стерилизовали в 10 и 20% растворе белизны (5% гипохлорита натрия) в течение 20 мин. Получено 38,2% стерильных культур в варианте с 10% белизны и 77,3% в варианте с 20%. Культуры выращиваются в ростовой камере со светодиодным освещением (красные 660 нм+ синие 440 нм светодиоды). Коэффициент размножения при первичном введении в культуру in vitro в течение 30 дней, составил 11,7±4,5 шт.

1. Прорастание семян Lycopus europaeus L составило 82,9% 2. При стерилизации в 20% растворе доместас Lycopus europaeus L. получено 77,3% стерильных культур. 3. Коэффициент размножения в течение 30 дней составил 11,7 ± 4,5 шт.

Литература.
Шелухина, Н.А. Изучение метаболома зюзника европейского (Lycopus europaeus L.) и разработка субстанции тиреотропного действия. Автореферат дисс. канд. биол. наук. Москва 2012. 26 с.

MICROPROPAGATION OF MEDICAL PLANT LYCOPUS EUROPAEUS L.

A.Tarusova, A.Rybalko, A.Rybalko

Sochi branch of Peoples' Friendship University of Russia, Russia, 354348, Sochi, Kuibisheva Str., 32,

We studied the conditions for obtaining large quantities of medicinal plants Lycopus europaeus L. The active ingredients of the plant are effective in the treatment of various diseases including and Graves' disease. In order to develop this method of growing plants in a controlled environment administration regimes studied in in vitro culture. Seeds collected in the territory of the Research Institute of Medical Primatology RAMS in the Adler district of Sochi. The technique of germinating seeds and the introduction of an in vitro culture. When grown in a growth chamber with LED lighting will reach multiplication factor of 11,7 ± 4,5 pc. 30 day period, it is important to obtain large quantities of uniform planting material in a short time in order to create industrial plants.

Key words: Lycopus europaeus L., hyperthyroidism, tachycardia, micropropagation

Lycopus europaeus L. (family Labiatae) is widespread in central Russia and in the Caucasus. Herbal infusions of Lycopus europaeus L. according to the recommendations of traditional medicine are used as an anti-inflammatory, tonic remedy, painkiller, for Basedow's disease treatment, high blood pressure decrease and elimination of tachycardia. The plant has antifebrific, styptic, cardiovascular and strong soothing effect.

Phenolics are extracted from this plant: ethyl ether of caffeic acid, protocatechuic aldehyde, 5,3¢,4¢-threehydroxy-6,7-dimethoxyflavone, apigenin, apigenin-7-glucuronide ethyl ether, luteolin, luteolin-7-glucuronide methyl ether, caffeic acid, rosmarinic acid, rosmarinic acid methyl ether. The sum of phenolics in terms of rosmarinic acid and absolutely dry extract of Lycopus europaeus L. is 3,5% (Shelukhina, N.A., 2012).

In our research Lycopus europaeus L. seeds were collected on the territory of

Medical Primatology Institute of RAMN (Gumaria village, Adler district, Sochi). Seeds were drenched in distilled water solution with twin-20 (1:005) and grown in vermiculite.82,9% of them were grown.

Seedlings' nodal explants were sterilized in 10 and 20% solution of white (5% sodium hypochlorite) for 20 minutes. It is obtained 38,2% sterile cultures in 10% white option and 77,3% in 20% white option.

Crops are grown in growth chamber with LED lighting (red 600 nm+ blue 440 nm LED). Reproduction ratio in the primary introduction of in vitro culture for 30 days, amounted to 11,7 ± 4,5 pc.

1.Germination Lycopus europaeus L was 82.9%. 2.When the sterilization in 20% domestas Lycopus europaeus L. solution obtained 77.3% sterile cultures. 3.Multiplication factor for 30 days amounted to 11,7 ± 4,5 pc.

References:
Shelukhina, N.A. The study of Lycopus europaeus L. metabolome and design of thyroid stimulating action substance. Abstract of diss. cand. biol. Sciences. Moscow, 2012. 26 pp.

УДК: 577.114.7:577.352.2:616-006, ББК: 28.072

СОСТОЯНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМ, НАГРУЖЕННЫХ ЛИПОФИЛЬНЫМ ПРОЛЕКАРСТВОМ МЕЛФАЛАНА, В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Д.С.Третьякова, Е.Л.Водовозова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10, daria@lipids.ibch.ru, 89169367849

Получены дисперсии липосом (d~100нм), состоящих из природного фосфатидилхолина, диглицеридного сложноэфирного конъюгата мелфалана и различных стабилизирующих компонентов. Исследована устойчивость в плазме крови, а также вероятность возникновения острых инфузионных реакций.

Ключевые слова: липосомы, плазма крови, стабильность, липофильные пролекарства, мелфалан, система комплемента

При контакте с плазмой крови липосомы, как и другие наночастицы, быстро покрываются белками и липопротеинами. Специфическая белковая «корона» определяет поведение наноносителя в кровотоке и, в итоге, - фармакокинетику и биораспределение инкапсулированного лекарства [1]. Кроме того, потенциально все наночастицы, построенные из неиммуногенных изначально молекул, из-за опсонизации белками системы комплемента (СК) подвергаются действию врожденной иммунной системы. Введение наномедицинских препаратов часто вызывает острые инфузионные реакции (ОИР) различной степени тяжести [2]. Взаимодействия белков плазмы с наноносителем зависят от природы и структуры его поверхности, распределения на ней зарядов и функциональных групп.

В данной работе получены 100-нм-липосомы из яичного фосфатидихолина, несущие в липидном бислое липофильное пролекарство противоопухолевого препарата мелфалана Mlph-DG(диглицеридный сложноэфирный конъюгат) и различные стабилизирующие компоненты, в том числе фосфатидилинозит (PI), ПЭГ2000-диолеоилфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-липид), ганглиозид GM1 и конъюгат диолеоилфосфатидилэтаноламина с COOH-олигопептидом (пептидолипид). Стабильность липосом в плазме invitroизучали с помощью мониторинга разгорания флуоресценции кальцеина, заключенного во внутренний водный объем липосом в самозатушенной концентрации, а также с помощью метода резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) между донорно-акцепторной парой флуорофоров в липидном бислое [3]. Включение ПЭГ-липида не увеличивало стабильность жидкого липидного бислоя и не защищало от сорбции белков: последовательные всплески и затухания флуоресценции кальцеина могли свидетельствовать об образовании ПЭГ-мицелл с компонентами бислоя. Липосомы с другими защитными молекулами в составе бислоя в течение 5 ч контакта с плазмой сохраняли высокую стабильность, причем в случае GM1 и пептидолипида липосомы были стабильны вплоть до 24 ч инкубации, и последний в наибольшей степени уменьшал сорбцию белков.

Взаимодействия липосом с важнейшими компонентами СК и аполипопротеинами исследовали методом иммуноблоттинга. Для этого липосомы с Mlph-DG, содержащие PI или ПЭГ-липид, после инкубации в плазме выделяли с помощью гель-хроматографии, делипидизировали и анализировали с помощью электрофореза в ПААГ с Ds-Na. Среди связанных белков, кроме альбумина и фибриногена, были идентифицированы АпоAI, АпоE и центральный компонент СК белок C3, а также регуляторные белки фактор H и C4BP. Связывание АпоAI с липосомами было незначительным, следовательно, этот белок не участвует в их выводе из кровотока. Напротив, концентрирование АпоE означает, что липосомы могут активно поглощаться клетками опухолей, которые повышенно экспрессируют рецепторы липопротеинов низкой плотности для потребления структурных липидов. Фрагментации субъединиц C3 не наблюдалось, то есть активация СК по альтернативному пути не происходило. Фактор H инактивирует каскад СК, а белок C4BP ингибирует классический и лектиновый пути его активации. Таким образом, липосомы с Mlph-DG не активируют СК ни по одному из возможных путей и вероятность развития ОИР минимальна.

Липосомы с Mlph-DG не активируют СК ни по одному из возможных путей и вероятность развития ОИР минимальна.

Литература.
1 S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and T. L. Andresen Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2012. Vol. 52. P. 481-503. 2 J. Szebeni, F. Muggia, A. Gabizon,

Y. Barenholz. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2011. V. 63. P. 1020-1030. 3 А. С. Алексеева, Д. С. Третьякова, Д. Н. Мельникова, Юл. Г. Молотковский, И. А. Болдырев Новый флуоресцентный мембранный зонд (2,3;5,6 бисциклогексил)bodipy меченный фосфатидилхолин // Биоорг. Хим. - 2016. - Т. 42. №. 3. - С. 339–344.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-04-01585)

FATE OF ANTITUMOR LIPOSOMES LOADED WITH LIPOPHILIC PRODRUG OF MELPHALAN IN HUMAN BLOOD PLASMA

D.Tretiakova, E.Vodovozova

Federal state budgetary scientific institution M. M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Russian Federation, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya, 16/10

Liposomal formulations were prepared from natural phosphatidylcholine, dioleoilglycerol conjugate of melphalan and different protecting components.Then its stability in human plasma and probability of causing complement activation related pseudoallergy were assayed.

Key words: liposomes, blood plasma, stability, lipophilic prodrugs, melphalan, complement

Liposomes like other nanoparticles became covered with proteins and apolipoproteins very rapidly upon contacts with blood plasma. Specific protein corona designates nanoparticle behavior in blood stream, and eventually influences pharmacokinetics and biodistribution of the encapsulated drug [1]. Besides, potentially all nanoparticles, consisted from nonimmunogenic molecules, could undergo the effect of innate immunity because of opsonization by complement proteins. Nanomedical injection often leads to complement activation related pseudoallergy (CARPA) reactions from not very serious to lethal [2]. Protein- nanoparticle interactions depend on nature, surface structure, charge and functional group distribution.

In this work, 100 nm liposomes were designed consisting of nature phosphatidylcholine, loaded with dioleoylglycerol ester melphalan (chemotherapeutic alkylating agent) conjugate (Mlph-DG) and different protecting amphiphilic conjugates as phosphatidilinozitol (PI), PEG2000-dioleoylphosphatidylethanolamine (PEG-lipid), ganglioside GM1 and dioleoylphosphatidylethanolamine COOH-oligopeptide conjugate (lipopeptide). Liposome stability in plasma in vitro was evaluated by the fluorescence increase detection upon encapsulated selfquenched calcein leakage or disruption of Forster resonance energy transfer (FRET) between donor-acceptor fluorescent pair in lipid bilayer [3]. Incorporation of PEG-lipid does not insrease sample stability and does not reduce protein binding. We observed unexpected significant burst in calcein leakage even in buffer followed by a quenching over a long time incubation. Such behaviour could possibly be interpreted as PEG-micelle formation which entraps nearby molecules of calcein, however the event does not cause bilayer destruction. Formulations with other protecting molecules in the bilayer were stable in plasma for 5 hours, furthermore liposomes with GM1 and lipopeptide prevented calcein release almost for 24 hours, and the latter formulations drastically reduce protein absorption.

Liposome interactions with crucial complement components and apolipoproteins were studied by the Western blot analysis. After the incubation in blood plasma, formulations with Mlph-DG and PI / PEG-lipid were subjected to gel chromatography, lipid extraction,and then analyses by electrophoresis in PAA gel with Ds-Na. Among the associated proteins, exept albumin and fibrinogen, we identified ApoAI, ApoE, main complement component C3, and components with regulatory functions — factor H, C4bp. ApoAI association was insignificant, hence that apolipoprotein do not influence liposome clearance from bloodstream. On the contrary, ApoE accumulation on liposomes could be considered as a stimulus for uptake by tumor cells which overexpress low density lipoprotein receptors for structural lipids metabolism. Fragmentation of C3 was not observed, and that is the evidence for the absence of alternative pathway activation. Factor H inactivates complement cascade and C4bp is the inhibitor for classical and lectin pathways. To summarise, liposomes with Mlph-DG do not cause complement activation by all pathways, and can be characterized as formulations with low probability of CARPA occurrence.

Liposomes with Mlph-DG do not cause complement activation by all pathways, and can be characterized as formulations with low probability of CARPA occurrence.

References:
1 S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and T. L. Andresen Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2012. Vol. 52. P. 481-503. 2 J. Szebeni, F. Muggia, A. Gabizon, Y. Barenholz. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic

products: prediction and prevention // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2011. V. 63. P. 1020-1030. 3. A. Alekseeva, D. Tretiakova, D. Melnikova, Ul. Molotkovsky and I. Boldyrev Novel fluorescent membrane probe 2,3;5,6-bis(cyclohexyl)-BODIPY-labeled phosphatidylcholine // Bioorg. Chem. 2016. V. 42. №. 3. P. 339-344.

Grant: This work was supported by Russian Foundation for Basic Research grant № 16-04-01585.

УДК: 579.66, ББК:

ПЕРСПЕКТИВЫ БИОКОНВЕРСИИ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ BRASSICA OLERACEA

А.В.Тур, П.С.Толоконин, Д.В.Баурин, И.В.Шакир, В.И.Панфилов

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Россия, 125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, 20, tur.alexandra96@gmail.com, +7-915-398-30-80

Данное исследование направлено на изучение перспектив повышения биологической ценности продуктов промышленной переработки брокколи (лат. Brassica oleracea var. italica) для получения растительной углеводно-белковой кормовой добавки, обогащённой микробным белком.

Ключевые слова: брокколи, переработка растительного сырья, биоконверсия, культивирование микроорганизмов

Использование вторичного растительного сырья в качестве источника питательных соединений позволяет получать биологические активные компоненты с высокой добавленной стоимостью. Брокколи (лат. Brassica oleracea var. italica) овощ семейства Brassicaceae, как продукт имеет большую ценность в связи с высоким содержанием в его составе биологически активных фитохимических соединений таких как глюкозинолаты, изотиоцианаты, хлорогеновая кислота, флавоноиды, а также витамины С, А, Е, минеральные компоненты (калий, натрий, фосфор, железо, кальций). В последние годы потребление брокколи в значительной степени возросло благодаря благоприятному воздействию этого продукта на здоровье человека. Так например, брокколи рекомендуется для профилактики онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [1–4]. В ранее проведённых исследованиях были показаны перспективы биологической конверсии таких вторичных растительных продуктов как свекловичный жом, клубни топинамбура, подсолнечный шрот [5–7]. Вторичные продукты семейства Brassicaceae были использованы для выделения антиоксидантов [8], флавоноидов [9]. Водные экстракты брокколи используются для изготовления антимикробных препаратов, содержащих наночастицы золота [10]. Известна информация о понижении жирности молока при кормлении крупнорогатого скота смесью, содержавшей концентраты моркови, люцерны и брокколи [11].

Целью данного исследования было изучение перспектив повышения биологической ценности вторичных продуктов промышленной переработки брокколи – зелёной массы (ботва, стебли, листья, некондиционные соцветия) и получение растительной углеводно-белковой кормовой добавки. Изучен биохимический состав зелёной массы брокколи, определено содержание клетчатки, жира, сырого протеина, а также методами ВЭЖХ проведён анализ углеводного состава сока брокколи. Предложены варианты предварительной обработки растительного сырья для получения питательной среды, подобраны культуры микроорганизмов. Проведено глубинное гетерофазное и твердофазное культивирование штаммов дрожжей Saccharomyces cerevisiae и Yarrowia lipolytica на питательных средах с различным минеральным составом.

Изучен биохимический состав зелёной массы брокколи, определено содержание клетчатки, жира, сырого протеина, а также методами ВЭЖХ проведён анализ углеводного состава сока брокколи. Предложены варианты предварительной обработки растительного сырья для получения питательной среды, подобраны культуры микроорганизмов. Проведено глубинное гетерофазное и твердофазное культивирование штаммов дрожжей Saccharomyces cerevisiae и Yarrowia lipolytica на питательных средах с различным минеральным составом.

Литература.
1. Moreno D.A. et al. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli // J. Pharm. Biomed. Anal. Elsevier, 2006. Vol. 41, № 5. P. 1508–1522. 2. Domínguez-Perles R. et al. Broccoli-Derived By-Products—A Promising Source of Bioactive Ingredients // J. Food Sci. Wiley Online Library, 2010. Vol. 75, № 4. P. C383–C392. 3. Redman C.T.P. Factors affecting the composition and quality of broccoli juice. MSc Thesis, 2009. 4. Talalay P., Fahey J.W. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism // J. Nutr. Am Soc Nutrition, 2001. Vol. 131, № 11. P. 3027S–3033S. 5. Шакир И.В. et al. Способ получения белковой кормовой

добавки. 2006. № 19. P. 1–5. 6. Кареткин Б.А. et al. Переработка клубней топинамбура с получением фруктанов и пробиотического продукта для животных // Биотехнология реальность и перспективы в сельском хозяйстве. 2013. P. 229–230. 7. Баурин Д.В. et al. Факторный эксперимент для оптимизации условий предварительной обработки питательной среды // Фундаментальные исследования. 2014. № 11. P. 13–19. 8. Llorach R. et al. HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (Brassica oleracea L. v ar. botrytis) agroindustrial byproducts // J. Agric. Food Chem. ACS Publications, 2003. Vol. 51, № 13. P. 3895–3899. 9. Harbaum B. et al. Identification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Pak Choi Varieties (Brassica campestris L. ssp. chinensis var. communis) by HPLC–ESI-MS n and NMR and Their Quantification by HPLC–DAD // J. Agric. Food Chem. American Chemical Society , 2007. Vol. 55, № 20. P. 8251–8260. 10. Piruthiviraj P., Margret A., Krishnamurthy P.P. Gold nanoparticles synthesized by Brassica oleracea (Broccoli) acting as antimicrobial agents against human pathogenic bacteria and fungi // Appl. Nanosci. Springer, 2016. Vol. 6, № 4. P. 467–473. 11. Losada H., Cortés J., Grande D. El uso de hortalizas en la producción de leche en sistemas suburbanos // Livest. Res. Rural Dev. 1992. Vol. 4, № 3. P. 15–19.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках базовой части государственного задания, проект № 1294.

BRASSICA OLERACEA WASTE PROCESSING: PROSPECTS FOR BIOCONVERSION

A.Tur, P.Tolokonin, D.Baurin, I.Shakir, V.Panfilov

Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia, Russia, 125480, Moscow, St. Geroyev Panfilovtsev, 20

This study aims to explore prospects for improving biological value of broccolibyproducts derived through industrial processing in order to obtain carbohydrate-protein fodder additives, enriched with microbial protein.

Key words: broccoli, raw materials processing, bioconversion, microorganisms fermentation

The use of plant byproducts as a source of nutrient compounds enables production of biologically active components with high added value. Broccoli (lat. Brassica oleracea var. italica) is a Brassicaceae family vegetable - a highly valuable product due to the high content of bioactive phytochemical compounds such as glucosinolates, isothiocyanate, chlorogenic acid, flavonoids, vitamins C, A, E, minerals (potassium, sodium, phosphorus, iron, calcium). Over the last several years, consumption of broccoli increased significantly due to the major benefits for human health. For example, broccoli has been recommended to prevent cancer or cardiovascular disease [1–4]. Previously conducted studies demonstrated possibilities for biological conversion of plant byproducts such as beet pulp, Jerusalem artichoke tubers, sunflower meal [5–7]. Brassicaceae family byproducts were used to obtain antioxidants [8] and flavonoids [9]. Broccoli aqueous extracts have been used for production of antimicrobial products containing gold nanoparticles [10]. It has been established that cattle fodder containing concentrates of carrots, alfalfa and broccoli lowers fat content in milk. [11]

This study seeks to examine opportunities to increase the biological value of broccoli byproducts (stalks, leaves, inflorescences) during industrial processing so as to obtain carbohydrate-protein fodder additive. The biochemical composition of broccoli green mass was studied: the content of fiber, fat, crude protein, as well as carbohydrate composition of broccoli juice by means of HPLC analysis. Options were suggested of raw material pretreatment to obtain nutrient media. Strains microorganisms were selected. Batch and solid state fermentation of Saccharomyces cerevisiae and Yarrowia lipolytica yeast strains were carried out using nutrient media with a different mineral composition.

