



МАТЕРИАЛЫ III МЕЖДУНАРОДНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СИМПОЗИУМА «БИО-АЗИЯ АЛТАЙ 2021»



23-26 сентября 2021, г. Барнаул, Алтайский край

Министерство науки и высшего образования РФ
Правительство Алтайского края
Алтайский государственный университет

**МАТЕРИАЛЫ
III МЕЖДУНАРОДНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
СИМПОЗИУМА «БИО-АЗИЯ АЛТАЙ 2021»**

г. Барнаул, Алтайский край, Россия
23–26 сентября 2021 г.



Барнаул

Издательство
Алтайского государственного
университета
2021

УДК 663(063)
ББК 306я431
М 341

Ответственные за выпуск:

О.Н. Мироненко, кандидат биологических наук, директор Алтайского центра прикладной биотехнологии Алтайского государственного университета;

О.В. Бычкова, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник Алтайского центра прикладной биотехнологии Алтайского государственного университета

М 341 Материалы III Международного биотехнологического симпозиума «Био-Азия Алтай 2021» / отв. за выпуск: О.Н. Мироненко, О.В. Бычкова. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2021. – 256 с.

ISBN 978-5-7904-2594-3

Сборник содержит статьи, подготовленные на основе материалов докладов III Международного биотехнологического симпозиума «Био-Азия Алтай 2021», который состоялся в рамках Международного форума «Биотехнологии: наука, образование, индустрия» (г. Барнаул, 23-26 сентября 2021 г.). Представлены результаты исследований в области биоэкономики, промышленной, медицинской, пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии, образования и молекулярной генетики.

Материалы рассчитаны на ученых, преподавателей и учащихся вузов, представителей органов власти, производственных предприятий.

УДК 663(063)
ББК 306я431

ISBN 978-5-7904-2594-3

© Оформление. Алтайский государственный университет, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

УСТОЙЧИВАЯ БИОЭКОНОМИКА И ИНДУСТРИЯ: ДРАЙВЕРЫ И БАРЬЕРЫ РЕГИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

<i>Балабанов В.И.</i> Инновационные проекты Инжинирингового центра Тимирязевской академии.....	6
<i>Воронина Н.П.</i> Правовое регулирование применения биотехнологий: законодательные и правоприменительные проблемы (в сфере сельского хозяйства)	9
<i>Высоцкая О.А., Сурай Н.М.</i> Опыт развития высокотехнологичного проекта в коллаборации вуза и сельхозпотребкооперации.....	13
<i>Евдокимов И.Ю., Гребенщикова А.В., Ширманов М.В., Иркитова А.Н.</i> Инжиниринговый центр «Промбиотех»: история становления и дальнейшие перспективы развития	16
<i>Ефремов А.А., Демидов Е.Л., Волков А.А.</i> Использование растительных ресурсов Сибири для ликвидации йододефицита населения России.....	19
<i>Задорина О.А., Чишкова И.В.</i> Направления устойчивого развития биотехнологических решений для производства молочных продуктов.....	24
<i>Исраилова А.С.</i> Влияние ГМО-продукции на экологическую и продовольственную безопасность	27
<i>Кундиус В.А.</i> Кооперация и интеграция как ключевые инструменты развития органического сельского хозяйства	30
<i>Мироненко О.Н., Хлебова Л.П., Бровко Е.С., Хлыновский М.Д.</i> Перспективы использования биотехнологических разработок в промышленном хмелеводстве	38
<i>Пястолов О.А., Арустамов Э.А., Стойнова А.Ф.</i> О мерах государственной поддержки развития малого и среднего предпринимательства в Российской Федерации	43
<i>Самохвалов И.М., Водолажский Д.И., Чегодарь Д.В., Кубышкин А.В.</i> Биотехнологический дизайн: возможности новых решений для известных биотехнологий	49
<i>Сысоев И.С.</i> Внедрение в Алтайском крае инновационных биотехнологий VBTech в сфере сельского хозяйства и экологии.....	54

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ: ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ПРИВЛЕЧЕНИЯ ТАЛАНТЛИВОЙ МОЛОДЕЖИ В ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНУЮ ИНДУСТРИЮ

<i>Базарнова Н.Г., Захарченко А.В., Базарнова О.В.</i> О подготовке кадров по направлению 19.03.01 «Биотехнология» в Алтайском государственном университете.....	59
<i>Воробьева В.М., Дегтярева Ю.В., Шабалина Ю.В.</i> Биотехнологическое образование провизора в Алтайском государственном медицинском университете.....	63
<i>Киселёва И.С., Ермошин А.А.</i> Создание и развитие Центра фундаментальной биотехнологии и биоинженерии в Уральском федеральном университете.....	66
<i>Микушина И.В.</i> О перспективах сетевого обучения по направлению подготовки «Биотехнология»	71
<i>Погребная Т.В., Козлов А.В., Сидоркина О.В.</i> Формирование креативных компетенций в довузовском биотехнологическом образовании	75
<i>Сергеева И.Ю., Котов Р.М., Игнатенко В.И.</i> Технологии VR для формирования новых компетенций биотехнологов.....	79
<i>Щербакова Л.В.</i> Проекты и стартапы как основополагающие компоненты образовательной программы подготовки биотехнологов.....	84

БИОФАРМАЦЕВТИКА И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА: ВЫЗОВЫ СОВРЕМЕННОСТИ И ОСНОВНЫЕ ТРЕНДЫ

<i>Адекенов С.М.</i> Поиск новых противовирусных растительных веществ для разработки оригинальных лекарственных препаратов.....	89
<i>Викторина О.Е., Щербаков Д.Н., Колосова Е.А.</i> Получение антител против нуклеокапсидного белка SARS-CoV-2.....	96
<i>Даниленко Е.Д., Левагина Г.М., Волосникова Е.А., Шимица Г.Г., Гамалей С.Г.</i> Рекомбинантные колониестимулирующие факторы: получение и перспективы использования	99
<i>Ермошин А.А., Киселёва И.С., Улитко М.В., Шимица Г.Г., Чаомей Ма.</i> Ксилотрофные базидиомицеты как потенциальное ресурсное сырьё для фармацевтики	103
<i>Ильичёв А.А., Рудомётов А.П., Карпенко Л.И.</i> Вакцины против SARS-CoV-2: текущее состояние	108
<i>Ильичёв А.А., Шарабрин С.В., Рудометов А.П., Карпенко Л.И.</i> Матричная РНК в терапии онкологических заболеваний	112
<i>Карпенко Л.И., Шарабрин С.В., Рудометов А.П., Ильичёв А.А.</i> Технологии на основе м-РНК для создания вакцин и средств терапии	117
<i>Кубышкин А.В., Зяблицкая Е.Ю., Голубинская Е.П., Макашиш Т.П.</i> Персонализированный пациент-ориентированный подход к молекулярно-генетической диагностике в научной лаборатории инжинирингового центра.....	122
<i>Нефедова А.А., Бочкарева М.Д., Елфимов К.А., Тотменин А.В., Имамдинов И.Р., Гашикова Н.М.</i> Экспрессия красного флуоресцентного белка DsRed-Express в составе генома ВИЧ как маркер динамики вирусной репродукции в клеточной культуре	127
<i>Поцелуев Н.Ю., Швед О.И., Шульц К.В., Нагорняк А.С., Жукова О.В., Пашиков А.П.</i> Сравнительный анализ изменений в клетках буккального эпителия жителей аграрных районов Алтайского края	132
<i>Рудомётов А.П., Рудомётова Н.Б., Ильичев А.А., Карпенко Л.И.</i> Вирусные мишени при разработке вакцин на примере вирусов ВИЧ-1 и SARS-CoV-2	137
<i>Рудомётова Н.Б., Щербаков Д.Н., Карпенко Л.И.</i> Технология псевдовирюсов и ее применение.....	141
<i>Сейдахметова Р.Б., Сейтеметов Т.С., Тутай Д.С., Казбекова А.Т., Жолбарыс А.А., Нуркадыров Д.К., Байсаров Г.М., Адекенов С.М.</i> Антиоксидантная и гепатопротекторная активность растительных флавоноидов и их производных	144
<i>Семенихина Н.М., Абрамова К.Е., Омелько Н.А., Климова Е.В.</i> Разработка биополимерных каркасов для создания тканеинженерных конструкций кожи	148
<i>Теплякова Т.В.</i> Грибы-макромицеты юга Западной Сибири, используемые для разработки препаратов против вирусов и опухолей	151
<i>Щербаков Д.Н., Волосникова Е.А., Есина Т.И., Гогина Я.С., Даниленко Е.Д., Боргоякова М.Б., Волкова Н.В.</i> Особенности гуморального иммунного ответа против конструкций, содержащих рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека	155

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ РАСТЕНИЙ

<i>Агаханов М.М., Ухатова Ю.В.</i> Изучение случайного переопыления гибридов F1 винограда	159
<i>Булавин И.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Митрофанова И.В.</i> Создание на безвирусной основе и анализ полученных перспективных форм персика	161
<i>Ерастенкова М.В., Бумагина А.Е., Тихонова Н.Г., Ухатова Ю.В.</i> Изучение образцов винограда из коллекции ВИР по способности к регенерации	166
<i>Коршикова Е.С., Мокшенинова Ю.А., Ершова К.М., Ухатова Ю.В.</i> Оценка регенерационной способности образцов сои (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) из коллекции ВИР	168