The biochemical composition of broccoli green mass was studied: the content of fiber, fat, crude protein, as well as carbohydrate composition of broccoli juice by means of HPLC analysis. Options were suggested of raw material pretreatment to obtain nutrient media. Strains microorganisms were selected. Batch and solid state fermentation of Saccharomyces cerevisiae and Yarrowia lipolytica yeast strains were carried out using nutrient media with a different mineral composition.

References:
1. Moreno D.A. et al. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli // J. Pharm. Biomed. Anal. Elsevier, 2006. Vol. 41, № 5. P. 1508–1522. 2. Domínguez-Perles R. et al. Broccoli-Derived By-Products—A Promising Source of Bioactive Ingredients // J. Food Sci. Wiley Online Library, 2010. Vol. 75, № 4. P. C383–C392. 3. Redman C.T.P. Factors affecting the composition and quality of broccoli juice. MSc Thesis, 2009. 4. Talalay P., Fahey J.W. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism // J. Nutr.

Am Soc Nutrition, 2001. Vol. 131, № 11. P. 3027S–3033S. 5. Shakir I.V. et al. A method for producing a protein additive to feed. 2006. № 19. P. 1-5. 6. Karetkina B.A. et al. of Jerusalem artichoke tubers fructan treatment and probiotic product // Animal Biotechnology reality and prospects in agriculture. 2013. P. 229-230. 7. Baurin D.V. et al. factorial experiment in order to optimize the growth of pre-treatment conditions surrounding environment // Basic Research. 2014. № 11. C. 13-19. 8. Llorach R. et al. HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (Brassica oleracea L. v ar. botrytis) agroindustrial byproducts // J. Agric. Food Chem. ACS Publications, 2003. Vol. 51, № 13. P. 3895–3899. 9. Harbaum B. et al. Identification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Pak Choi Varieties (Brassica campestris L. ssp. chinensis var. communis) by HPLC–ESI-MS n and NMR and Their Quantification by HPLC–DAD // J. Agric. Food Chem. American Chemical Society , 2007. Vol. 55, № 20. P. 8251–8260. 10. Piruthiviraj P., Margret A., Krishnamurthy P.P. Gold nanoparticles synthesized by Brassica oleracea (Broccoli) acting as antimicrobial agents against human pathogenic bacteria and fungi // Appl. Nanosci. Springer, 2016. Vol. 6, № 4. P. 467–473. 11. Losada H., Cortés J., Grande D. El uso de hortalizas en la producción de leche en sistemas suburbanos // Livest. Res. Rural Dev. 1992. Vol. 4, № 3. P. 15–19.

Grant: Acknowledgements The Ministry of Education and Science of The Russian Federation supported the research within basic component of the State Assignment, project № 1294.

УДК: 639.111.4: 575.113.2 , ББК:

«SNP-АНАЛИЗ, КАК НОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ (RANGIFER TARANDUS)»

В.Р.Харзинова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста» (ВИЖ им. Л.К. Эрнста), Россия, 142132, пос Дубровицы, Московская область, Подольский р-н 60, spichka0784@gmail.com, 89258790712

С использованием чипа средней плотности BovineSNP50K BeadChip, изучено генетическое разнообразие домашней и дикой популяций северного оленя, обитающего на территории Таймырского Автономного округа и Красноярского края. Определена степень дифференциации исследуемых популяций. Установлено, что дикие северные олени характеризуются более высоким уровнем генетического разнообразия.

Ключевые слова: анализ однонуклеотидных полиморфизмов, генетическое разнообразие, популяция, Rangifer tarandus.

Актуальность. Северный олень, как вид сельскохозяйственных животных широко распространен на территории Крайнего Севера, ввиду его хорошей адаптации к природно-климатическим условиям данного региона, образуя, при этом, целостную экосистему (Романенко Т.М. и др., 2015). Это один из немногих видов, у которого домашняя популяция сосуществует с дикой. Каждая популяция единственного представителя рода Rangifer имеет свой уникальный генофонд, изучение и сохранение которого требует использования современных молекулярно-генетических подходов. Одним из таких подходов является полногеномное сканирование с использованием микроматриц Illumina BeadChip, основанных на анализе полиморфизмов единичных нуклеотидов (single nucleotide polymorphism, SNP). Недавние исследования показали, что SNP-чипы средней плотности (содержащие более 50000 SNP-маркеров), разработанные для домашних видов животных, могут быть успешно использованы для полногеномного анализа животных, геномы которых пока не секвенированы (Kharzinova V.R. et al. 2015; Денискова Т.Е. и др., 2016). Целью настоящей работы являлось проведение SNP анализа с помощью BovineSNP50KBeadChip для изучения генетического разнообразия домашней и дикой популяций северного оленя, обитающих на территории Таймырского Автономного округа и Красноярского края.

Материалы и методы исследований. Исходным материалом для исследований служили пробы ткани северных оленей домашней (DOM, n=11) и дикой (WLD, n=13) популяций северного оленя, разводимых на территории Таймырского Автономного округа и Красноярского края. Выделение геномной ДНК проводили с использованием колонок фирмы Nexttec (Германия) согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. SNP-анализ проводили с использованием BovineSNP50KBeadChip, плотностью 54609 SNP (Illumina, San Diego, CA, USA). Контроль качества SNPs, и матрицы идентичности по состоянию (IBS, identical-by-state) для многомерного шкалирования (MDS-анализа) проводили с помощью программного обеспечения Plink v.1.0.7 (USA). Определение структуры популяций

выполняли в программе STRUCTURE 2.3.4. Расчет популяционных показателей определяли в программном обеспечении GENETIX 4.05 иHP-Rare1.1. Создание и визуализацию исходных файлов выполняли в R пакете версии 3.2.3.

Результаты исследований. По результатам контроля качества (MAF = 0.01), для дальнейшего анализа было отобрано 604 полиморфных SNPs, наибольшее количество которых, было отмечено в дикой популяции (506 против 411). При сравнении полиморфных SNP, выявленных в этих популяциях, оказалось, что 318 SNP являлись для них общими, 189 – наблюдались только у дикой и 94 – только у домашней популяций. На основе полученных SNP-профилей было выявлено, что дикая популяция характеризуется более высоким уровнем генетического разнообразия, о чем свидетельствуют расчеты основных популяционно-генетических параметров. Уровень наблюдаемой гетерозиготности полиморфных SNP составил 0,201 у домашней и 0,208 у дикой популяции, при уровне ожидаемой гетерозиготности 0,192 и 0,199 соответственно. Уровень наблюдаемой гетерозиготности полиморфных SNP составил 0,201 у домашней и 0,208 у дикой популяции, при уровне ожидаемой гетерозиготности 0,192 и 0,199 соответственно. Дикие северные олени превалируют над домашними и по аллельному разнообразию: ArWLD=1,806 и ArDOM=1,687. Коэффициент инбридинга (Fis) выявил несущественное преобладание гетерозиготных аллелей в дикой популяции (-0,050). Кластерный анализ, также как и визуальная матрица генетической идентичности IBS (identity-by-state, идентичность по состоянию), выявили четкую дифференциацию исследуемых популяций северного оленя.

Полученные данные свидетельствуют о возможном использовании SNP-анализа для характеристики уровня генетического разнообразия и определения степени генетической дифференциации домашнего и дикого северного оленя, обитающего на территории Таймырского Автономного округа и Красноярского края. Для более детального изучения генетического разнообразия с использованием данного подхода нами запланированы дополнительные исследования большего количества образцов домашней и дикой популяций северного оленя, обитающих в данных регионах.

Литература.
1. Романенко Т. М., Филиппова Г. И. Генетический полиморфизм в популяции домашнего северного оленя Канинско-тиманской тундры Ненецкого АО. // Международный научный журнал «Символ науки».- 2015.- № 11. - С. 44-52. 2. Kharzinova V.R, Sermyagin A.A., Gladyr E.A., Okhlopkov I.M., Brem G., Zinovieva N.A. A study of applicability of SNP chips developed for Bovine and Ovine species to whole-genome analysis of reindeer Rangifer tarandus.// J Hered. 2015. Vol. 106, № 6. P. 758-761. doi:10.1093/jhered/esv081. 3. Денискова Т.Е., Охлопков И.М., Сермягин А.А., Гладырь Е.А., Багиров В.А., Сёлкнер И., Мамаев Н.В., Брем Г., Зиновьева Н.А. Полногеномное SNP-сканирование снежного барана Ovis nivicola. // Доклады академии наук.- 2016.- Т. 469, № 5.- С: 625-630. doi: 10.7868/S0869565216230250.

Финансирование: Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда, проект № 16-16-10068.

«SNP-ANALYSIS AS A MODERN GENETIC APPROACH TO STUDY GENETIC DIVERSITY OF THE REINDEER POPULATION (RANGIFER TARANDUS)».

V.Kharzinova

Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Research Institute of Animal Husbandry Named After Academician LK Ernst», Russia, 142132, Dubrovitzy sett, Moscow region Podolsk district 60

Using medium - density BovineSNP50K BeadChip, we evaluated genetic diversity of domestic and wild reindeer populations inhabiting territory of Taimyr Autonomous District and Krasnoyarsk Region. The differentiation degree of the studied populations was estimated. It was found that wild reindeer are characterized by a higher level of genetic diversity.

Key words: single nucleotide polymorphisms, genetic diversity, population, Rangifer tarandus.

Introduction. Reindeer as a farm animal is widespread in the territory of the Far North because of its good adaptation to climatic conditions of the region, thus forming, coherent ecosystem (Romanenko T.M. et al., 2015). This is one of the few species in which domestic population coexists with the wild. Each population of the only member of the genus Rangifer has a unique gene pool, research and preservation of which require using modern molecular genetic approaches. One such tool is a whole genome scanning by Illumina BeadChip microarrays, based on the analysis of single nucleotide polymorphisms (single nucleotide polymorphism, SNP). Recent studies showed that medium - density SNP-chips (comprising more than 50,000 SNP-markers), designed for domestic species,

could be successfully used for genome-wide analysis of animals whose genomes have been not sequenced yet (Kharzinova V.R. et al 2015; Deniskova T.E. et al., 2016). The aim of this work was to perform SNP analysis using BovineSNP50K BeadChip to study genetic diversity of domestic and wild reindeer populations inhabiting the Taimyr Autonomous District and the Krasnoyarsk Region.

Materials and methods. The genetic materials for the study were tissue samples of domestic (DOM, n = 11) and wild (WLD, n = 13) reindeer populations bred in territory of the Taimyr Autonomous District and the Krasnoyarsk Region. Genomic DNA was isolated using Nexttec columns (Germany) per themanufacturer recommendations. SNP-analysis was performed using BovineSNP50K BeadChip with density of 54,609 SNP (Illumina, San Diego, CA, USA). Quality control of SNPs and the matrix of identity (IBS, identical-by-state) for the multidimensional scaling (MDS-analysis) was done with Plink v.1.0.7 (USA). Determination of population structure was performed in the program STRUCTURE 2.3.4. Population parameters were calculated in software GENETIX 4.05 and HP-Rare1.1. R package version 3.2.3 was used to create and to visualize the source files.

The results. After the quality control (MAF = 0.01), 604 polymorphic SNPs were selected for further analysis, the largest number of whom was observed in wild population (506 versus 411). Comparing polymorphic SNP, identified in these populations, it was found that 318 SNP were common to both, while 189 were observed only in the wild and 94 - only in the domestic population. Based on the SNP-profiles it was revealed that wild population was characterized by a higher level of genetic diversity, what was confirmed by the basic population genetic parameters. The level of observed heterozygosity of polymorphic SNP was 0,201 in domestic and 0,208 in wild population, while at the levels of expected heterozygosity were 0.192 and 0.199, respectively. The level of the observed heterozygosity of polymorphic SNP was 0,201 at home and 0,208 in the wild population, at the level of expected heterozygosity of 0.192 and 0.199 respectively. Wild reindeer prevailed over the domestic by allelic diversity: ArWLD = 1,806 and ArDOM = 1,687. The inbreeding coefficient (Fis) showed insignificantexcess of heterozygous alleles in wild population (-0.050). Cluster analysis as well as a visual matrix of IBS genetic identity (identity-by-state) revealed a clear differentiation of the studied reindeer populations

The findings suggest the possible using of SNP-analysis to characterize genetic diversity level and to determine genetic differentiation degree of domestic and wild reindeer, inhabiting the territory of the Taimyr Autonomous District and the Krasnoyarsk Region. For a more detailed study of genetic diversity using the approach, we are planning additional investigations with more samples of domestic and wild reindeer populations, living in these regions.

References:
1. Romanenko T.M, Filippova G.I. Genetic polymorphism in the population of domestic reindeer of Kanin-Timan tundra Nenets AO. // International Journal «Symbol of Science».- 2015.-№ 11. - P. 44-52.2. 2. Kharzinova V.R, Sermyagin A.A., Gladyr E.A., Okhlopkov I.M., Brem G., Zinovieva N.A. A study of applicability of SNP chips developed for Bovine and Ovine species to whole-genome analysis of reindeer Rangifer tarandus.// J Hered. 2015. Vol. 106, № 6. P. 758-761. doi:10.1093/jhered/esv081. 3. Deniskova T.E., Okhlopkov I.M., Sermyagin A.A., Gladyr E.A., Bagirov V.A., Sëlkner I., Mamayev N.V., Brem G., Zinovieva N.A. Genome-wide SNP-scanning of bighorn sheep Ovis nivicola. // Reports of the Academy science.- 2016.- T. 469, № 5.- P.: 625-630. doi: 10.7868 / S0869565216230250.

Grant: The research was supported by the Russian Science Foundation, the project № 16-16-10068.

УДК: 604, ББК: 28

ЛАКТАПТИН – МЕМБРАНОАКТИВЫЙ ПЕПТИД, СПОСОБНЫЙ К ПРЯМОМУ ПРОНИКНОВЕНИЮ В КЛЕТКИ ЭУКАРИОТ.

О.Чинак[1], А.Ю.Юнусова[1], А.В.Шернюков[2], И.А.Пышная[3], Е.В.Кулигина[3], О.А.Коваль[3], А.А.Нуштаева[3], В.А.Рихтер[3]

[1]Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Россия, 630090, Ноосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8, niboch@niboch.nsc.ru, +7 (383) 363-51-50
[2]Новосибирский Институт Органической Химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Россия, 630090, Ноосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 9, benzol@nioch.nsc.ru, +7 (383) 330-88-50
[3]Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Россия, 630090, Ноосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8, niboch@niboch.nsc.ru, +7 (383) 363-51-50

Лактаптин - фрагмент к-казеина молока человека, обладающий апоптоз-индуцирующей активностью в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231 и не влияющий на жизнеспособность немалигнизированных стволовых клеток жировой ткани человека MSC. В работе

представлены результаты исследования структуры лактаптина и механизма его проникновения в клетку. Методами ЯМР и КД спектрометрии показано, что в водной среде лактаптин является нестрого упорядоченным пептидом. В гидрофобном трифторэтаноле, в первом приближении моделирующем цитоплазматическую мембрану, происходит частичная структуризация пептида. Методами электронной микроскопии и проточной цитофлуориметрии обнаружено, что лактаптин проникает в клетки по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, и по механизму прямого проникновения через плазматическую мембрану. Полученные данные позволяют заключить, что лактаптин обладает свойствами CPP (Cell-penetrating Peptides).

Ключевые слова: противоопухолевый пептид, эндоцитоз, прямое проникновение, электронная микроскопия, проточная цитофлюоромерия

Ранее было показано, что лактаптин - фрагмент к-казеина молока человека, индуцирует апоптотическую гибель клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231 и не влияет на жизнеспособность немалигнизированных стволовых клеток жировой ткани человека MSC. При этом лактаптин проникает в цитоплазму как раковых, так и немалигнизированных клеток.

Целью данной работы является исследование структуры лактаптина и механизма его проникновения в клетки человека.

Особенностью первичной структуры лактаптина является наличие большого количества положительно заряженных аминокислотных остатков и кластеров ароматических и алифатических аминокислотных остатков. Такая структура характерна и для пептидов CPP.

Вторичная и третичная структура лактаптина была исследована методами КД- и ЯМР-спектроскопии. Полученные данные свидетельствуют о том, что в водной среде лактаптин является нестрого упорядоченным пептидом. В неводном окружении, например, в трифторэтаноле, происходит некоторое упорядочивание структуры белка: доля α-спиралей увеличивается на 10%, а доля β-складок и неупорядоченной структуры уменьшается на 6% и 7%, соответственно. Такое изменение структуры описано для CPP(Cell-penetrating Peptides) и позволяет им проникать через липидные мембраны клеток.

Таким образом, первичная и вторичная структура лактаптина похожа на структуру описанных в литературе CPP.

Для исследования способапроникновения лактаптина в клетки MDA-MB-231 и MCF-7 был синтезирован конъюгат лактаптина с флуоресцентным красителем 5(6)-карбокситетраметилродамином (RL2-Rho). Проникновение этого конъюгата через цитоплазматическую мембрану было исследовано методом проточной цитофлуориметрии с использованием ингибиторов различных путей эндоцитоза. Обнаружено, что ингибирование путей эндоцитоза, опосредованных липидными рафтами, с помощью нистатина или MβCD снижает эффективность проникновения лактаптина в клетки (не более, чем на 46%). Кроме того, было показано, что применение неспецифического блокатора всех путей эндоцитоза NaN3 подавляет проникновение RL2-Rho в клетки MDA-MB-231 лишь частично (на 44%) [2].

Для подтверждения и уточнения механизма проникновения лактаптина в клетки был синтезирован препарат наночастиц золота, покрытых гомогенным слоем лактаптина толщиной 2–7 нм (RL2-Au). Методом электронной микроскопии показано, что RL2-Au проникает в клетки MDA-MB-231 главным образом по пути кавеолин-зависимого эндоцитоза и в меньшей степени по пути клатрин-зависимого и клатрин-кавеолин-независимого пиноцитоза. Кроме того было обнаружено, что при проникновении RL2-Au в клетки путем эндоцитоза препарат сохраняет примембранную локализацию даже в поздних эндосомах и лизосомах. Это говорит о том, что лактаптин обладает некоторым сродством к мембранам внутренних ультраструктур клетки.

Таким образом, лактаптин является мембраноактивным пептидом и проникает в клетки частично по пути рафт-зависимого пиноцитоза (преимущественно кавеолин-зависимого, в меньшей степени клатрин-зависимого и клатрин-кавеолин-независимого пиноцитоза), и, вероятно, по механизму прямого проникновения через плазматическую мембрану.

1. Данные КД- и ЯМР-спектроскопии позволяют заключить, что лактаптин имеет нестрого упорядоченную структуру, способную к частичной структуризации в мембраноподобных средах. 2. Согласно данным проточной цитофлуориметрии и электронной микроскопии лактаптин является мембранно-активным белком и проникает в клетку частично по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами и, частично по механизму прямого проникновения через плазматическую мембрану. 3. В совокупности структура и механизм проникновения лактаптина в клетки позволяют заключить, что он обладает свойствами CPP.