Пузанова Е.В. Генотипирование тимьяна крымской коллекции с помощью мультилокусных молекулярных маркеров	170
--	-----

БИОРЕФАЙНИНГ И БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Бикмаева Н.А., Николаева Е.А., Протопопов А.В. Модификация сложных эфиров целлюлозы с лимонной кислотой полиэтиленгликолем	175
Владимцева И.В., Сухоплещенко А.В., Тихонова А.А., Мосолов А.А., Минченко Л.А. Конструирование искусственной питательной среды на основе экструдированных злаковых культур	178
Ефрюшин Д.Д., Жогов О.В. Исследование возможности ацилирования лигнина системой «пиридин – хлорангидрид высшей карбоновой кислоты»	182
Кащеева Е.И., Гисматулина Ю.А., Гладышева Е.К., Миронова Г.Ф. Изучение зависимости ферментативного гидролиза от степени полимеризации целлюлоз различного происхождения	187
Комаров П.В., Никитина Т.В., Шалимова И.А., Протопопов А.В. Исследование кинетики ацилирования лигнина капролактамом в среде толуола	191
Котова Т.И., Хантургаев А.Г., Хантургаева В.А., Цыцыков В.А., Хантургаева Н.А. К вопросу комплексной переработки плодов облепихи	194
Коньшин В.В., Крахмалев В.А., Кориунов Л.А., Афаньков А.Н., Гришаева И.Н., Шаньшин Н.В. Биорефайнинг побочных продуктов растительного происхождения	200
Никитина Т.В., Комаров П.В., Шалимова И.А., Протопопов А.В. Влияние температуры на ацилирование целлюлозы капролактамом	203
Павлов И.Н., Миронова Г.Ф. Предварительная обработка биомассы шелухи овса с помощью автогидролиза	206
Протопопов А.В., Штепенко Д.Е., Гречко А.Н. Кинетические закономерности ацилирования древесины адипиновой кислотой	211
Сидорова Н.А., Чечкова Н.А., Бадалов М.Э. Оценка степени детоксикации органических отходов при биоконверсии	214
Сыздыкова Д.М., Яковенко Г.А., Байсаров Г.М., Толоконников Е.Г., Хабаров И.А., Адекенов С.М. Оптимизация процесса выделения флавоноидов из сырья <i>Salsola collina</i> Pall.	220
Талан М.С., Гаевский М.С., Володин А.А., Докучаева И.С., Папаев Р.М. Перспективы получения биодизельного топлива из <i>Hermetia Illucens</i>	224
Тарабанько В.Е., Вигуль Д.О., Челбина Ю.В., Кайгородов К.Л. Влияние интенсивности массопереноса на процесс каталитического окисления костры льна в ванилин и целлюлозу	227
Уразова Я.В. Использование фитомеланина, полученного из лузги гречихи в качестве компонента УФ-защиты	233
Функ Т.В., Ануфриева Ю.В., Сиянко П.И. Диацетат иодозобензола – селективный окислитель целлюлозы	236
Хабаров И.А., Адекенов Б.С., Мустафин М., Аманжан А. Моделирование способа выделения гармина из сырья <i>Reganum harmala</i> L.	239
Шилов А.И., Шавыркина Н.А. Исследование адаптивности продуцента бактериальной наноцеллюлозы <i>Medusomyces gisevii</i> Sa-12 к гидролизным средам	244
Шумилова Е.Ю., Протопопов А.В. Получение сукцинатов крахмала и исследование их реологических свойств	249
Яценко Е.С., Затонская Л.В., Петухов В.А., Лыков П.В. Оптимизация питательных сред для культивирования <i>Bacillus subtilis</i>	254

УСТОЙЧИВАЯ БИОЭКОНОМИКА И ИНДУСТРИЯ: ДРАЙВЕРЫ И БАРЬЕРЫ РЕГИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

УДК 663.18

ИННОВАЦИОННЫЕ ПРОЕКТЫ ИНЖИНИРИНГОВОГО ЦЕНТРА ТИМИРЯЗЕВСКОЙ АКАДЕМИИ

В.И. Балабанов

Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия (РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева), Москва, Россия

В статье представлены некоторые результаты и планы работы Инжинирингового центра Тимирязевской академии, в том числе связанные с биотехнологическими направлениями исследований, такие как создание совместно с компанией «Робопроб» роботизированного почвенного пробоотборника для точного (координатного) земледелия; разработка инновационных смазочных материалов, основанных на металлорганических соединениях, а также итоги проведения международного учебно-практического семинара «Агротехника-2021», посвященного робототехнике и цифровым технологиям в сельском хозяйстве.