Литература.
1. Olga A. Koval, Anastasiya V. Tkachenko, Alexandr S. Fomin, Dmitry V. Semenov, Anna A. Nushtaeva, Elena V. Kuligina, Eugeny L. Zavjalov, Vladimir A. Richter. // PLoS One, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0093921 2. Чинак О.А., Фомин А.С., Нуштаева А.А., Коваль О.А., Савельева А.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А. Биоорганическая химия 2016, том 42, № 4, с. 401–410.

Финансирование: ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (VI.62.1.5,0309-2016-0003) «Синтетическая бтология: разработка средств манипуляции генетическим материалом и создание перспективных препаратов для терапии и диагностики»

LACTAPTIN – MEMBRANE-ACTIVE PEPTIDE WITH CELL-PENETRATING PROPERTIES.

O.Chinak[1], A.Yunusova[1], A.Shernyukov[2], I.Pyshnaya[3], E.Kuligina[3], O.Koval[3], A.Nushtaeva[3], V.Richter[3]

[1]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Russia, 630090, Novosibirsk, pr. Akademika Lavrent'eva, 8*
[2]*N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Russia, 630090, Novosibirsk, pr. Akademika Lavrent'eva, 9*
[3]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Russia, 630090, Novosibirsk, pr. Akademika Lavrent'eva, 8*

Lactaptin is a fragment of human κ-casein, which induces the apoptosis of human cancer cells MCF-7 и MDA-MB-231 in culture and has not cytotoxic activity toward nonmalignized stem cells of human adipose tissue MSC. In the present work, we have investigated the structure and the mechanism of lactaptin penetration into human cells. It has been shown by NMR and CD spectroscopy that in water environment lactaptin is an intrinsically disordered protein. In hydrophobic trifluoroethanol, mimic cell membrane, lactaptin is partially folded. The mechanism of lactaptin penetration into human cells has been studied by electronic microscopy and flow cytometry. It was found that lactaptin partly penetrates through lipid raft-mediated pinocytosis and partly by direct penetration through the plasma cell membrane. The data obtained suggest that it can be assigned to Cell-penetrating Peptides (CPP).

Key words: antitumor peptides, endocytosis, direct penetration, cell-penetrating peptides, electronic microscopy, flow cytometry

Earlier we have shown that lactaptin – a fragment of human κ-casein, induces the apoptosis of human cancer cells MCF-7 и MDA-MB-231 and has not cytotoxic activity toward nonmalignized stem cells of human adipose tissue MSC. Thus it penetrates into cytoplasm of both human cancer and nonmalignized cells.

The aim of this work is to study the structure of lactaptin and the mechanism of its penetration into human cells.

Lactaptin has a lot of positively charged and aromatic amino acids in the structure. Such structure is characteristic of CPP (Cell-penetrating Peptides).

The secondary and tertiary structure of lactaptin has been studied by NMR and CD spectroscopy. The data obtained indicate that in water environment lactaptin is an intrinsically disordered protein and in hydrophobic environment, for example in trifluoroethanol, this peptide is more ordered: the content of α-helix increases by 10%, the content of β-sheet and random coil decreases by 6% and 7%, respectively. Such structure variation is usual for CPP that allows them to penetrate the lipid cells membranes.

Thus, primary and secondary structure of lactaptin is similar to the structure of well-known CPPs.

In order to understand the lactaptin penetration mechanism into MDA-MB-231 and MCF-7 cells, we conjugated lactaptin with fluorescent dye 5(6)-carboxytetramethylrhodamine (RL2-Rho). Penetration of this conjugate across the cell plasma membrane was studied by flow cytometry using the inhibitors of different endocytosis pathways. It was found that inhibition of raft-mediated endocytosis by nystatin and MβCD decreased the efficiency of RL2-Rho penetration of into cells by no more than 46%. NaN3 as nonspecific inhibitor of all endocytosis pathways reduces the efficiency of RL2-Rho penetration of for no more than 44% [2].

To confirm the penetration mechanism of lactaptin into cell, we synthesized gold nanoparticles covered with lactaptin (RL2-Au) with 2-7nm layer thickness. Electronic microscopy shows that RL2-Au penetrates into MDA-MB-231 cells mainly through caveolin-mediated endocytosis and in a less degree through clathrin-mediated and caveolin-clathrin-independent pathways. Furthermore, it was shown that after penetration into cells by endocytosis, RL2-Au localized near the membrane even in late endosomes and lysosomes.

This suggest that lactaptin has some affinity to the inner cell membrane ultrastructures.

Thus, lactaptin is a membrane-active peptide, which penetrates into cell partly through the lipid raft-mediated endocytosis (mainly through caveolin-mediated endocytosis and, to a lesser degree, through clathrin-mediated and caveolin-clathrin-independent endocytosis pathways) and probably also by direct penetration across the plasma cell membrane.

1. It was shown by NMR and CD spectroscopy that lactaptin has an intrinsically disordered structure capable of partial folding in membrane-mimetic environments. 2. It was shown by flow cytometry and electronic microscopy that lactaptin is a membrane-active peptide, which penetrates into cells partly through the lipid raft-mediated endocytosis and partly by direct penetration across the plasma cell membrane. 3. Thus, structure of lactaptin together with its cell internalisation mechanism, allow to conclude that lactaptin can be assigned to CPP.

References:
1. Olga A. Koval, Anastasiya V. Tkachenko, Alexandr S. Fomin, Dmitry V. Semenov, Anna A. Nushtaeva, Elena V. Kuligina, Eugeny L. Zavjalov, Vladimir A. Richter. // PLoS One, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0093921 2. O.A. Chinak, A.S. Fomin, A.A. Nushtaeva, O.A. Koval, A.V. Savelyeva, E.V. Kuligina, V.A. Richter // Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2016, Vol. 42, No. 4, pp. 361–371.

Grant: The study was supported partially under State funded budget project (VI.62.1.5,0309-2016-0003)

УДК: 630.165.4, ББК: 28.087

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ МИКСОПЛОИДНЫХ КЛОНОВ ТОПОЛЯ

Е.А.Шабанова[1], О.С.Машкина[1], В.Н.Попов[2]

[1]ФГБУ «Всероссийский НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии», Россия, 394087, Воронеж, Ломоносова, 105, katy-green2009@yandex.ru, 89518773951
[2]ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Россия, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1, pvn@bio.vsu.ru, +7 (473) 220-88-76

Получены клоны четырех хозяйственно-ценных экземпляров тополя путем прямого органогенеза in vitro. Показана сохранность их цитогенетических особенностей после года культивирования на безгормональных питательных средах.

Ключевые слова: плоидность, миксоплоидия, тополь, клон, in vitro

Сохранение генетических особенностей хозяйственно-ценных биотипов в процессе их клонального микроразмножения является важным условием получения селекционно-улучшенного посадочного материала древесных растений. Практический интерес в лесном хозяйстве представляют триплоиды (2n=3x=57) тополя, нередко проявляющие соматический гетерозис по устойчивости, росту и качеству древесины. Миксоплоиды триплоидного типа часто сочетают продуктивность с адаптивностью за счет резерва клеток с разным набором хромосом, оптимальное соотношение которых может измениться в процессе онтогенеза и при размножении in vitro [1].

Исходные быстрорастущие триплоидные гибриды тополя были получены Машкиной О.С. (тополь белый - №65/81 и №22/83) и Гуляевой Е.М. (т. дельтовидный х т. бальзамический - №3х1 и №3х2) [2,3] при использовании в гибридизации искусственно полученной нередуцированной диплоидной пыльцы.

Регенерация растений осуществлялась путем активации развития основного пазушного побега стеблевых эксплантов на среде WPMс уменьшенным вдвое содержанием макросолей, с добавлением 0,2 мг/л 6-БАП. Укоренениеполученных микропобегов и дальнейшее их микрочеренкованиепроводилось на безгормональной среде WPM с уменьшенным вдвое содержанием макроэлементов, дополненной активированным углем (1%).

Для оценки стабильности размноженных in vitro клонов был проведен цитогенетический анализ исходного и клонированного материала. Выявлено, что все деревья являются миксоплоидами триплоид-диплоидного типа с преобладанием в меристематических тканях клеток с 57 хромосомами (65-75%). Размноженные in vitro клоны после года культивирования на безгормональных питательных средах сохранили свой миксоплоидный статус. Содержание клеток с 2n=3x=57 составило 60-70%, с 2n=2x=38 – 15-25%, с анеуплоидным (2n=44, 2n=46, 2n=48) – 10-20%. Уровень миксоплоидии (суммарное число клеток с отклоняющимся от модального триплоидного набора хромосом) практически не изменился и составил у исходных деревьев 25-34,8%, а у клонов 30-40%.

Показано, что миксоплоидные клоны тополя, в целом, сохраняют свои цитогенетические особенности в процессе культивирования in vitro. Таким образом, подходы, используемые нами при клональном микроразмножении, обеспечивают сохранение генетических особенностей исходных деревьев за счет регенерации растений путем прямого органогенеза, исключающего стадию каллусообразования; использования низких концентраций регуляторов роста при введении в культуру (0,5 мг/л 6-БАП) и дальнейшего микрочеренкования только на безгормональных питательных средах.

Литература.
1. Машкина О.С., Федулова Т.П., Табацкая Т.М., Кондратьева А.М., Шабанова Е.А. Молекулярно-генетическая и цитогенетическая оценка перспективных гибридов и размноженных in vitro клонов тополя и осины // Вестник ВГУ. Серия: химия, биология, фармация, 2016. – №2. – С. 60-69. 2. Машкина О.С. Испытание триплоидных гибридов тополя в условиях Воронежской области // Сибирский лесной журнал. - 2016. - № 5. - С. 72-81. 3. Гуляева Е.М., Машкина О.С., Бурдаева Л.М., Сиволапов А.И. Индуцированные мутации древесных растений и их селекционно-семеноводческое значение // Селекция, генетика и семеноводство древесных пород как основа создания высокопродуктивных лесов. М., 1980. – С. 308-310.

CYTOGENETIC STABILITY OF MIXOPLOID POPLAR CLONES

E.Shabanova[1], O.Mashkina[1], V.Popov[2]

[1]All-Russian Research Institute of Forest Genetic, Breeding and Biotechnology, Russia, 394087, Voronezh, Lomonosov, 105
[2]Voronezh State University, Russia, 394087, Voronezh, University sq, 1

Four clones of economically valuable instances of poplar were obtained by direct organogenesis in vitro. The safety of their cytogenetic features after years of cultivation on hormone-free media was shown.

Key words: ploidy, mixoploidy, poplar, clone, in vitro

Conservation of genetic characteristics of economically valuable biotypes in the process of micropropagation is an important condition of production of selected planting material of woody plants. Practical interest of poplar triploids (2n = 3x = 57) in forestryis caused bysomatic heterosis for stability, growth and wood quality.Triploid type of mixoploidy often combine productivity and adaptability by cell reserve with different sets of chromosomes, optimum ratio of which can changes in the process of ontogenesis and in vitro propagation [1].

Initial fast-growing poplar triploid hybrids were obtained by Mashkina O.S. (white poplar - №65/81 and №22/83) and Gulyayeva E.M. (necklace poplar × balsam poplar - №3x1 and №3x2) [2, 3] using unreduced diploid pollen in artificial hybridization.

Plant regeneration was carried out by activation of primary axillary shoot from stem explants on WPM medium with half macronutrientconcentration and addition of 0.2 mg/l 6-BAP. Rooting of received microshoots and multiplication were made on hormone-free WPM medium with a reduced to half macronutrients content supplemented with activated carbon (1%).

Cytogenetic analysis of initial and cloned material was carried out for assessment the stability of clones. It was revealed that all the trees are mixoploids with a predominance of cells with 57 chromosomes (65-75%). In vitro propagated clones after year of cultivation on hormone-free media have retained mixoploidy level. Cells with 2n=3x=57 chromosomes was 60-70%, with 2n=2x=38 - 15-25%, with aneuploid set (2n=44, 2n=46, 2n=48) – 10-20%. Mixoploidy level (total number of cells with set of chromosomes, deviating from the modal triploid set) remain almost unchanged and it was for initial trees 25-34,8%, for clones - 30-40%.

It was shown that mixoploid poplar clones generally retain cytogenetic features during in vitro cultivating. Thus, approaches used in micropropagation ensure the preservation of genetic characteristics of initial trees by direct organogenesis, low concentration of growh regulators on stage of regeneration of first shoots and further multiplication only on hormone-free media.

References:
1. Mashkina O.S., Fedulova T.P., Tabatskaya T.M., Kondratyeva A.M., Shabanova E.A. Molecular genetic and cytogenetic evaluation of perspective hybrids and propagated in vitro clones of poplar and aspen // Vestnik VSU. Series: chemistry, biology, pharmacy, 2016. - №2. - P. 60-69. 2. Mashkina O.S. Test of poplar triploid hybrids in the conditions of the Voronezh Region // Journal of Siberian forest. - 2016. - № 5. - P. 72-81. 3. Gulyaeva E.M., Mashkina O.S, Burdaeva L.M., Sivolapov A.I. Induced mutation of woody plants and their breeding and seed production value // Breeding, genetics and seed production of trees as a basis for the creation of highly productive forests. M., 1980. - P. 308-310.

УДК: 577.11.083, ББК:

НОВЫЙ ГЕН CBLA УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ КОБАЛЬТ-ЗАВИСИМОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ В RHODOCOCCUS RHODOCHROUS

А.О.Шемякина

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Россия, 113545, Москва, 1-ый Дорожный пр., 1, haletidy@gmail.com, 89150679618

Изучен механизм кобальт-зависимой экспрессии в родококках генов промышленно-значимых ферментов – нитрилгидратазы, нитрилазы, и ациламидазы, используемых для биокаталитического получения акриловых мономеров. Показано, что ионы кобальта повышают транскрипцию, и синтез белка ферментов в 3-4 раза. Обнаружен новый ген транскрипционного регулятора CblA, и показано, что экспрессия зависит от кобальта только в присутствие этого гена.

Ключевые слова: Rhodococcus; нитрилгидратаза; нитрилаза; ациламидаза; акриламид; биокатализ; кобальт; экспрессия генов; регулятор транскрипции.

Ранее нашей группой были впервые получены экспериментальные данные, свидетельствующие об активации транскрипции генов нитрилгидратазы в Rhodococcus rhodochrous M8 ионами кобальта [1]. Впервые было показано, что биосинтез фермента, содержащего в активном центре ионы тяжёлого металла, может регулироваться этими ионами на уровне транскрипции. Полноценное изучение влияния кобальта на экспрессию генов нитрилгидратазы было затруднено в связи с тем, что в отсутствие кобальта нитрилгидратаза неактивна. В настоящей работе для изучения механизма кобальт-зависимой регуляции экспрессии были использованы ферменты, активность которых не зависит от ионов кобальта - ациламидаза Aam из R. erythropolis TA37 [2] и нитрилаза NitC1 из Alcaligenes denitrificans C-32 [3]. Экспрессия генов этих ферментов изучалась в штамме R. rhodochrous M33 – производном штамма R. rhodochrous M8, не содержащем гена алифатической амидазы.

Штаммы родококков R. rhodochrous M33 aam и R. rhodochrous M33 nit, содержащие в хромосоме гены ациламидазы и нитрилазы под контролем нитрилгидратазного промотора, были получены с помощью замены генов нитрилгидратазы в R. rhodochrous M33 на гены ациламидазы и нитрилазы, соответственно. Для изучения влияния кобальта культуры штаммов R. rhodochrous M33, M33 aam и M33 nit выращивали на минеральной среде с глюкозой, с добавкой и в отсутствие хлорида кобальта. С помощью метода qRT-PCR были оценены количества специфических м-РНК, транскрибирующихся с нитрилгидратазного промотора. Во всех трёх штаммах количество специфической м-РНК увеличивалось в 3-4 раза, когда культуры выращивались в присутствии ионов кобальта. В штаммах M33 aam и M33 nit повышение содержания м-РНК сопровождалось возрастанием в несколько раз количеств белков (оцененных с помощью SDS-ПААГ электрофореза) и активностей ациламидазы и нитрилазы в клетках. В присутствии кобальта количества внутриклеточно синтезируемых белков ферментов достигали: для нитрилгидратазы – до 50% от растворимых белков, для ациламидазы и нитрилазы – до 25% от растворимых белков.

Известно, что во многих случаях металл-зависимая регуляция транскрипции генов осуществляется с помощью белков - транскрипционных регуляторов. С целью поиска генов-регуляторов геном бактерии R. rhodochrous M8 был секвенирован. Из ряда генов-кандидатов был отобран ген предполагаемого металло-зависимого транскрипционного регулятора протяженностью ок. 360 пн, сходного с такими регуляторами из семейства ArsR [4] (регулятор обозначен нами CblA). Наиболее близким экспериментально изученным гомологом является ген Ni/Co-зависимого транскрипционного регулятора NmtR из Mycobacterium tuberculosis (65% гомологии по нуклеотидной и 64% по аминокислотной последовательности). Для изучения влияния CblA были сконструированы две плазмиды, содержащие транскрипционные слияния нитрилгидратазного промотора и гена ациламидазы, и различающиеся наличием и отсутствием гена cblA. Плазмиды были введены в штамм R. rhodochrous M50 (производный штамма R. rhodochrous M8, в котором делетированы гены нитрилгидратазы и cblA), и культуры плазмидных штаммов родококков выращивали на минеральной среде с добавкой и в отсутствие кобальта. В присутствие гена cblA добавление ионов кобальта вызывало 3-4 кратное увеличение ациламидазной активности клеток родококков. В отсутствие гена cblA уровень ациламидазной активности не зависел от добавки кобальта и оставался постоянно высоким. Количества белка ациламидазы коррелировали с активностями фермента в клетке.

Показано, что сконструированные нами штаммы R. rhodochrous M33 aam и M33 nit являются эффективными биокатализаторами для получения акриловых мономеров. С помощью клеток штамма R. rhodochrous

M33 aam, выращенных в присутствии кобальта, был проведён процесс биокаталитического получения ценного акрилового мономера – N-изопропилакриламида (до 30 г/л N-изопропилакриламида в водном растворе). С помощью клеток штамма R. rhodochrous M33 nit, выращенных в присутствии кобальта, был проведён процесс биокаталитического получения широко используемого акрилового мономера – акриловой кислоты (до 70 г/л акриловой кислоты в водном растворе).

1. Сконструированы штаммы R. rhodochrous, в которых гены нитрилгидратазы в хромосоме заменены на гены ациламидазы или нитрилазы под контролем промотора нитрилгидратазы. 2. На примере этих штаммов показано, что ионы кобальта регулируют экспрессию с промотора нитрилгидратазы на уровне транскрипции. В присутствие ионов кобальта экспрессия возрастает в 3-4 раза. 3. Секвенирован геном бактерии R. rhodochrous M8 и выявлен новый ген металлозависмого транскрипционного регулятора CblA. 4. Показано, что ионы кобальта увеличивают уровень экспрессии с нитрилгидратазного промотора только в присутствии гена cblA. 5. Показано, что сконструированные штаммы родококков являются эффективными биокатализаторами для получения акриловых мономеров – N-изопропилакриламида и акриловой кислоты.

Литература.
1. Pogorelova, T.E. Cobalt-dependent transcription of the nitrile hydratase gene in Rhodococcus rhodochrous M8 / T.E. Pogorelova [и др.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1996. – Т. 144, № 2-3. – С. 191-195. 2. Лавров, К.В. Новая ациламидаза из Rhodococcus erythropolis TA37, способная гидролизовать N-замещённые амиды / К.В. Лавров [и др.] // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 8. – С. 1111 – 1119. 3. Новиков, А.Д. Бактериальный штамм Alcaligenes denitrificans C-32 содержит две нитрилазы с разной субстратной специфичностью / А.Д. Новиков [и др.] // Биотехнология. – 2016. – Т. 32, № 6. – С. 45-52. 4. Busenlehner, L.S. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance/ L.S. Busenlehner, M.A. Pennella, D.P. Giedroc // FEMS Microbiol Rev. – 2003. – Т. 27, № 2-3. – С. 131-143.

Финансирование: Работа была выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (соглашение №16-14-00216 «Изучение системы кобальт-зависимой экспрессии генов в бактериях Rhodococcus и создание на её основе платформы для биосинтеза ферментов – биокатализаторов для получения акриловых мономеров»).

NEW CBLA GENE PARTICIPATES IN REGULATION OF COBALT-DEPENDENT EXPRESSION OF NITRILE HYDRATASE GENES IN RHODOCOCCUS RHODOCHROUS

A.Shemyakina

Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Russia, 113545, Moscow, 1-st Dorojny pr., 1

The mechanism of cobalt-dependent expression of industrially significant enzymes – nitrile hydratase, nitrilase and acylamidase, was investigated in Rhodococcus cells. These enzymes are used in biocatalytic processes of obtaining acrylic monomers. It was demonstrated that cobalt ions increase transcription and synthesis of enzymes 3-4-fold. The new gene of transcriptional regulator CblA was discovered, and it was shown that expression is dependent on cobalt only in presence of this gene.
Key words: Rhodococcus; nitrile hydratase; nitrilase; acylamidase; acrylamide; biocatalysis; cobalt; gene expression; transcriptional regulator.

An experimental evidence of cobalt activation of transcription of nitrile hydratase genes in Rhodococcus rhodochrous M8 was earlier obtained for the first time by our group [1]. It was demonstrated for the first time that the biosynthesis of enzyme containing heavy metal ions in its active center can be regulated on transcriptional level by the same metal ions. Detailed estimation of cobalt influence on the expression of nitrile hydratase genes was difficult due to the loss of activity of nitrile hydratase in absence of cobalt. Now genes of acylamidase Aam from R. erythropolis TA37 [2] and nitrilase NitC1 from Alcaligenes denitrificans C-32 [3] were used for the investigation of the mechanism of cobalt-dependent expression regulation because their enzyme activities do not depend on cobalt ions. Gene expression of these enzymes was studied in R. rhodochrous M33 strain – derivative of strain R. rhodochrous M8, in which aliphatic amidase gene is deleted.

R. rhodochrous M33 aam and R. rhodochrous M33 nit strains containing in chromosome acylamidase and nitrilase genes under the control of nitrile hydratase promoter were obtained by substitution of nitrile hydratase genes in R. rhodochrous M33 with acylamidase or nitrilase genes, respectively. To investigate the influence of cobalt

ions, cultures of strains R. rhodochrous M33, M33 aam and M33 nit were grown on mineral media with glucose, with and without cobalt chloride. The amounts of specific i-RNA transcribed from nitrile hydratase promoter were estimated with qRT-PCR method. In all three stains the amount of specific i-RNA increased in 3-4 times when cultures were grown in presence of cobalt ions. These data were supported for M33 aam и M33 nit strains by several-fold increasing of enzyme amounts (estimated by SDS-PAGE), and acylamidase and nitrilase activities of the cells. In presence of cobalt the amounts of intracellular enzyme reached 50% of total soluble protein for nitrile hydratase and 25% of total soluble protein for acylamidase and nitrilase.

It is known that metal-dependent regulation of transcription of genes is often carried out by transcriptional regulators. In order to find such regulatory genes, the genome of R. rhodochrous M8 strain was sequenced. From a number of candidates, the 360-bp gene of putative metal-dependent transcriptional regulator similar to ArsR family regulators [4] was selected (designated as CblA). The closest experimentally studied homologue of cblA gene is the gene of Ni/Co-dependent transcriptional regulator NmtR from Mycobacterium tuberculosis (65% of identical nucleotides, and 64% of aminoacids).To investigate the role of CblA two plasmids, containing transcriptional fusion of nitrile hydratase promoter with acylamidase gene and differing by the presence and absence of cblA gene, were constructed. The plasmids were introduced in R. rhodochrous M50 strain (derivative of R. rhodochrous M8 strain, with deleted nitrile hydratase and cblA genes). The cultures of plasmid Rhodococcus strains were grown on mineral medium with and without cobalt chloride. Cobalt ions addition induced 3-4-fold increasing of acylamidase activity of Rhodococcus cells in presence of cblA gene. In absence of cblA gene the level of acylamidase activity was independent of cobalt addition and was constantly high. The amounts of acylamidase protein correlated with enzyme activity of the cells.

It was demonstrated that obtained in this work R. rhodochrous M33 aam and M33 nit strains are effective biocatalysts to produce acrylic monomers. Biocatalytic synthesis of valuable acrylic monomer - N-isopropylacrylamide was realized using R. rhodochrous M33 aam cells (up to 30 g/l of N-isopropylacrylamide in aqueous solution). Biocatalytic synthesis of widely used acrylic monomer – acrylic acid was realized using R. rhodochrous M33 nit cells (up to 70 g/l of acrylic acid in aqueous solution).

1. The Rhodococcus rhodochrouss trains, in which chromosomal genes of nitrile hydratase were replaced with acylamidase or nitrilase genes under the control of nitrile hydratase promoter, were constructed. 2. It was demonstrated using these strains that cobalt regulates expression from nitrile hydratase promoter on transcriptional level. In presence of cobalt the expression increased 3-4-fold. 3. The genome of R. rhodochrous M8 strain was sequenced and the new gene of metal-depended transcriptional regulator CblA was identified. 4. It was shown that cobalt increases expression level of nitrile hydratase promoter only in presence of cblA gene. 5. It was shown that constructed Rhodococcus strains are effective biocatalysts for producing acrylic monomers – N-isopropylacrylamide and acrylic acid.

References:
1. Pogorelova, T.E. Cobalt-dependent transcription of the nitrile hydratase gene in Rhodococcus rhodochrous M8 / T.E. Pogorelova [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1996. – Vol. 144, № 2-3. – P. 191-195. 2. Lavrov, K.V. A new acylamidase from Rhodococcus erythropolis TA37 can hydrolyze N-substituted amides / K.V. Lavrov [et al.] // Biochemistry (Mosc). – 2010. – Vol. 75, № 8. – P. 1006-1013. 3. Novikov, A.D. A Bacterial Strain Alcaligenes denitrificans C-32 Contains Two Nitrilases with Different Substrate Specificities / A.D. Novikov [et al.] // Biotekhnologiya (Moscow). – 2016. – Vol.32, № 6. – P. 45-52. 4. Busenlehner, L.S. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance / L.S. Busenlehner, M.A. Pennella, D.P. Giedroc // FEMS Microbiol Rev. – 2003. – Vol. 27, № 2-3. – P. 131-143.

Grant: This work was supported by Russian Science Foundation (project №16-14-00216 «Study on cobalt-dependent gene expression in Rhodococcus Bacteria and construction on its basis of a platform for biosynthesis of enzyme biocatalysts for obtaining of acrylic monomers»).

УДК: 57.085.23, ББК: 28.072

ПРИМЕНЕНИЕ БЕЛКОВОГО МОДУЛЯ MINISOG ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

О.Н.Шилова, С.М.Деев

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова российской академии наук, Россия, 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10, olga.shilova.n@gmail.com, 8 985 448 6370

Предложено применение белкового модуля miniSOG в качестве компонента рекомбинантных белков, позволяющих изучать динамику интернализации клеточных рецепторов. Свойства модуля рассмотрены на примере интернализации одноцепочечного антитела 4D5scFv и белка неиммуноглобулиновой природы DARPin, использующихся для доставки токсинов к рецептору ErbB2 (HER2) на поверхности раковых клеток.

Ключевые слова: Интернализация, miniSOG, ErbB2, тераностика

Разработка диагностических и терапевтических агентов с направленной доставкой в опухоли является актуальной задачей фундаментальной и прикладной биотехнологии. Мишенью для таких агентов служат онкомаркеры, многие из которых являются поверхностными белками-рецепторами. Одной из важных характеристик тераностического агента является его способность вызывать интернализацию мишени, так как способность и скорость попадания адресного препарата внутрь клетки может оказывать существенное влияние на эффективность его работы.

Для изучения интернализации рекомбинантных белков был использован модуль miniSOG(miniSingl etOxygenGenerator). Данный белок был исходно сконструирован на основе LOV2-домена фототропина 2 Arabidopsisthaliana для использования в электронной микроскопии в качестве источника активных форм кислорода [1], в дальнейшем была показана возможность использовать miniSOG качестве компонента адресных генетически кодируемых фотосенсибилизаторов [2, 3]. Однако оказалось, что свойства данного белка позволяют использовать его для исследования интернализации комплексов рецептора и рекомбинантного белка, так как miniSOG обладает флуоресцентными свойствами, которые теряются после попадания в эндосому.

Свойства модуля miniSOG как инструмента для изучения интернализации были рассмотрены для двух адресных модулей, связывающихся с рецептором ErbB2, гиперэкспрессирующимся на поверхности опухолей молочной железы, яичника, желудка и некоторых других: одноцепочечного антитела 4D5scFv и искусственного белка неиммуноглобулиновой природы DARPin_9-29. Рекомбинантные белки DARPin-miniSOG и 4D5-miniSOG были наработаны в бактериях Escherichiacoli штамма BL21(DE3) и очищены стандартными хроматографическими методами. Способность данных белков специфически связываться с ErbB2 на поверхности клеток аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 была подтверждена методами проточной цитофлуориметрии. Интернализация белков в комплексе с рецептором также была подтверждена при помощи конфокальной микроскопии.

Флуоресцентные свойства miniSOGсохраняются в широком диапазоне pH (от 4 до 10 единиц), однако при попадании белка в эндосому интенсивность флуоресценции значительно снижается, предположительно, из-за восстановления кофактора, которым является флавинмононуклеотид. Для изученных адресных модулей методом проточной цитофлуориметрии было показано, что DARPin интернализуется гораздо быстрее, чем 4D5scFv: интенсивность флуоресценции клеток SK-BR-3 падала в 2 раза за 10 минут в случае DARPin-miniSOGи за 30 минут в случае 4D5scFv-miniSOG. Полученные результаты согласуются с ранее установленной цитотоксичностью обоих рекомбинантных фототоксинов. Токсичность, определяемая как IC50 – концентрация белка, при которой оставались жизнеспособными 50% клеток, для DARPin-miniSOG составила 0,8 мкМ, для 4D5scFv-miniSOG – 160 нМ. Поскольку константа диссоциации данных белков с ErbB2, определенная методом поверхностного плазмонного резонанса, сопоставима (10 нМ для 4D5-miniSOG/ERBb2 и 5 нМ для DARPin-miniSOG/ERBb2), можно сделать вывод о том, что прнципиальный вклад в токсичность вносит именно скорость интернализации, определяющая время нахождения комплекса на мембране, где он оказывает максимальное токсическое действие.

Таким образом, нами была показана возможность использования белка miniSOG для изучения динамики интернализации рецептора ErbB2 в результате связывания с адресными модулями, используемыми для доставки тераностических агентов. В составе рекомбинантных белков модуль miniSOG может использоваться для изучения интернализации других рецепторов, служащих мишенями для доставки лекарств в очаг болезни.

Литература.
1. Shu X., Lev-ram V., Deerinck T. J., Qi Y., Ramko E. B., Michael W., Tsien R. Y. A Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells , Tissues , and Organisms // PLoS Biology. 2011. Vol. 9. №4. 2. Mironova K. E., Proshkina G. M., Ryabova A. V, Stremovskiy O. A, Lukyanov S. A., Petrov R. V, Deyev S. M. Genetically encoded immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro // Theranostics. 2013. Vol. 3. №11. P 831–40. 3. Proshkina G. M., Shilova O. N., Ryabova A. V., Stremovskiy O. A., Deyev S.M. A new anticancer toxin based on HER2/neu-specific DARPin and photoactive flavoprotein miniSOG // Biochimie. 2015. Vol. 118. P. 116-122.

Финансирование: Работа поддержана грантом РФФИ 16-34-00859.

THE APPLICATION OF MINISOG PROTEIN MODULE FOR THE STUDY OF CELL SURFACE RECEPTORS INTERNALIZATION

O.Shilova, S.Deyev

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Russia, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya, 16/10

The study is devoted to the application of the miniSOG protein as a component of recombinant proteins for investigation of dynamics of cell surface receptor internalization. The miniSOG is used for examination of internalization of single-chain antibody 4D5scFv and artificial non-immunoglobulin protein DARPin_9-29 both used for delivery of toxins to ErbB2 (HER2) receptor to the surface of cancer cells.

Key words: Internalization, miniSOG, ErbB2, theranostics

The design of diagnostic and therapeutic agents for targeting tumors is an important issue in fundamental and applied biotechnology. The common targets for the therapy are tumor markers, most of them are cell surface receptors. One of the key features of a theranostic agent is its ability to cause internalization of a target because the possibility of getting inside a cell and the speed of this process can significantly affect the efficacy of a target agent action. In the current work the miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator) module was used for the study of recombinant proteins internalization. The miniSOG protein was originally engineered from LOV2-domain of Arabidopsis thaliana phototropin 2 for the use in electron microscopy as a source of reactive oxygen species [1], further it was shown that miniSOG can be used as a toxic module in genetically encoded targeted photosensitizers [2, 3]. But it turned out that it can be used for the study of internalization of receptors and recombinant proteins complexes because miniSOG has its own fluorescence that decreases when the protein enters into an endosome.

The miniSOG was used as a tool for the study of internalization of two targeting modules binding to ErbB2 (HER2) receptor that is overexpressed on the surface of breast, ovary and some other cancer cells: the 4D5scFv single-chain antibody and the artificial non-immunoglobulin DARPin_9-29 protein. The recombinant proteins DARPin-miniSOG and 4D5-miniSOG were produced in Escherichia coli BL21(DE3) strain and subsequently purified with the help of standard chromatography methods. The specific binding to ErbB2 on the surface of SK-BR-3 breast adenocarcinoma cells was verified with flow cytometry method. The proteins internalization in the complex with the receptor was also evaluated with confocal microscopy.

The fluorescent features of miniSOG are stable in a wide range of pH meanings (from 4 to 10 pH units), but when miniSOG is trapped in the endosome the fluorescence intensity significantly decreases probably due to the FMN cofactor reduction. Flow cytometry investigation of the targeting modules had shown that DARPin-miniSOG/ErbB2 complexes internalize faster than 4D5scFv-miniSOG/ErbB2: the initial fluorescence intensity decreased twice in 10 minutes in case of DARPin-miniSOG and the same decrease took 30 minutes in case of 4D5scFv-miniSOG. The results correspond to the previously estimated toxicity of the recombinant photosensitizers. The toxicity expressed as IC50, the protein concentration it the presence of which 50% of the irradiated cells remain viable, was estimated as 0.8 μM for DARPin-miniSOG and 160 nM for 4D5scFv-miniSOG. As the KD estimated for the photosensitizers and ErbB2 with surface plasmon resonance is comparable (10 nM for 4D5-miniSOG/ERBb2 and 5 nM for DARPin-miniSOG/ERBb2) we can conclude that the main contribution in toxicity difference is made by the speed of internalization that determines the time of the complex presence on the cell membrane when the toxic effect is maximal.

Thus, we have shown that the miniSOG protein can be used for the study of internalization of ErbB2 receptor after its binding with targeting modules used for theranostic agents delivery. As a component of recombinant proteins miniSOG can be used for investigation of internalization of other proteins that are used as targets for delivery of drugs to disease focus.

References:
1. Shu X., Lev-ram V., Deerinck T. J., Qi Y., Ramko E. B., Michael W., Tsien R. Y. A Genetically Encoded Tag for Correlated Light and Electron Microscopy of Intact Cells , Tissues , and Organisms // PLoS Biology. 2011. Vol. 9. №4. 2. Mironova K. E., Proshkina G. M., Ryabova A. V, Stremovskiy O. A, Lukyanov S. A., Petrov R. V, Deyev S. M. Genetically encoded immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro // Theranostics. 2013. Vol. 3. №11. P 831–40. 3. Proshkina G. M., Shilova O. N., Ryabova A. V., Stremovskiy O. A., Deyev S.M. A new anticancer toxin based on HER2/neu-specific DARPin and photoactive flavoprotein miniSOG // Biochimie. 2015. Vol. 118. P. 116-122.

Grant: The study is supported by the Russian Basic Research Foundation grant №16-34-00859.

УДК: 616-004.6, ББК:

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СВОЙСТВ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ И МАГНИЙ-ФОСФАТНЫХ БИОНОВ

Д.К.Шишкова[1], А.Г.Кутихин[2]

[1]*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Россия, 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6, shishkovadk@gmail.com, 89516121144*
[2]*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Россия, 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6, antonkutikhin@gmail.com, 89609077067*

В условиях перенасыщения питательной среды солями синтезированы кальций-фосфатные и магний-фосфатные эндогенные наночастицы (бионы), представляющие собой сферические минерало-органические наночастицы с диаметром 100-250 нм, формирующие в жидкой среде агрегаты диаметром до 2000 нм. Проведена сравнительная оценка их морфологии и химического состава.

Ключевые слова: кальций-фосфатные бионы, магний-фосфатные бионы, наночастицы, патогенность, атеросклероз

Причиной абсолютного большинства (> 85%) смертей от ССЗ является атеросклероз [2], при котором в стенках артерий образуются бляшки, сужающие просвет сосудов [10]. Из клинических исследований известно, что повышенный уровень кальция и фосфора в сыворотке крови (гиперкальциемия и гиперфосфатемия) ассоциирован с атеросклерозом и его клиническими проявлениями, такими, как ишемическая болезнь сердца, острое нарушение мозгового кровообращения по ишемическому типу и заболевания периферических артерий [1, 4, 5]. Ранее было предположено, что кальций-фосфатные эндогенные наночастицы (бионы, КФБ) являются звеном регуляции фосфорнокальциевого гомеостаза, однако при избытке преципитирующих ионов кальция и фосфора или нарушении механизмов их выведения из биологических жидкостей, КФБ способны накапливаться в организме человека [3, 9].

В исследовании, проведенных нами ранее, было показано, что КФБ вызывают апоптоз и снижают жизнеспособность эндотелиальных клеток, способствуют синтезу провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8 и индуцируют гипертрофию интимы брюшной аорты крыс [3]. Также было продемонстрировано, что морфологическим субстратом данных эффектов является интернализация КФБ эндотелиальными клетками [3]. Таким образом, нам удалось доказать, что КФБ обладают токсичностью для эндотелия, что является триггером развития атеросклероза [7, 8]. Тем не менее, вопрос о специфичности эндотелиотоксического действия КФБ в сравнении с другими бионами остается открытым. В качестве группы сравнения были синтезированы магний-фосфатные бионы (МФБ), поскольку: 1) магний, как и кальций, относится к главной подгруппе IIгруппы периодической системы химических элементов, что позволяет предположить сходство морфологических свойств КФБ и МФБ; 2) отсутствуют работы, которые бы показывали прямую роль магния в развитии атеросклероза.

Цель работы - охарактеризовать морфологические свойства и химический состав МФБ в сравнении с КФБ.

Для синтеза использовали растворы CaCl2 (0,45M), MgCl2 (0,2M) и Na2HPO4*12H2O(0,2M), питательную среду Dulbecco'sModifiedEagle'sMedium (DMEM) и фетальную бычью сыворотку (ФБС, все – Sigma-Aldrich). Растворы инкубировались в течение суток при 4°C и далее центрифугировались при 200 000 xg (OptimaMAX-XP, BeckmanCoulter) в течение 1 ч при 4°C. Осадок бионов растворяли в бидистиллированной воде. Все вышеописанные процедуры осуществлялись в стерильных условиях.

Визуализацию бионов проводили методом сканирующей электронной микроскопии (HitachiS-3400N, Hitachi). Оба типа бионов представляли собой сферические частицы губчатой структуры диаметром 100-250 нм и располагались на стекле в виде кластеров. Кроме того, измерение размерности бионов в растворе методом динамического рассеяния света (ZetasizerNanoZS, MalvernInstruments) показало, что в жидкой среде они формируют стабильные агрегаты до 2000 нм в диаметре, со средним диаметром 690 нм (КФБ) и 530 нм (МФБ).

Для изучения минерального состава бионов применяли энергодисперсионную спектроскопию (XFlash 4010, Bruker), атомно-эмиссионную спектроскопию (iCAP 6500 Duo LA, ThermoScientific) и высокотемпературное каталитическое окисление (Flash 2000, ThermoScientific) с целью определения химических элементов, инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (Инфралюм ФТ-801, Симекс) для определения химических функциональных групп и рентгеновскую дифрактометрию (Bruker D8 ADVANCE, Bruker) для определения химической формулы входящих в состав бионов соединений. Было выявлено, что КФБ состоят из углерода, азота, кислорода, водорода, кальция и фосфора, а МФБ - из углерода, азота, кислорода, водорода, магния, кальция и фосфора. Оба типа бионов образуют фосфатные группы, при этом КФБ формируют гидроксиапатит [Ca10(PO4)6(OH)2] и карбонат-гидроксиапатит [Ca10(PO4)3(CO3)3(OH)2], а МФБ - гидрат фосфата магния [Mg2(P2O7)(H2O)] и хантит [Mg3Ca(CO3)4].

Литература.
1. Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study// Am Heart J. 2008.Vol.156. №3. P.556-563. 2. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013// Lancet. 2015;385(9963):117-71. 3. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Gutakovsky A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions// Sci Rep. 2016.6:27255. 4. Larsson T.E., Olauson H., Hagström E., Ingelsson E., Arnlöv J., Lind L., Sundström J. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community// Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010. Vol.30.№2. P.333-339. 5. Lind L., Skarfors E., Berglund L., Lithell H., Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years// J Clin Epidemiol. 1997. Vol.50. №8. P.967-973. 6. Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030// PLoS Med. 2006. Vol.3. №11. P.e442. 7. Tabas I., García-Cardeña G., Owens G.K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis// J Cell Biol. 2015. Vol.209. №1. P.13-22. 8. Veerasamy M., Bagnall A., Neely D., Allen J., Sinclair H., Kunadian V. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: a state of the art review// Cardiol Rev. 2015. Vol.23. №3. P.119-129. 9. Wu C.Y., Young L., Young D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids// PLoS One. 2013. Vol.8. №9. P.e75501. 10. Yurdagul A., Finney A.C., Woolard M.D., Orr A.W. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis// Biochem J. 2016. Vol.473. №10. P.1281-1295.

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF CALCIUM PHOSPHATE BIONS AND MAGNESIUM PHOSPHATE BIONS

D.Shishkova, A.Kutikhin

[1]*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Russia, 650002, Kemerovo, Sosnovy Boulevard , 6*

Here we artificially synthesized calcium phosphate bions and magnesium phosphate bions, which represent spherical mineralo-organic nanoparticles of 100-250 nm diameter, capable of forming up to 2000 nm diameter aggregates in liquids. Furthermore, we performed a comprehensive morphological and chemical characterization of these particles.

Key words: calcium phosphate bions, magnesium phosphate bions, nanoparticles, pathogenic effects, atherosclerosis

The most common cause of CVD-related deaths (> 85%) is atherosclerosis [2], or the narrowing of blood vessels with plaque formation, which hinders normal blood flow and can lead to vasculature failure [10]. As known from clinical studies, increased serum calcium and phosphorus levels are associated with coronary artery disease, cerebrovascular events, and peripheral artery disease [1, 4, 5]. Calcium phosphate bions (CPB) represent a physiological mechanism regulating the function, transport and disposal of calcium and phosphorus in the human body; however, CPB can accumulate in the body upon an excess of precipitating calcium and phosphate ions or a failure of clearance mechanisms in the body fluid or cell milieu [3, 9].

In a recent study, we showed that CPB can be isolated from three-fourths of human atherosclerotic plaques [3]. We then revealed that CPB promoted caspase-dependent apoptosis in endothelial cells, stimulated production of IL-6 and IL-8, which are established pro-atherosclerotic cytokines, and induced intimal hyperplasia in vivo[3]. Furthermore, we demonstrated internalization of CPB by endothelial cells [3]. Therefore, we found that CPB elicit endothelial toxicity, which, in turn, defines their pathogenic effects since it is a crucial point in the development of atherosclerosis [7, 8]. Nevertheless, it is still unclear whether endothelial toxicity of CPB is specific or is caused simply by a mechanical damage of cell organelles.

We selected magnesium phosphate bions (MPB) for the comparison with CPB since: 1) both magnesium and calcium belong to the second group of chemical elements in periodic table; 2) magnesium does not play any direct role in atherosclerosis.

Aim: to characterize morphology and chemical composition of MPB compared to CPB.

For artificial synthesis, we used CaCl2 (0,45M), MgCl2 (0,2M), and Na2HPO4*12H2O (0,2M) solutions, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), and fetal bovine serum (FBS, all reagents were purchased from

Sigma-Aldrich). Solutions were incubated for 24 h at 4°C and were then centrifuged at 200 000 x g (Optima MAX-XP, Beckman Coulter) for 1 h at 4°C following dilution in double distilled water. All the procedures were performed under sterile conditions.

Visualization was carried out utilizing scanning electron microscopy (Hitachi S-3400N, Hitachi). Both CPB and MPB were spherical spongeous of 100-250 nm diameter and formed clusters of particles. Dynamic light scattering measurements (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) demonstrated that both types of bions formed aggregates of up to 2000 nm diameter, with a mean diameter of 690 nm and 530 nm for CPB and MPB, respectively.

For chemical characterization, we applied energy-dispersive spectroscopy (XFlash 4010, Bruker), atomic emission spectroscopy (iCAP 6500 Duo LA, Thermo Scientific), and high temperature catalytic oxidation (Flash 2000, Thermo Scientific) to determine the chemical elements, Fourier transform infrared spectroscopy (Infralum FT-801, Simex) to define the functional groups, and X-ray powder diffractometry (Bruker D8 ADVANCE, Bruker) to identify the chemical formula. We found that CPB consist of carbon, nitrogen, oxygen, hydrogen, calcium, and phosphorus while MPB were composed of similar elements adding magnesium. Both CPB and MPB formed phosphate groups, with CPB forming hydroxylapatite [Ca10(PO4)6(OH)2] and carbonate-hydroxylapatite [Ca10(PO4)3(CO3)3(OH)2] and MPB forming magnesium phosphate hydrate [Mg2(P2O7)(H2O)] and huntite [Mg3Ca(CO3)4].

References:
1. Foley R.N., Collins A.J., Ishani A., Kalra P.A. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study// Am Heart J. 2008.Vol.156. №3. P.556-563. 2. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013// Lancet. 2015;385(9963):117-71. 3. Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A., Glushkova T.V., Borisov V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Filip'ev D.E., Golovkin A.S., Shishkova D.K., Burago A.Y., Frolov A.V., Dolgov V.Y., Efimova O.S., Popova A.N., Malysheva V.Y., Vladimirov A.A., Sozinov S.A., Ismagilov Z.R., Russakov D.M., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Gutakovsky A.K., Zhivodkov Y.A., Demidov E.A., Peltek S.E., Dolganyuk V.F., Babich O.O., Grigoriev E.V., Brusina E.B., Barbarash O.L., Yuzhalin A.E. Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions// Sci Rep. 2016.6:27255. 4. Larsson T.E., Olauson H., Hagström E., Ingelsson E., Arnlöv J., Lind L., Sundström J. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community// Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010. Vol.30.№2. P.333-339. 5. Lind L., Skarfors E., Berglund L., Lithell H., Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years// J Clin Epidemiol. 1997. Vol.50. №8. P.967-973. 6. Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030// PLoS Med. 2006. Vol.3. №11. P.e442. 7. Tabas I., García-Cardeña G., Owens G.K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis// J Cell Biol. 2015. Vol.209. №1. P.13-22. 8. Veerasamy M., Bagnall A., Neely D., Allen J., Sinclair H., Kunadian V. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: a state of the art review// Cardiol Rev. 2015. Vol.23. №3. P.119-129. 9. Wu C.Y., Young L., Young D., Martel J., Young J.D. Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids// PLoS One. 2013. Vol.8. №9. P.e75501. 10. Yurdagul A., Finney A.C., Woolard M.D., Orr A.W. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis// Biochem J. 2016. Vol.473. №10. P.1281-1295.

УДК: УДК 577.212.3+ 577.112.083, ББК:

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ ЛАНОСТЕРОЛА СО СТЕРОЛ-14А-ДЕМЕТИЛАЗОЙ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ

Т.В.Шкель[1], Л.А.Калужский [2], А.А.Гилеп[1], С.А.Усанов[1], М.А.Черновецкий[3]

[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141, Минск, Академика Купревича, 5/2, tvshkel@iboch.bas-net.by, +375292750156
[2]ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10/8, la-kaluzhskiy@yandex.ru, +7-499-246-71-15
[3]РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Беларусь, 223053, д. Боровляны, Фрунзенская, 43, tchernovetski@mail.ru, +375 (17) 265-40-79

Проведен молекулярный анализ гена CYP51 из различных резистентных штаммов патогенных грибов, выявлены однонуклеотидные замены, приводящие к замене аминокислотной последовательности. Получены рекомбинантные мутантные формы стерол-14а-деметилазы (CYP51) резистентных штаммов патогенных грибов C. albicans и C. glabrata и изучены их лиганд-связывающие свойства.

Ключевые слова: стерол-14α-деметилаза, молекулярный анализ гена, азолы, окисленные стероидные соединения, микоз.

Микозы являются широко распространенными инфекционными заболеваниями, которые вызываются паразитическими грибами (более 400 видов грибов вызывают болезни у людей и данный список пополняется в среднем на 10 видов в год). В последние десятилетия наблюдается существенное увеличение частоты и тяжести грибковых инфекций, что связано с широким спектром патогенных агентов, а также с появлением устойчивых к противогрибковым препаратам штаммов.

Цитохром P450 стерол-14α-деметилаза (CYP51) участвует в биосинтезе эргостерола и является главной мишенью для противогрибковых препаратов класса азолов [1]. Одним из механизмов устойчивости к антифунгальным препаратам является изменение сродства фермента к азольным соединениям, вызванное аминокислотными заменами [2].

Нами проведено молекулярное клонирование стерол-14α-деметилаз резистентных штаммов патогенных грибов, выделенных из клинических образцов биологического материала от пациентов с сопутствующими грибковыми инфекциями (инвазивными микозами) на фоне основной онкологической и гематологической патологии (C. albicans, C. guilliermondii, C. glabrata). В CYP51 Candidaalbicansбыли обнаружены четыре новые аминокислотные замены, которые располагались в пределах или вблизи сайтов распознавания субстрата (SRS) цитохромов P450 [3]: K179E (находится в районе D- спирали); L224I (F-спираль, рядом с SRS2 участком); G307C (I-спираль, является частью участка SRS4); M372T (K-спираль, располагается рядом с SRS5 участком). В CYP51 Candidaguilliermondiiбыла идентифицирована одна новая аминокислотная замена C37W. В CYP51 Candidaglabratabыли обнаружены две новые аминокислотные замены - S440C и G450D (расположены вблизи L-спирали). Для оценки влияния мутаций у разных видов патогенных грибов на чувствительность к азольным фунгицидам и на выполняемые ферментами функции нами были экспрессированы в E.coli и очищены мутантные формы CYP51 C. albicans и C. glabrata. Также нами были проведены спектральные исследования лиганд-связывающих свойств данных ферментов с лекарственными средствами азолового ряда, широко используемыми в противогрибковой терапии, и сельскохозяйственными пестицидами. Наши экспериментальные данные для мутантной формы CYP51 C. albicans K179E_L224I_G307C_M372T выявили отсутствие связывания фермента с флуконазолом и вориконазолом, что указывает на ассоциацию данных замен с развитием резистентности к азолам. CYP51 C. glabrata проявляет достаточно высокое сродство к азольным препаратам, что может быть объяснено другими механизмами возникновения резистентности, которые не связаны с CYP51. Наряду с классическими препаратами азолового ряда в качестве потенциальных лигандов CYP51 грибов нами также были протестированы уникальные окисленные стероидные соединения, выделенные из морских звезд, растений (которые были предварительно исследованы в экспериментах на биосенсоре) и аналоги ланостерола, которые содержат атомы азота в своей структуре.

Наблюдаемое высокое сродство к ферментам некоторых из рассматриваемых соединений побуждает нас к их дальнейшему изучению в качестве потенциальных и селективных ингибиторов стерол 14α-деметилаз патогенных грибов.

Литература.
1. Strushkevich N., Usanov S.A., Park H.W. Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles // J Mol Biol. 2010.Vol. 397. № 4. P. 1067-78. 2. Morio F., et al., Screening for amino acid substitutions in the Candida albicans Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature.// Diagn Microbiol Infect Dis. 2010. Vol. 66. № 4. P. 373-84. 3. Gotoh O., Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences // J Biol Chem. 1992. Vol. 267. № 1. P. 83-90.

Финансирование: Государственная программа «Наукоемкие технологии и техника» на 2016 – 2020 годы Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы

INVESTIGATION OF INTERACTION OF STRUCTURAL LANOSTEROL'S ANALOGS WITH STEROL 14A-DEMETHYLASE FROM PATHOGENIC FUNGI CAUSING NOSOCOMIAL INFECTIONS

T.Shkel[1], L.Kaluzhskiy[2], A.Gilep[1], S.Usanov[1], M.Chernovetsky[3]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus, Belarus, 220141, Minsk, Academician V.F.Kuprevich Street, 5/2
[2]Institute of Biomedical Chemistry, Russia, 119121, Moscow, Pogodinskaya Street, 10/8
[3]Center for pediatric oncology, hematology and immunology, Belarus, 223053, v. Borovlyani, Frunzenskaya Street, 43

Molecular analysis of CYP51 gene from various resistant strains of pathogenic fungi was performed. Single nucleotide substitutions leading to replacement of the amino acid sequence were identified. Recombinant mutant forms of sterol-14a-demethylase (CYP51) of pathogenic fungi resistant strains C. albicans and C. glabrata were purified and spectral assays of their ligand-binding properties were performed.

Key words: sterol-14α-demethylase, molecular analysis of the gene, azoles, oxidized steroidal compounds, mycosis

Mycoses are widespread infectious diseases caused by parasitic fungi (more than 400 species of fungi cause diseases in humans and the list is replenished by an average of 10 species per year). There is a great increase in the frequency and severity of fungal infections in recent decades, associated with a broad range of pathogenic fungi, as well as the emergence of resistant to antifungal drugs strains.

The cytochrome P450 sterol 14α-demethylase (CYP51) is involved in ergosterol biosynthesis and is the primary target for antifungals of azole class [1]. Changes of the enzyme's affinity to azoles, caused by amino acid substitutions, have been reported as one of the mechanism of resistance to antifungals [2].

We performed molecular cloning of sterol 14α-demethylases from fungi isolated from immunocompromised patients with nosocomial infections which were resistant to antifungal therapy (C. albicans, C. guilliermondii, C. glabrata). In CYP51 of Candida albicans four new amino acid substitutions were identified and found to be located in or near substrate recognition sites (SRS) of P450 enzyme [3]: K179E (located in the D helix); L224I (F helix, near the SRS2); G307C (I helix, part of the SRS4); M372T (K helix, near the SRS5). In CYP51 of Candida guilliermondii one new amino acid substitution, C37W was identified. In CYP51 of Candida glabrata two new amino acid substitutions, S440C and G450D (located near L helix) was identified. To estimate effects of mutations in different species onazole fungicide sensitivity and intrinsic protein function mutant forms of C. albicans and C. glabrata CYP51 were expressed in E.coli, purified and performed spectral binding assays with marketed azole drugs and agricultural pesticides. Our experimental data for C. albicans K179E_L224I_G307C_M372T mutant show no binding with fluconazole and voriconazole indicating association of these substitutions with azole resistance of this pathogenic fungus. C. glabrata CYP51 shows sufficiently high affinity to marketed azole drugs that could be explain with some other resistance mechanisms that don't connected with CYP51. Along with classic azole drugs we also tested unique oxidizedsteroidal compounds isolated from marine genera stars, plants (that was preliminarily tested in biosensor experiments) and analogs of lanosterol that contain nitrogen atoms in their structure as potential ligands of fungal CYP51.

High affinity some of these compounds was observed and encourage us to further explore this chemical scaffold as potential and selective inhibitors of fungal sterol 14α-demethylases.

References:
1. Strushkevich N., Usanov S.A., Park H.W. Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles // J Mol Biol. 2010.Vol. 397. № 4. P. 1067-78. 2. Morio F., et al., Screening for amino acid substitutions in the Candida albicans Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature.// Diagn Microbiol Infect Dis. 2010. Vol. 66. № 4. P. 373-84. 3. Gotoh O., Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences // J Biol Chem. 1992. Vol. 267. № 1. P. 83-90.

Grant: The state program «High technologies and equipment» for 2016 - 2020 years Program of Basic Scientific Research of National Science Academies for 2013–2020

УДК: 576.532, ББК: 28.05

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ СНО ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ.

А.П.Шмакова[1], А.А.Кичёва[1], А.И.Таранов[1], А.В.Кононов[1], Ю.И.Басовский[1], С.В.Дидук [1], Р.А.Иванов[2]

[1]ЗАО БИОКАД, Россия, 142380, Московская обл., п.Любучаны Чеховский р-н shmakova.ap@biocad.ru, 8 985 154 11 61
[2]ЗАО БИОКАД, Россия, 198515, п.Стрельна, г. Санкт-Петербург, ул. Связи, д. 34, лит. А, shmakova.ap@biocad.ru, 8 985 154 11 61

С использованием генно-инженерных методов и путем клонирования культуры клеток CHO, были получены оптимизированные родительские линии-реципиенты, предназначенные для создания высокоэффективных продуцентов моноклональных антител (МКА). В данной работе показаны преимущества линий-реципиентов (пролонгированность роста в условиях feed batch культивирования и увеличение количества экспрессируемого целевого АТ) по сравнению с исходными немодифицированными линиями-предшественниками.

Ключевые слова: Клетки яичников китайского хомячка (CHO), моноклональное антитело, высокопродуктивные стабильные клеточные линии, апоптоз

Создание высокопродуктивных клеточных линий, используемых в биотехнологии, является важной задачей, решение которой позволит сократить затраты на производство целевого продукта и, как следствие, снизить его себестоимость.

Клетки яичников китайского хомячка (CHO) - одна из наиболее широко используемых культур клеток млекопитающих в качестве линий-реципиентов для промышленного производства рекомбинантных моноклональных антител фармацевтического назначения в медицинской биотехнологии.

В настоящее время существуют различные подходы, направленные на оптимизацию линий-реципиентов, от наиболее традиционных, связанных с использованием селекции исходной родительской линии, до современных молекулярно-генетических, позволяющих регулировать и блокировать сигнальные каскады клетки, влияя на апоптоз, трансляцию матричной РНК и другие внутриклеточные процессы.

Важнейшим фактором, оказывающим влияние на количество экспрессируемого линией-продуцентом белка,является длительное сохранение ее высокой жизнеспособности в процессе культивирования. Известно, что в формате feed-batch культивирования, клетки подвергаются апоптозу, в результате чего наблюдается резкое снижение жизнеспособности клеточной культуры и, как следствие, сокращение общего времени процесса. Одним из решений данной проблемы может служить нокаут ключевых генов триггеров апоптоза, либо увеличение активности ряда генов, ответственных за экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 семейства, препятствующих запуску этого процесса. В ходе выполнения первого этапа работы проводилась трансфекция исходной линии вектором, содержащим соответствующие последовательности антиапоптотических генов, с дальнейшей селекцией, в результате чего были получены и проанализированы 19 клональных линий с подтвержденной оверэкспрессией генов-мишеней. В ряде полученных таким образом клонов наблюдалось двукратное пролонгирование жизнеспособности клеточной культуры с 10-11 дней в контроле до 18-21 дня в вариантах с оверэкпрессией. Кроме того, практически у всех продуцентов, полученных таким образом, выявлено закономерное увеличение целевого продукта с 1,3-2,0 до 2,6-2,9 г/л.

Оверэкспрессия генов может требовать от клетки дополнительных ресурсов, что не позволяет реализовывать ее потенциал в полной мере. С целью исключения этого фактора, на втором этапе работы было принято решение получить клеточную линию с нокаутом генов проапоптотического действия, участвующих в запуске митохондриального пути апоптоза. В результате, после длительной селекции были отобраны и проанализированы 18 клеточных линий, нокаутных по двум исследуемым генам этого семейства. Во всех вариантах наблюдалось пролонгирование жизнеспособности и двукратное увеличение титров у продуцентов целевого белка, в сравнении с контролем.

Клеточные культуры, в том числе культура CHO, как правило, представляет собой гетерогенную популяцию клеток, субклоны которой могут обладать отличными от исходной линии физиологическими характеристиками.

Исходя из этого, было решено провести клонирование родительской клеточной линии с использованием ClonePix, с последующей селекцией и отбором субклонов с необходимыми характеристиками. В результате проведенной работы, было проанализировано более 600 субклонов в разных форматах культивирования, из которых, с учетом значений пиковых плотностей и жизнеспособности, в дальнейшую работу были отобраны 5 лучших кандидатов. Полученные субклоны значительно отличались от исходной родительской линии более высокой скоростью пролиферации, пролонгированной жизнеспособностью, метаболическим профилем. Выбранные линии далее использовались для получения клонов-продуцентов, которые показали более высокие значения продуктивности (с 1,0-1,65 до 2,0-2,7 г/л) в сравнении с контрольной родительской линией.

Таким образом, используя различные методы оптимизации линии-реципиента, нам удалось создать клеточные линий, позволяющие получить продуценты моноклональных антител с улучшенными ростовыми характеристиками и выходом целевого белка в среднем на 49% выше, чем в исходной клеточной линии.

Таким образом, используя различные методы оптимизации линии-реципиента, нам удалось создать клеточные линий, позволяющие получить продуценты моноклональных антител с улучшенными ростовыми характеристиками и выходом целевого белка в среднем на 49% выше, чем в исходной клеточной линии.

METHODS FOR OBTAINING OF HIGH-YIELDING CHO CELL LINES WITH THE AIM OF PRODUCING OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR PHARMACEUTICAL PURPOSES BY GENETICS AND CELL ENGINEERING APPROACHES

A.Shmakova[1], A.Kicheva[1], A.Taranov[1], A.Kononov[1], Y.Basovskiy [1], S.Diduk[1], R.Ivanov[2]

[1]CJSC BIOCAD , Russia, 142380, Moscow region , Villadge Lyubuchany, Chekhov district,
[2]CJSC BIOCAD , Russia, 198515, Strelna , St.Petesburg Svyazi str., 34, lit. A.

The optimized parent recipient lines for creation of highly-yielding monoclonal antibodies (mAb) producers have been obtained by genetically engineered modifications and cloning of CHO cell culture. It was shown the advantages of recipient lines (the prolonged growth in feed batch culture and increasing the amount of expressed target AT) relative to the parent unmodified parent lines.

Key words: Chinese hamster ovary (CHO) cells, monoclonal antibody, highly-yielding continuous cell lines, apoptosis

The creation of high-yielding cell lines used in biotechnology is an important task the solution of which will significantly reduce the cost of the desired product production and, consequently, reduce its base cost.

Chinese hamster ovary (CHO) cells are one of the most widely used mammalian cell cultures as recipient cells for the industrial production of recombinant monoclonal antibodies for pharmaceutical use in the medical biotechnology.

Currently, there are different approaches to optimize of the recipient lines. Ones of them are the most traditional and associated with the selection of the initial parental lines. And others are used modern molecular genetics to regulate and block of the cell signaling pathways, affecting on apoptosis, translation of the messenger RNA and other intracellular processes.

One of the most important factors that influences on the amount of the target protein expressed by the producer-line is a long-term maintaining of its high viabilityduring cultivation. It is known that at the feed-batch cultivation cells undergo apoptosis as a result it is observed a sharp decrease in its viability and thus the reducing of the cultivation total time. One of the solution to this problem may be key triggers apoptosis genes knockout, or increasing of the activity of some genes of Bcl-2 family protein with anti-apoptosis activity, which are inhibit the process initiation.

In the course of the first step of our work the parent line was transfected with the vector carrying corresponding anti-apoptosis genes sequences with following selection. Such approach allowed us to obtain and analyse the 19 clonal lines with confirmed target gene overexpression. In certain obtained clones it was observed a twofold prolongation of the cell culture viability from 11-12 days in the control to 18-21 days in the overexpression variants. In addition, we have found a regular increase of the desired productivity from 1.3-2.0 up to 2.6-2.9 g/L in the most of obtained clones.

It is known that gene overexpression may require additional cell resources, which does not allow to realize cell full potential. In order to avoid this, on the second step of our work it was decided to create a knockout cell line lacking proapoptotic activity genes which are involved in the mitochondrial apoptotic pathways initiation. As a result, after a continuous selection process the 18 knockout cell lines lacking studied two family genes were obtained and analyzed. In all generated lines it has found a viability prolongation and increasing of target protein titers compared to control.

It is known that CHO cell culture as any others is a heterogeneous population of cells which subclones may possess some physiologic characteristics that are different from parent line. Based on this, it was decided to clone the parent cell line with subsequent selection and screening of subclones that possessed desired characteristics using ClonePix FL robotic system.

Consequently, it has been analyzed more than 600 subclones in different cultivation formats. Then the 5 best candidates were selected for the further work based on the peak density values and viability. The resulting subclones were significantly different from the original parent line by higher proliferation rate, prolonged viability and metabolic

profile. Selected lines were used further to producer clones creation, which showed higher productivity values (from 1,0-1,65 to 2,0-2,7 g/L) compared to the control parental line.

Thus, using different approaches to the optimization of the recipient cell line we were able to establish cell lines that allow us to obtain the monoclonal antibodies producers with enhanced growth characteristics and the target protein yield on average 49% higher compared to parental cell line.

Thus, using different approaches to the optimization of the recipient cell line we were able to establish cell lines that allow us to obtain the monoclonal antibodies producers with enhanced growth characteristics and the target protein yield on average 49% higher compared to parental cell line

УДК: 615.032.13 , ББК: 28

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ С КОМПОНЕНТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.

В.А.Щелконогов[1], Г.М.Сорокоумова[1], О.А.Баранова[2], А.В.Чеканов[2], А.В.Клочкова[2], А.Д.Левин [3], К.Д.Казаринов [4]

[1]Московский технологический университет (МИТХТ) , Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского, д.86, rector@mirea.ru, +7 (499) 215-65-65
[2]Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, rsmu@rsmu.ru, 8 (495) 434-31-74
[3]ФГУП ВНИИОФИ , Россия, 119361, Москва, ул. Озерная, д.46, pochta@vniiofi.ru, 8 (495) 437-56-33
[4]ФГБУН Институт радиотехники и электроники имени В. А. Котельникова РАН, Россия, 141190 , г. Фрязино Московской области, пл. Введенского, д. 1, ire@cplire.ru, +7(496)565-24-00

Изучено взаимодействие липосом, содержащих липоевую кислоту (ЛК) с компонентами крови человека: плазмой, нейтрофилами и тромбоцитами. Методом динамического светорассеяния (ДРС) показано, что инкубирование в течение 1 часа липосомальной формы ЛК в плазме крови здоровых доноров не приводит к изменению размеров липосом. Методом люминол зависимой хемилюминисценции (ЛХЛ) установлено, что липосомы, содержащие ЛК, подавляют ЛХЛ нейтрофилов, предварительно активированных форболом-12-миристат-13-ацетатом (ФМА).

Ключевые слова: липосомы, α-липоевая кислота, нейтрофилы, динамическое светорассеяние.

Липосомы широко используются для направленной доставки различных лекарственных препаратов. В основном в медицинской практике применяется внутривенное введение липосомальных препаратов [1]. Поэтому необходимо иметь информацию об их взаимодействии с липопротеиновыми комплексами и клетками крови (нейтрофилы, тромбоциты).

Целью данной работы является изучение взаимодействия липосомальной формы α-липоевой кислоты с плазменными и клеточными компонентами крови человека.

Ранее были получены липосомы с ЛК, которые представляют собой частицы сферической формы с размером 130 нм, характеризующиеся эффективностью включения субстанции равной 85% и стабильностью при длительном хранении (Т = +4ºС). Также было показано, что липосомы с ЛК обладают антиагрегационным действием [2].

В настоящей работе оценивалось поведение липосом с ЛК в плазме крови здоровых доноров. Плазма крови представляет собой многокомпонентную биологическую систему, имеющую в своем составе различные белки и белок-липидные комплексы [3]. Поэтому, попадая в плазму, липосомы могут взаимодействовать со всеми ее компонентами, что приводит к увеличению размеров данных наночастиц и изменению их свойств. В ходе исследования агрегации (изменения размеров) наноконструкций и их взаимодействия с компонентами плазмы при помощи метода ДРС была использована модельная система «плазма крови + липосомы». В результате проведенных экспериментов было установлено, что в процессе инкубации в плазме (в течение 1 часа), как «пустых» липосом, так и липосом с ЛК не происходит существенного изменения их размеров. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии изменения гидродинамического диаметра липосом в ходе их взаимодействия с компонентами плазмы.

Одними из форменных элементов плазмы крови являются нейтрофилы, способные генерировать активные формы кислорода (АФК) в присутствии различных активаторов. В данной работе были проведены сравнительные исследования процесса образования АФК при активации нейтрофилов крови человека с применением метода люминол-зависимой хемилюминесценции при добавлении к ним «пустых» липосом, липосомальной и водорастворимой форм ЛК в виде её этилендиаминовой соли. В качестве активатора нейтрофилов использовали форбол-12-миристат-13-ацетат.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что добавление ФМА к нейтрофилам приводило к увеличению интенсивности люминол зависимой хемилюминисценции нейтрофилов. В свою очередь добавление «пустых» липосом и липосом с ЛК приводило к значительному снижению интенсивности ЛХЛ нейтрофилов, активированных ФМА. Вероятнее всего этот результат свидетельствует об уменьшении образования активных форм кислорода (АФК), что подтверждает об антиоксидантные свойства липосом. Важно отметить, что данный эффект был наиболее выражен при использовании липосомальной формы ЛК.

Кроме того, было установлено, что добавление к нейтрофилам этилендиаминовой соли альфа-липоевой кислоты в количестве равном ЛК в липосомах увеличивает интенсивность их хемилюминесценции, проявляя, по-видимому, прооксидантные свойства.

Таким образом, проведенные исследования в данной работе показывают, что липосомы с ЛК обладают определенной стабильностью в плазме крови и проявляют антиоксидантные свойства, что указывает на возможность использования их в качестве терапевтического средства.

В результате проведенных исследований было установлено , что в процессе инкубации в плазме (в течение 1 часа), как «пустых» липосом, так и липосом с ЛК не происходит существенного изменения их размеров. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии изменения гидродинамического диаметра липосом в ходе их взаимодействия с компонентами плазмы. Было обнаружено, что добавление ФМА к нейтрофилам приводило к увеличению интенсивности люминол зависимой хемилюминисценции нейтрофилов. В свою очередь добавление «пустых» липосом и липосом с ЛК приводило к значительному снижению интенсивности ЛХЛ нейтрофилов, активированных ФМА. Вероятнее всего этот результат свидетельствует об уменьшении образования активных форм кислорода (АФК), что подтверждает об антиоксидантные свойства липосом. Важно отметить, что данный эффект был наиболее выражен при использовании липосомальной формы ЛК. Кроме того, было установлено, что добавление к нейтрофилам этилендиаминовой соли альфа-липоевой кислоты в количестве равном ЛК в липосомах увеличивает интенсивность их хемилюминесценции, проявляя, по-видимому, прооксидантные свойства. Таким образом, проведенные исследования в данной работе показывают, что липосомы с ЛК обладают определенной стабильностью в плазме крови и проявляют антиоксидантные свойства, что указывает на возможность использования их в качестве терапевтического средства.

Литература.
1. Mahallagam J., Nemunaitis J. et al. Phase-I study of intravenously administered ATI-1123, a liposomal docetaxel formulation in patients with advanced solid tumor.// Cancer Chemother Pharmacol. 2014; 74: 1241-1250 с. 2. Щелконогов В.А., Сорокоумова Г.М., Баранова О.А. и др. Липосомальная форма липоевой кислоты: получение и определение антиагрегационной и антиоксидантной активности.// Биомедицинская химия. 2016, 5, 577-583 с. 3. Campbell M. K., & Farrell S. O. Biochemistry (5ed.). // Thomson Books Cole., 2006., 793 с.

Финансирование: За счет средств бюджета университетов : Московский технологический университет (МИТХТ), Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России и Институт радиотехники и электроники имени В. А. Котельникова РАН (Фрязинский филиал)

THE INTERACTION OF THE LIPOSOMAL FORMS OF LIPOIC ACID WITH THE COMPONENTS OF HUMAN BLOOD.

V.Shchelkonogov[1], G.Sorokoumova [1], O.Baranova[2], A. Chekanov [2], A.Klochkova[2], A.Levin [3], K.Kazarinov [4]

[1]Moscow technological University (MITHT), Russia, 119571, Moscow, Vernadsky prospectus, 86
[2]Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU) , Russia, 117997, Moscow, Ostrovitianov str. , 1
[3]VNIIOFI, Russia, 119361, Moscow, Ozernaya st. , 46
[4]Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, RAS (Fryasino branch) , Russia, 141190, Moscow region, Fryazino, Vvedensky sq. , 1

Interaction of the liposomes, containing lipoic acid (LA), with the components of human blood such as: plasma, neutrophils and platelets is studied. Using dynamic light scattering (DLS) technique, it is shown, that incubation for 1 hour of the liposomal form of LA in blood plasma of healthy donors doesn't change the size of the liposomes. Using the luminal-dependent chemiluminescence (LDC) technique, it is established, that the liposomes, containing LA, suppress LDC of neutrophils, previously activated by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA).

Key words: liposomes, α-lipoic acid, neutrophils, dynamic light scattering

Liposomes are widely used for targeted delivery systems of various drugs.Substantially, in medical practice intravenous administration (injection) of the liposomal medicines is used [1].Therefore, it is necessary to have information about their interaction with lipoprotein complexes and blood cells (such as: neutrophils, platelets).

The aim of this work is to investigate the interaction of the liposomal form of α-lipoic acid with plasmatic and cellular components of human blood.

Previously, liposomes with LA were obtained, which areparticles of spherical form (shape) with size of nanoconstructions 130 nm, characterized by the encapsulation efficiency of a substance equal to 85% and the stability during long - term storage (T = + 4ºC). It was also shown that the liposomes with LA possess antiplatelet activity [2].

In the present research work the behavior of liposomes with LA in the blood plasma of healthy donorswas estimated. Blood plasma is a multicomponent biological system, including in its composition various proteins and protein-lipid complexes [3]. Therefore, entering (getting) into the plasma, the liposomes can interact with all its components, which leads to increase in size of these nanoparticles and change of their properties. As a part of the study of nanostructures aggregation (change of their size) and their interaction with components of the plasma, using dynamic light scatteringtechnique, the model system «plasma + liposomes» was applied. As a result of conducted experiments, it was found, that during the process of incubation whether «empty» liposomes or liposomes with lipoic acid in blood plasma (within 1 hour), there is no significant changes in their size. The obtained data indicate absence of changes of hydrodynamic diameter of liposomes during their interaction with components of plasma.

Neutrophils are one of the formed elements of blood plasma, which are capable to generate reactive oxygen species (ROS) in the presence of different activators. In present research work there were carried out comparative studies of the formation of ROS during activation of neutrophils, isolated from human blood, with using the method of luminal-dependent chemiluminescence, on addition of «empty» liposomes, the liposomal and water-soluble forms of LA as its ethylene diamine salt to these cells.As an activator of neutrophils there were used phorbol-12-myristate-13-acetate.

As the result of studies, it was revealed, that addition of PMA to neutrophils resulted in increase of intensity of luminal-dependent chemiluminescence of neutrophils.In turn, addition of the «empty» liposomes and liposomes with LA lead to the significant decrease of intensity of LDC of neutrophils, previously activated by PMA.Most likely this resultdemonstrates the reduction of formation of reactive oxygen species(ROS), which confirms the antioxidant properties of liposomes.It is important to note that this effect was most pronounced when using the liposomal form of LA.

Furthermore, it was established that the addition to neutrophils of ethylene diamine salt of LA in amount, equal to lipoic acid in liposomes, increases intensity of their chemiluminescence, showing, apparently, pro-oxidant properties.

Thus, the conducted researches in this work show, that liposomes with lipoic acid have aт estimate stability in blood plasma and exhibit antioxidant properties, which indicates possibility of their use as a therapeutic agent.

As the result of research studies, it was found, that during the process of incubation whether «empty» liposomes or liposomes with lipoic acid in blood plasma (within 1 hour), there is no significant changes in their size. The obtained data indicate absence of changes of hydrodynamic diameter of liposomes during their interaction with components of plasma. It was revealed, that addition of PMA to neutrophils resulted in increase of intensity of luminal-dependent chemiluminescence of neutrophils.In turn, addition of the «empty» liposomes and liposomes with LA lead to the significant decrease of intensity of LDC of neutrophils, previously activated by PMA.Most likely this resultdemonstrates the reduction of formation of reactive oxygen species(ROS), which confirms the antioxidant properties of liposomes.It is important to note that this effect was most pronounced when using the liposomal form of LA. Furthermore, it was established that the addition to neutrophils of ethylene diamine salt of LA in amount, equal to lipoic acid in liposomes, increases intensity of their chemiluminescence, showing, apparently, pro-oxidant properties. Thus, the conducted researches in this work show, that liposomes with lipoic acid have aт estimate stability in blood plasma and exhibit antioxidant properties, which indicates possibility of their use as a therapeutic agent.

References:

1. Mahallagam J., Nemunaitis J. et al. Phase-I study of intravenously administered ATI-1123, a liposomal docetaxel formulation in patients with advanced solid tumor. // Cancer Chemother Pharmacol., 2014, 74, 1241-1250 c. 2. Shchelkonogov V.A., Sorokoumova G.M., Baranova O.A. et al. Liposomal form of lipoic acid: preparation and determination of antiplatelet and antioxidant activity. // Biomedical chemistry., 2016, 5, 577-583 c. 3. Campbell M. K., & Farrell S. O. Biochemistry (5ed.). // Thomson Books Cole., 2006, 793 c.

Grant: At the expense of the budget of different universities : Moscow technological University (MITHT), Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU) and Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, RAS (Fryasino branch)

УДК: 602.4:628.35:664, ББК:

БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕВОЙ КУЛЬТУРЫ И АССОЦИАЦИЙ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

Н.Ю.Юдина, В.А.Алферов

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет», Россия, 300012, Тула, Проспект Ленина, 92, tysia21-05-90@mail.ru, 8-953-421-19-45

Разработаны биочувствительные элементы на основе иммобилизованных дрожжей D. hansenii ВКМ Y-2482 и ассоциации микроорганизмов O.angusta, A. adeninovorans и D. hansenii.

Ключевые слова: иммобилизация, БПК-биосенсоры, ассоциации микроорганизмов

В соответствии с мировой практикой эффективным подходом для экспресс-оценки биохимического потребления кислорода (БПК) является разработка биосенсоров на основе иммобилизованных индивидуальных микроорганизмов или их ассоциаций, окисляющих широкий круг органических веществ. Для иммобилизации микроорганизмов разработана полимерная матрица на основе поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном и проведено изучение ее структуры методами ИК – и ЯМР – спектроскопии. Созданы биочувствительные элементы на основе иммобилизованной в модифицированный поливиниловый спирт индивидуальной культуры дрожжей Debaryomyces hansennii ВКМ Y-2482 и искусственной ассоциации из дрожжей Ogataea angusta, Arxula adeninovorans и Debaryomyces hansenii.

Проведен сравнительный анализ характеристик амперометрических БПК-биосенсоров на основе кислородного электрода и сформированных биочувствительных элементов, показано, что биосенсор на основе микроорганизмов D. hansenii ВКМ Y-2482, характеризующийся наибольшей долговременной стабильностью (42 дня), превосходит БПК-биосенсоры на основе ассоциаций и известные мировые аналоги на основе дрожжей по чувствительности и нижней границе определяемых концентраций (0,16 мг/л). Иммобилизованные дрожжи D. hansenii ВКМ Y-2482 и ассоциация дрожжей способны функционировать при наличии NaCl (до 20%) и ионов тяжелых металлов превышающих ПДК, что позволяет использовать их для анализа образцов технологических стоков. Проведено определение биохимического потребления кислорода с использованием разработанных БПК-биосенсоров в образцах воды в широком интервале БПК (от 0,9 до 30000 мг/л), корреляция значений составила R=0,9955, что превосходит известные аналоги БПК-биосенсоров на основе иммобилизованных дрожжей и их ассоциаций [1-2].

Совместно с предприятием ООО «Эконикс–Эксперт» проведена разработка нового анализатора «Эксперт-009». Разработана структурная схема преобразователя, для достижения максимальной точности при измерении растворенного кислорода создана новая конструкция кислородного датчика. Разработано новое программное обеспечение позволяющее проводить измерения БПК и калибровку биосенсора в автономном режиме (без подключения к ПК) и полевых условиях. Создан фиксатор биочувствительного элемента с резьбовым креплением на кислородном датчике. Для корректной работы биосенсора при любых температурах сформирована система термостатирования. Разработана методика экспресс-определения БПК с использованием анализатора «Эксперт-009».

Разработанный экспериментальный образец амперометрического биосенсорного анализатора для экспресс - определения БПК «Эксперт-009» находится на испытаниях.

Литература.
1. Abrevaya X. C., Sacco N. J., Bonetto M. C., Hilding-Ohlsson A., Cortón E. Analytical applications of microbial fuel cells. Part I: Biochemical oxygen demand //Biosensors and Bioelectronics. – f. – T. 63. – C. 580-590 2. Jouanneau S., Recoules L., Durand M. J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Thouand G. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review //Water research. – 2014. – T. 49. – C. 62-82.

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

BIOSENSORS BASED ON THE YEAST AND CO-CULTURE MICROORGANISMS FOR DETERMINATION BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND

N.Yudina, V.Alferov

Tula State University

Developed biosensitive elements based on the immobilized yeast D. hansenii VKM Y-2482 and co-culture O.angusta, A. adeninovorans and D. hansenii.

Key words: biosensors, co-culture, immobilized, biochemical oxygen demand (BOD)

In accordance with international practice effective approach to rapid assessment of biochemical oxygen demand (BOD) is the development of biosensors based on immobilized microorganisms or their co-culture, a wide range of oxidising organic substrates.

For immobilized of microorganisms, the polymer matrix is designed based on polyvinyl alcohol modified with N-vinylpyrrolidone and its methods studied structures IR - and NMR - spectroscopy. Created biosensitive elements based cells on immobilized in a modified polyvinyl alcohol yeast Debaryomyces hansennii VKM Y-2482 and the co-culture yeast Ogataea angusta, Arxula adeninovorans and Debaryomyces hansenii.

A comparative analysis of the characteristics amperometric BOD-biosensors based on an oxygen electrode and formed biosensitive elements shown that the biosensor based on microorganisms D. hansenii VKM Y-2482, characterized by the greatest long-term stability (42 days) exceeds BOD-biosensors based co-culture, and the known world analogues based on the yeast of the sensitivity and the lower boundary of detectable concentrations (0.16 mg /dm3). Immobilized yeast D. hansenii VKM Y-2482 and the co-culture of yeast capable of functioning with the presence of NaCl up to 20% and in the presence of ions of heavy metals exceeding the maximum permissible concentration, they can be used to analyze samples of effluents. The determination of biochemical oxygen demand using the BOD-biosensors developed in water samples in a wide range of BOD (from 0.9 to 30,000 mg /dm3), the values of correlation was R = 0,9955, that exceeds the known analogues BOD-biosensors based on immobilized yeast and their co-cultures.

Together with the company OOO «Ekoniks-Expert» conducted to develop a new analyzer «Expert-009». The block diagram of the converter in order to achieve maximum accuracy in the measurement of dissolved oxygen created a new design of the oxygen sensor. New software allows measurement and calibration of BOD-biosensor in offline mode (without connection to a PC) and field conditions. Created biosensitive element with a screw lock on the oxygen sensor. For correct operation of the biosensor is formed at any temperature thermostat system. A method for rapid determination of BOD using the analyzer «Expert-009».

Developed an experimental model of amperometric BOD- biosensor analyzer for express «Expert-009» is on trial.

References:

1. Abrevaya X. C., Sacco N. J., Bonetto M. C., Hilding-Ohlsson A., Cortón E. Analytical applications of microbial fuel cells. Part I: Biochemical oxygen demand //Biosensors and Bioelectronics. – f. – T. 63. – C. 580-590 2. Jouanneau S., Recoules L., Durand M. J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Thouand G. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review //Water research. – 2014. – T. 49. – C. 62-82.

Grant: The work was performed within the Federal Targeted Programme for Research and Development in Priority Areas of Development of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014-2020 (Project No.14.574.21.0062)

УДК: 577.2, ББК: 28.070

КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРОВ ЭНДОЦИТОЗА С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ЦИТОКИНОМ TRAIL И ЕГО РЕЦЕПТОР-СПЕЦИФИЧНЫМ МУТАНТНЫМ ВАРИАНТОМ DR5-B КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ТЕРАПИИ РАКА.

А.В.Яголович, М.Э.Гаспарян, М.Л.Бычков, Д.А.Долгих

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия, Россия, 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10, anneyagolovich@gmail.com, +79263780155

Ингибирование TRAIL-опосредованной интернализации рецепторов смерти DR4 и DR5 сенсибилизирует резистентные опухолевые клетки к цитокину. Комбинация агонистов рецепторов смерти с лекарственными препаратами, ингибирующими эндоцитоз, может рассматриваться как новая стратегия терапии рака.

Ключевые слова: Рецепторы смерти, ингибиторы эндоцитоза, цитокин TRAIL, рецептор-селективный вариант TRAIL DR5-B, терапия рака.

TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) является перспективным цитокином для терапии опухолей, поскольку он избирательно вызывает апоптоз в опухолевых клетках, не затрагивая нетрансформированные клетки. Однако многие типы опухолей резистентны к TRAIL, что ограничивает применение препарата в терапии рака. Одной из причин резистентности клеток является сложный механизм взаимодействия TRAIL с пятью рецепторами, из которых лишь два, рецепторы смерти DR4 и DR5, проводят сигнал апоптоза, а остальные три рецептора (DcR1, DcR2, OPG) не только не передают апоптотический сигнал, но и ингибируют этот сигнальный путь за счет конкурентного связывания с лигандом [1]. Ранее мы получили рецептор-специфичный мутантный вариант TRAIL DR5-B, который связывается только с рецептором смерти DR5 и преодолевает рецептор-зависимую резистентность опухолевых клеток к TRAIL. К примеру, в резистентных к TRAIL линиях опухолевых клеток карциномы толстой кишки HT29 и карциномы легкого A549 вариант DR5-B вызывал клеточную гибель до 40% [2].

Мы показали, что как TRAIL дикого типа, так и рецептор-специфичный вариант DR5-B вызывают быструю (за 15 минут) интернализацию рецепторов смерти DR4 и DR5 в клетках линий HT29 и A549, после чего уровень поверхностной экспрессии этих рецепторов остается крайне низким как минимум в течение 24 часов. Интересно, что вариант TRAIL DR5-B, который не связывается с рецептором DR4, вызывает интернализацию DR4 так же эффективно, как и TRAIL дикого типа. Однако под воздействием DR5-B рецептор DR5 интернализовался в два раза слабее по сравнению с TRAIL дикого типа. Этим объясняется его способность к сенсибилизации опухолевых клеток HT29 и A549.

Ингибиторы клатрин-зависимого (динасор, хлорпромазин) и клатрин-независимого (цитохалазин B, метил-β-циклодекстрин - MβCD) эндоцитоза сенсибилизировали резистентные линии опухолевых клеток HT29 и A549 к TRAIL. Указанные ингибиторы также усилили апоптотическую активность DR5-B. На клетках линии A549 динасор эффективнее других усилил TRAIL- или DR5-B-опосредованную гибель клеток, тогда как на клетках линии HT29 эффективнее работали ингибиторы клатрин-независимого эндоцитоза цитохалазин B и MβCD.

Мы впервые показали, что ингибирование TRAIL-опосредованной интернализации рецепторов смерти DR4 и DR5 сенсибилизирует резистентные опухолевые клетки к вариантам цитокина TRAIL. Комбинирование препаратов, ингибирующих эндоцитоз рецепторов, с агонистами рецепторов смерти TRAIL(варианты TRAIL или моноклональные антитела к рецепторам) можно рассматривать в качестве нового подхода к терапии опухолевых заболеваний.

Литература.
1. Merino D., Lalaoui N., Morizot A., Schneider P. et al. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2 // Mol. Cell Biol. 2006. Vol.26 №19. P.7046–7055. 2. Гаспарян М.Э., Бычков М.Л., Яголович А.В., Долгих Д.А. и др. Мутации, повышающие селективность противоопухолевого цитокина TRAIL к рецептору DR5, усиливают его цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам // Биохимия. 2015. №80. С.1080–1091.

Финансирование: Грант РФФИ №16-04-00668 А

UDC: 577.2, ББК: 28.070

COMBINATION OF ENDOCYTOSIS INHIBITORS WITH ANTITUMOR CYTOKINE TRAIL AND ITS RECEPTOR-SPECIFIC MUTANT VARIANT DR5-B AS A NEW APPROACH TO CANCER TREATMENT.

A.Yagolovich, M.Gasparian, M.Bychkov, D.Dolgikh

Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of sciences, Moscow, Russia, Russia, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya, 16/10

The inhibition of TRAIL-mediated internalization of DR4 and DR5 death receptors sensitizes resistant tumor cells to TRAIL. The combination of death receptors' agonists with endocytosis inhibitors can be considered as a new strategy for cancer therapy.

Key words: Death receptors, endocytosis inhibitors, cytokine TRAIL, receptor-selective variant TRAIL DR5-B, cancer therapy.

TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) is a promising cytokine for tumor therapy due to its ability to induce apoptosis selectively in tumor cells without affecting non-transformed cells. However, many tumor types are resistant to TRAIL, limiting its use in cancer therapy. One of the reasons of tumor cell resistance is a complex interaction of TRAIL with five receptors: only two receptors, DR4 and DR5 (called death receptors), transduce apoptotic signal while the other three receptors (DcR1, DcR2, OPG) do not conduct apoptosis and even inhibit the apoptotic signaling pathway by competing for ligand binding [1]. Previously we have generated receptor-specific mutant variant TRAIL DR5-B, which binds only to DR5 receptor and overcomes receptor-dependent resistance of tumor cells to TRAIL. As an example, DR5-B induced about 40% cell death in TRAIL-resistant tumor cells lines of colon carcinoma HT29 and lung carcinoma A549 [2].

We have shown that both wild type TRAIL and receptor specific variant DR5-B induced fast (15 minutes) internalization of death receptors DR4 and DR5 in HT29 and A549 cells; surface expression of receptors remained very low for at least 24 hours. Interestingly, the DR5-B variant does not bind to DR4 receptor but induces DR4 internalization as effectively as wild type TRAIL. However, DR5-B induced 2-fold less receptor DR5 internalization compared to wild type TRAIL, thus explaining its ability to sensitize TRAIL-resistant tumor cell lines HT29 and A549.

Inhibitors of clathrin-dependent (dynasore, chlorpromazine) and clathrin-independent (cytochalasin B, methyl-beta-cyclodextrin - MβCD) endocytosis sensitized resistant tumor cells HT29 and A549 to wild type TRAIL. These inhibitors also increased apoptotic activity of DR5-B. In A549 cells dynasore was the most potent sensitizer for TRAIL or DR5-B-mediated cell death, whereas inhibitors of clathrin-independent endocytosis cytochalasin B and MβCD were more effective in HT29 cells.

We have demonstrated for the first time that inhibition of TRAIL-mediated death receptor internalization sensitizes resistant tumor cells to TRAIL variants. Combination of endocytosis inhibitors with TRAIL death receptors' agonists (TRAIL variants and monoclonal antibodies to the receptors) can be considered as a new approach to cancer therapy.

References:
1. Merino D., Lalaoui N., Morizot A., Schneider P. et al. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2 // Mol. Cell Biol. 2006. Vol.26 №19. P.7046–7055. 2. Gasparian M.E., Bychkov M.L., Yagolovich A.V., Dolgikh D.A. et al. Mutations enhancing selectivity of antitumor cytokine TRAIL to DR5 receptor increase its cytotoxicity against tumor cells // Biochemistry (Moscow). 2015. №80. P.1080–1091.

Grant: RFBR grant №16-04-00668 A

УДК: 614.9:636, ББК:

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ОЧИСТИТЕЛЕЙ В ПРОФИЛАКТИКЕ МАСТИТА КОРОВ

Е.С.Ятрушева

ФГБОУ ВО «Чувашская ГСХА», Россия, 428000, Чебоксары, Карла Маркса, 29, lena.pavlovaelena@yandex.ru, 89370110315

Важное место в обеспечении населения нашей страны качественными продуктами питания принадлежит молочному скотоводству. Однако большой проблемой для ветеринарной науки и практики являются забо-

левания молочной железы, и прежде всего, маститы. В хозяйствах нашей страны маститом переболевают от 22 до 60% коров. Заметим, что наиболее распространенной является субклиническая форма, которая регистрируется в 2-4 раза чаще, чем клинические маститы. Заболевания молочной железы воспалительного характера у коров возникают по различным причинам. Последние годы характеризуются интенсивными научными изысканиями по разработке новых, высокоэффективных противомаститных средств, преимущественно антимикробного действия, но, к сожалению, проводимые исследования не привели к существенному снижению заболеваемости коров маститами. Современным методом профилактики является применение средств на основе пробиотиков для обработки вымени до и после доения

Ключевые слова: корова, молоко, качество, пробиотические бактерии, молочная железа, мастит.

Важное место в обеспечении населения нашей страны качественными продуктами питания принадлежит молочному скотоводству. Однако большой проблемой для ветеринарной науки и практики являются заболевания молочной железы, и прежде всего, маститы. Заметим, что наиболее распространенной является субклиническая форма, которая регистрируется в 2-4 раза чаще, чем клинические маститы. Достаточно легко мастит передается от одного животного к другому. Вероятность заражения существенно возрастает при наличии повреждений слизистой соскового канала вымени, что свидетельствуют об инфекционной природе данного заболевания.

Последние годы характеризуются интенсивными научными изысканиями по разработке новых, высокоэффективных противомаститных средств, преимущественно антимикробного действия, но, к сожалению, проводимые исследования не привели к существенному снижению заболеваемости коров маститами.

Современным методом профилактики мастита является применение средств на основе пробиотиков для обработки вымени до и после доения.

Целью нашего исследования было изучение эффективности применения пробиотических средств фирмы Chrisal для профилактики заболеваемости коров маститами и повышения качества молока. Исследования по изучению влияния пробиотических средств на состояние молочной железы и качество молока выполнены в 2015-2016 годы на базе молочного комплекса ООО «Родина» Ядринского района на коровах черно-пестрой породы со среднегодовой молочной продуктивностью свыше 6 тыс. кг за лактацию. В наших исследованиях были использованы средства, содержащие пробиотики: Pip Skin Cleaner и Pip Cow Teat Cleaner (PIP CTC) – для обработки вымени коров.

Эффект от обработки чистящими пробиотиками достигается за счет колонизации обрабатываемых поверхностей культурами пробиотических бактерий (Bacillus subtilis), которые подавляют развитие патогенной микрофлоры по принципу антагонизма, конкурируя за пищу и среду обитания. Механизм действия основан на принципе «конкурентного ингибирования (вытеснения)» в сочетании с влиянием на разобщение патогенных организмов через способность к «чувству кворума». Борьба с маститами в исследовании предполагает предупреждение проникновения инфекции путем санации вымени и соска животного с одновременным улучшением условий содержания животных. Применение пробиотических очистителей для обработки вымени коров до и после доения продолжительностью 30 суток снизила количество соматических клеток в молоке коров опытной группы на 12,8%. Микробная обсеменённость молока снизилась в 4,9 раза.

Литература.
1. Барашкин, М.И. Эффективность комплексного применения средств на основе пробиотических бактерий в профилактике маститов и повышении качества молока / М.И. Барашкин // Ветеринария Кубани. – 2012. – № 6. – С. 22-26. 2. Колчина, А.Ф. Ветеринарные аспекты снижения соматических клеток в молоке коров / А.Ф. Колчина // Аграрный вестник Урала. – 2008. – № 11 (53). – С. 40-41. 3. Ларионов, Г.А. Обработка вымени коров для регулирования количества микроорганизмов в молоке / Г.А. Ларионов, Н.И. Миловидова, О.Н. Дмитриева, М.А. Сергеева // Российский журнал. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – М. : ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН. – 2014. – № 2(12). – С. 47-50.12.

EFFICIENCY OF APPLICATION OF PROBIOTIC CLEANERS IN THE PREVENTION OF MASTITIS COWS

E.Yatrusheva

Federal State Budgetary Education Institution of Higher Education «Chuvash State Agricultural Academy», Russia, 428000, Cheboksary, Karl Marx, 29

An important place in providing our population with quality food belongs to the dairy cattle. However, a big problem for veterinary science and practice are diseases of the breast, especially mastitis. In the farms of our country perevalivaet mastitis from 22 to 60% of the cows. Note that the most common is a subclinical form, which is recorded in 2-4 times more often than clinical mastitis. Diseases of the breast inflammatory disorders in cows occur for various reasons. Recent years are characterized by intensive scientific research to develop new, highly efficient lighting tools, mainly antimicrobial activity, but unfortunately, ongoing research has not led to a significant reduction in the incidence of cows with mastitis. Modern method of prevention is the use of products based on probiotics for processing the udder before and after milking

Key words: cow, milk quality, probiotic bacteria, mammary gland, mastitis.

An important place in providing our population with quality food belongs to the dairy cattle. However, a big problem for veterinary science and practice are diseases of the breast, especially mastitis. Note that the most common is a subclinical form, which is recorded in 2-4 times more often than clinical mastitis. Easy enough mastitis is transmitted from one animal to another. The probability of infection increases significantly in the presence of mucosal damage, a liner channel udder that indicate the infectious nature of this disease.

Recent years are characterized by intensive scientific research to develop new, highly efficient lighting tools, mainly antimicrobial activity, but unfortunately, ongoing research has not led to a significant reduction in the incidence of cows with mastitis.

Modern method of prevention of mastitis is the use of products based on probiotics for processing the udder before and after milking.

The aim of our study was to study the efficacy of probiotic agents of the company Chrisal for the prevention of morbidity of cows with mastitis and enhancing milk quality. Studies on the effect of probiotic agents on the state of the mammary gland and milk quality made in 2015-2016 on the basis of the dairy complex «Rodina» of Yadrinsky district on cows of black-motley breed with an average milk yield of more than 6 thousand kg per lactation. In our studies, we used products that contain probiotics: Skin Cleaner and Pip Pip Cow Teat Cleaner (PIP, STS) – for processing a udder of cows.

The effect of cleaning treatment with probiotics is achieved by colonization of processed surfaces by probiotic cultures of bacteria (Bacillus subtilis), which inhibit the development of pathogenic microflora by the principle of antagonism, competing for food and habitat. The mechanism of action is based on the principle of «competitive inhibition (crowding out)» in combination with the influence of isolation of pathogenic organisms through the ability to «quorum sensing». The fight against mastitis in the study involves preventing infection through rehabilitation of the udder and teat of an animal while improving conditions for the animals. The use of probiotic cleaners for processing a udder of cows before and after milking with a duration of 30 days reduced the number of somatic cells in milk of cows of the experimental group was 12.8%. Microbial contamination of milk decreased by 4.9 times.

References:
1. Barashkin M.I. Efficiency of complex application of products based on probiotic bacteria in the prevention of mastitis and improving milk quality / M.I. Barashkin // Veterinary Kuban. – 2012. – № 6. – P. 22-26. 2. Kolchina, A.F. Veterinary aspects of amount decrease of somatic cells in milk / A.F. Kolchina. – Agrarian Bulletin of the Urals. – Yekaterinburg, 2008 (11/53). – P. 40-41. 3. Larionov, G. A. Treatment of the udder of cows for regulating the number of microorganisms in milk / G.A. Larionov, N.I. Milovidova, O.N. Dmitrieva, M.A. Sergeeva // Russian journal. Problems of veterinary sanitation, hygiene and ecology. – M. : Institute of Russian Academy of agricultural Sciences VNIIVSGE. – 2014. – № 2(12). – P. 47-50.

УДК: 57.114/54.056

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ПОЛИСАХАРИД ИЗ ПОГРУЖЁННОГО МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ РОДА GANODERMA P. KARST .

М.С.Ярина[1], Л.М.Краснопольская[1], А.И.Усов[2], А.В.Марахонов[3]

[1]ФГБНУ НИИНА им.Г.Ф. Гаузе, Россия, 119867, Москва, Большая Пироговская, 11, maria.s.yarina@gmail.com, 89175687212
[2]ИОХ РАН им. Н.Д. Зеленского, Россия, 119991, Москва, Ленинский проспект , 47, ,
[3]ФГБНУ МГНЦ, Россия, 115478, Москва, улица Москворечье , 1, ,

В работе были исследованы два штамма (5-1 и 10), относящиеся к роду Ganoderma. Штамм 5-1 является продуцентом противоопухолевых полисахаридов, в том числе щёлочерастворимого ксиломаннана (КМ). Искомый КМ был также идентифицирован в щелочном экстракте мицелия штамма 10. Его противоопухо-

левая активность была показана в опытах in vivo. На основании молекулярно-филогенетических данных был сделан предварительный вывод о принадлежности штамма 5-1 к виду Ganoderma lucidum, а штамма 10 - к виду Ganoderma resinaceum. Окончательный вывод о видовой принадлежности требует дополнительных исследований.

Ключевые слова: полисахариды, ксиломаннан, Ganoderma, противоопухолевая активность.

В работе были исследованы два штамма (5-1 и 10), относящиеся к роду Ganoderma. Штамм 5-1 является продуцентом противоопухолевых полисахаридов, в том числе щёлочерастворимого ксиломаннана (КМ). Главная цепь КМ состоит из (1→3)-связанных остатков a-D-маннопиранозы, большая часть которых замещена по положению 4 единичными остатками β-D-ксилопиранозы или дисахаридными остатками β-D-Manp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→. КМ был выделен из погружённого мицелия.

Поиск КМ был предпринят в других штаммах рода Ganoderma, отличающихся высокими биотехнологическими показателями при погружённом культивировании. Искомый КМ был идентифицирован в щелочном экстракте мицелия штамма 10 с помощью метода ЯМР-спектроскопии. Его противоопухолевая активность была показана в опытах in vivo.

При погружённом культивировании оба штамма росли в виде пеллет, морфология которых сильно различалась в зависимости от состава жидкой питательной среды. Сравнительное изучении микроморфологии погружённой культуры штаммов 5-1 и 10 проводили методами световой и сканирующей электронной микроскопии. Были обнаружены такие структуры как: пряжки, хламидоспоры апикальные и интеркалярные, мицелиальные тяжи. Способностью к образованию интеркалярных хламидоспор и мицелиальных тяжей отличался штамм 5-1. В структуре тяжа отмечено слияние гиф и образования между ними анастомозов.

С целью уточнения таксономического положения штаммов 5-1 и 10 было проведено определение ITSпоследовательностей рДНК. На основании сопоставления полученных результатов с данными GenBank и построения дендрограмм был сделан предварительный вывод о принадлежности штамма 5-1 к виду Ganoderma lucidum, а штамма 10 к виду Ganoderma resinaceum. Окончательный вывод о видовой принадлежности требует дополнительных исследований.

Щёлочерастворимые индивидуальные полисахариды из погружённого мицелия гриба рода Ganoderma могут обладать высокой противоопухолевой активностью и весьма перспективны для дальнейшего изучения.

Литература.
1.Автономова А.В.,Краснопольская Л.М.,Максимов В.Н. Оптимизация состава питательной среды для погружённого культивирования Ganoderma lucidum(Curt.:Fr.)P.Karst// Микробиология.- 2006. - Т.75,№2.-С.186-192. 2.Автономова А.В., Ярина М.С., Краснопольская Л.М. Препараты на основе полисахаридов базидиальных грибов: клинические испытания// Вестник РАЕН. — 2016. — № 14. — С.102-108. 3.Евсенко М.С., Шашков А.С., Краснопольская Л.М., Усов А.И.Полисахариды базидиальных грибов. Растворимые в щёлочи полисахариды из мицелия трутовика лакированного Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P.Karst // Биохимия — 2009. — № 74.— вып. 5, — С.657-667

BIOLOGICALLY ACTIVE POLYSACCHARIDE WAS ISOLATED FROM SUBMERGEDLY CULTURED MYCELIUM OF THE GENUS GANODERMA P. KARST

M.Yarina[1], L.Krasnopolskaya[1], A.Usov[2], A.Marakhonov[3]

[1]Gause Institute of New Antibiotics (GINA), Russia, 119867, Moscow, Bol'shaya Pirogovskaya , 11
[2]N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry , Russia, 119991, Moscow, ,Leninskii prospekt, 47
[3]Federal State Budgetary Institution "Research Centre for Medical Genetics", Russia, 115478, Moscow, Moskvorechye, 1

Two strains (5-1 and 10) belonging to the Ganoderma genus were obtained in the study. Strain 5-1 is a producer of antitumor polysaccharides including alkali-soluble xylomannan (XM). Its antitumor effects were demonstrated in vivo. XM was identified in alkali-soluble extract of mycelium of strain 10. Molecular phylogenetic analysis of selected strains based on ITS rDNA sequences revealed that strain 5-1 belongs to the G. lucidum clade while strain 10 more likely is within G. resinaceum group.

Key words: polysaccharides, xylomannan, Ganoderma, antitumor effect

Two strains (5-1 and 10) belonging to the Ganoderma genus were obtained in the study. Strain 5-1 is a producer

of antitumor polysaccharides, including alkali-soluble xylomannan (XM). It was shown to have a branched molecules containing a backbone of (1→3)-linked residues of α-D-mannopyranose, most of which are substituted at position 4 by single β-D-xylopyranose residues or disaccharide residues β-D-Manp-(1→3)-β-D-Xylp-(1→ XM was obtained from a submerged mycelium.

The search of XM has been conducted in other strains of Ganoderma, characterized by high biotechnological indices when using submerged cultivation. Target XM was identified in alkali-soluble extract of mycelium of strain 10 using nuclear magnetic resonance method. Its antitumor effects were demonstrated in vivo . XM action was studied on mice grafted with a solid T-cell lymphocytic leukemia P 388 solid breast adenocarcinoma Ca-755 and melanoma B solid 16.

During the submerged cultivation both strains 5-1 and 10 were growing in the form of pellet. The comparative study of their pellets micromorphology was conducted using scanning electron microscope. The following structures were revealed: clamps, apical and intercalary chlamidospores, mycelial cords.

Strain 5-1 was characterized by the ability to form intercalary chlamidospores and mycelial cords. Hypha connections and anastomose formation between them was observed in the mycelial cord.

Molecular phylogenetic analysis of selected strains based on ITS rDNA sequences revealed that strain 5-1 belongs to the G. lucidum clade while strain 10 more likely is within G. resinaceum group.

Alkali-soluble polysaccharide was isolated from submergedly cultured mycelium of the genus Ganoderma P. Karst might be a high-potential subject for anti-cancer research.

References:
1.Avtonomova, A. V., Krasnopol'skaya, L. M., and Maksimov, V. N. Optimization of culture medium for submerged cultivation of Ganoderma lucidum(Curt.:Fr.)P.Karst (2006) Mikrobiologiya, 75, 186-192. 2.Avtonomova A.V., Yarina M.S., Krasnopol'skaya L.M. Medicines on the basis of basidiomycetes polysaccharides: clinical trials //Bulletin of RANS. — 2016. — № 14. — C.102-108. 3. Evsenko M.S., Shashkov A.S., Avtonomova A.V., Krasnopolskaya L.M., Usov A.I. Polysaccharides of Basidiomycetes. Alkalisoluble polysaccharides from the mycelium of white rot fungus Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. Karst //Biochemistry— 2009. — № 74.— вып. 5, — pp.657-667.

УДК: 576.54, ББК: 28.07

ПЕРСПЕКТИВЫ 3Д МОДЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННЫХ МАТРИКСОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

И.А.Корниенко[1]

[1]Институт Регенеративной Медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, РФ, 119048, Москва, Трубецкая, 8, e-mail: innatrusova@gmail.com, +79165408151

Была создана ex vivo модель тканевой инженерии раковой опухоли, были разработаны оптимизированные протоколы для получения органо-специфичного децеллюляризованного матрикса и оценён их потенциал в качестве каркаса для тканевой инженерии для культур здоровых и опухолевых клеток.

Ключевые слова: 3Д модели; децеллюляризация; исследование лекарств; токсичность лекарств; матриксы; сфероиды; тканевая инженерия.

Токсичность лекарства зачастую не может быть обнаружена до клинических испытаний, наиболее дорогой и опасной фазы разработки препаратов. Человеческие и животные испытания имеют ограничения, которые не могут быть преодолены улучшением протоколов тестирования. Тканевая инженерия – это развивающийся альтернативный подход к созданию моделей злокачественных опухолей человека для экспериментальной онкологии, персонализованной медицины и исследований препаратов. В рамках подхода имеется возможность контролировать и исследовать роль каждого компонента модели, включая популяции клеток, матрикс, сигнальные молекулы. Онкология может значительно выиграть от данных моделей [1].

Последние открытия тканевой инженерии демонстрируют, что децеллюляризованная (ДЦЛ) ткань является отличным основанием для подхода. ДЦЛ донорских органов, таких как сердце, печень, лёгкие, может предоставить бесклеточный матрикс, на который могут быть посажены клетки [2]. ДЦЛ органы сохраняют микроокружение, которое критично для метастаз.

Использование 3Dмоделей опухолей лучше симулирует процессы в опухоли и её патогенезе. 3D моде-

ли позволяют изучить процессы миграции и клеточной пролиферации с большей точностью. Более того, раковые клетки в 3Dмоделях ведут себя более естественно с точки зрения экспрессии генов. Клеточные культуры в 2Dне имеют геометрических и механических свойств, соответствующих invivo. 3Dмодели могут иметь различную сложность: от простых монокультур раковых клеточных линий до сложных моделей, объединяющих в себе различные виды клеток, в том числе эндотелиальные и иммунные клетки [3]. Следовательно, сфероиды из одной или нескольких клеточных линий пациента могут быть использованы для заселения матрикса вместо клеток в 2D. Такойподходприближаеткперсонализованноймедицине.

В качестве первого шага для создания exvivotканеинженерной модели раковой опухоли были разработаны оптимизированные протоколы для получения органоспецифичных бесклеточных матриксов и оценён их потенциал в качестве тканеинженерных конструкций для здоровых и опухолевых клеток. ДЦЛ матрикс был создан из почек, уретры, лёгких, сердца и печени животных двумя методами: перфузионным с использованием биореактора и с использованием орбитального шейкера с помощью различных детергентов (SDS, TritonX-100) в различной концентрации и замораживанием. Бесклеточных матрикс и тканеинженерные конструкции были охарактеризованы, и произведено сравнение морфологическими методами.

Модели ДЦЛ матриксов имеют определённые преимущества, такие как: сохранность исходных свойств межклеточного матрикса и биомиметического окружения раковых клеток, сочетаемость с множеством видов клеток, возможность использования извлечённых у пациента клеток для персональной медицины.

Литература:

1. *Hickman, J. A., Graeser, R., de Hoogt, R., et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo // Biotechnol J. 2014. Vol. 9. № 9. P. 1115-28.*
2. *Crapo, P. M., Gilbert, T. W. and Badylak, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // Biomaterials. 2011. Vol. 32. № 12. P. 3233-43.*
3. *Kimlin, L. C., Casagrande, G., and Virador, V. M. Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering // PLOS One. 2014. Vol. 9. № 7.*

UDC: 576.54, ББК: 28.07

PROSPECTS OF 3D MODELS BASED ON DECELLULARIZED MATRIX FOR DRUG DISCOVERY

I.Kornienko[1]

1Institute for Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University , RU, 119048, Moscow, Trubetskaya, 8

Was created a new ex vivo tissue engineered model of a cancer tumor, optimized protocols have been designed to obtain organ-specific acellular matrices and evaluate their potential as tissue engineered scaffolds for cultures of normal and tumor cells.

Key words: 3D models; decellularization; drug discovery; drug toxicity; scaffolds; spheroids; tissue engineering

Drug toxicity often goes undetected until clinical trials, the most expensive and dangerous phase of drug development. Both human cell culture and animal studies have limitations that cannot be overcome by improvements in drug testing protocols. Tissue engineering is an emerging alternative approach to create models of human malignant tumors for experimental oncology, personalized medicine and drug discovery studies. This new generation of bioengineered tumors provides an opportunity to control and explore the role of every component of the model system including cell populations, supportive scaffolds, and signalling molecules. An area that could greatly benefit from these models is cancer research [1].

Recent advances in tissue engineering demonstrated that decellularized tissue is an excellent scaffold for tissue engineering. Decellularization of donor organs such as heart, liver, and lung can provide an acellular, naturally occurring three-dimensional biologic scaffold material that can then be seeded with selected cell populations [2]. Preliminary studies in animal models have provided encouraging results for the proof of concept. Decellularized organs preserve organ microenvironment, which is critical for cancer metastasis.

Utilizing 3D tumor models results greater proximity of cell culture morphological characteristics in a model to its in vivo counterpart, allows more accurate simulation of the processes within a functioning tumor and its

pathogenesis. 3D models allow study of migration processes and cell proliferation with higher reliability as well. Moreover, cancer cells in a 3D model bear closer resemblance to live conditions in terms of gene expression, cell surface receptor expression, and signaling. 2D cell monolayers do not provide the geometrical and mechanical cues of tissues in vivo and are, therefore, not suitable to accurately predict the responses of living organisms. 3D models can provide several levels of complexity from simple monocultures of cancer cell lines in liquid environment comprised of oxygen and nutrient gradients and cell-cell interaction to more advanced models, which include co-culturing with other cell types, such as endothelial and immune cells [3]. Following this reasoning, spheroids cultivated from one or multiple patient-derived cell lines can be utilized to seed the matrix rather than monolayer cells. This approach furthers the progress towards personalized medicine.

As an initial step to create a new ex vivo tissue engineered model of a cancer tumor, optimized protocols have been designed to obtain organ-specific acellular matrices and evaluate their potential as tissue engineered scaffolds for cultures of normal and tumor cells. Decellularized biomatrix was prepared from animals' kidneys, urethra, lungs, heart, and liver by two decellularization methods: perfusion in a bioreactor system and immersion-agitation on an orbital shaker with use of various detergents (SDS, Triton X-100) in different concentrations and freezing. Acellular scaffolds and tissue engineered constructs have been characterized and compared using morphological methods.

Models using decellularized matrix have certain advantages, such as maintaining native extracellular matrix properties and biomimetic microenvironment for cancer cells; compatibility with multiple cell types for cell culture and drug screening; utilization to culture patient-derived cells in vitro to evaluate different anticancer therapeutics for developing personalized medicines.

References:

1. *Hickman, J. A., Graeser, R., de Hoogt, R., et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo // Biotechnol J. 2014. Vol. 9. № 9. P. 1115-28.*
2. *Crapo, P. M., Gilbert, T. W. and Badylak, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // Biomaterials. 2011. Vol. 32. № 12. P. 3233-43.*
3. *Kimlin, L. C., Casagrande, G., and Virador, V. M. Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering // PLOS One. 2014. Vol. 9. № 7.*

2017 BIO TECH WORLD

WWW.BIOMOS.RU

ОРГАНИЗАТОР / ORGANIZER

RED GROUP

РЭД ГРУПП
RED GROUP

ПРИ УЧАСТИИ / SUPPORTED BY

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО)
Federal Agency for Research Organizations (FANO of Russia)

МИНПРОМТОРГ РОССИИ
Министерство промышленности и торговли Российской Федерации
Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation

Министерство экономического развития Российской Федерации
Ministry of Economic Development of the Russian Federation

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Ministry of Agriculture of the Russian Federation

Российская академия наук
Russian Academy of Sciences

Департамент науки, промышленной политики и предпринимательства Москвы
Moscow City Department of Science, Industrial Policy and Entrepreneurship

Департамент природопользования и охраны окружающей среды Москвы
Moscow City Department of Nature and Environmental Protection

Российский союз химиков
Russian Chemists' Union

Primer Capital
Венчурный фонд Primer Capital
Venture Fund Primer Capital

Совет молодых ученых РАН
Council of Young Scientist of Russian Academy of Science

Министерство инвестиций и инноваций Московской области
Ministry of investment and innovations of Moscow Region

РФФИ
Российский фонд фундаментальных исследований
Russia Foundation for Basic Researh

ELSEVIER

FUTURE BIOTECH

Биомолекула
Biomolekula

Бластим
Работа в биотехе
Blastim

+7 (495) 780-41-09 | e-mail: info@biomos.ru | www.biomos.ru