Ключевые слова: инжиниринговый центр Тимирязевской академии, инновационная техника, робототехника, почвенный пробоотборник, точное земледелие, смазочный материал, повышение квалификации, научно-практический семинар «Агротехника-2021»

Осенью 2020 г. по инициативе и при поддержке ректора Российского государственного аграрного университета – Московской сельскохозяйственной академии (РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева), академика Российской академии наук, профессора В.И. Трухачева коллективом ученых Института мелиорации, водного хозяйства и строительства имени А.Н. Костякова была подготовлена заявка для участия в конкурсе Министерства образования и науки Российской Федерации на создание при университете инжинирингового центра. В основу заявки вошли инновационные разработки, в том числе совместные проекты с передовыми машиностроительными компаниями России и мира в области точного (координатного) земледелия, робототехники, нанотехнологий и наноматериалов, трибологии и эффективного использования водных ресурсов. Высокая актуальность и эффективность заявленных направлений позволили РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева стать единственным победителем конкурса среди аграрных вузов [1–5].

В данной работе представлены некоторые результаты и планы работы Инжинирингового центра Тимирязевской академии, в том числе связанные с биотехнологическими направлениями исследований, а также итоги проведения международного учебно-практического

семинара «Агротехника-2021», посвященного робототехнике и цифровым технологиям в сельском хозяйстве.

С первых дней своей работы Инжиниринговый центр Тимирязевской академии успешно сотрудничает с более чем десятью отечественными и зарубежными компаниями, с которыми заключены несколько договоров о сотрудничестве и выполнении ряда инжиниринговых работ. Так, в рамках работ по созданию инновационной техники для растениеводства Инжиниринговым центром совместно с компанией «Робопроб» создается роботизированный почвенный пробоотборник и соответствующее программное обеспечение для применения в точном (координатном) земледелии. В настоящее время ведутся работы по доработке конструкции пробоотборника и тестированию облачного сервиса.

Также ведутся работы по созданию роботизированных дождевальных установок для эффективного и безопасного полива и применению беспилотных летательных аппаратов для точечного внесения агрохимикатов в растениеводстве [1–3].

Результатами исследований в области нанотехнологий, наноматериалов и трибологии стала разработка двух инновационных смазочных материалов, основанных на металлоорганических соединениях и направленных на значительное снижение износа трущихся соединений машин и потерь на трение. В состав смазочных материалов входят наноразмерные комплексы пластичных металлов, органических кислот и их солей. В настоящее время на составы смазочных материалов Инжиниринговым центром Тимирязевской академии поданы две заявки на изобретения, изготовлены опытные образцы и рекомендации по их применению в автотракторной технике [4–5].

Следует отметить, что компании-партнеры планируют создать на площадке Инжинирингового центра свои лаборатории и выставочные площадки и активно их использовать для проведения совместных исследований, научно-практических конференций, обучающих семинаров и тренингов, встреч и фокус-групп как со студентами университета, так и со своими сотрудниками и клиентами.

В рамках этих работ уже в марте 2021 г. Инжиниринговый центр Тимирязевской академии провел Международный учебно-практический семинар «Агротехника-2021», который был посвящен применению робототехники и цифровых технологий в сельском хозяйстве.

Семинар прошел при организационной поддержке немецкой компании «AMAZONENWERKE» и российской «Ассоциацией разработчиков, производителей и потребителей оборудования и приложений на основе глобальных навигационных спутниковых систем – «ГЛОНАСС/ГНСС-Форум».

Информационную поддержку мероприятия обеспечили пресс-служба университета, межотраслевой журнал навигационных технологий «Вестник ГЛОНАСС», журналы «Агробизнес» и «Агротехника и технологии», а также электронный портал «Агро в деталях», которые оперативно разместили на своих площадках анонс, пост-релиз и фотоотчеты о работе семинара.

Вначале семинара были заслушаны выступления представителей Инновационного центра «Сколково» и Ассоциации производителей сельхозтехники (VDMA Agricultural Machinery Association, Германия), а в основной программе доклады руководителей и специалистов компаний АО «Амазоне», АО «Петербургский тракторный завод», Группы компаний «Агроштурман», ООО «Вадерштад», компании CNH Industrial, компании «Центр агротехнологий», ООО Научно-Технический Центр «Робопроб», АО «КБ НАВИС», АО «Геомир»,

ООО «Агроноут» и ООО «Агротестер», которые рассказали о своих достижениях в области роботизации и цифровизации, разработки и выпуска современной техники, навигационного оборудования, разработки и применения инновационных агротехнологий.

Слушателями семинара стали более 350 преподавателей, бакалавров, магистров и аспирантов всех факультетов РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, а также ряда других вузов и научных институтов.

Образовательная деятельность, в том числе повышение квалификации молодых ученых и специалистов, наряду с инжиниринговыми работами и услугами промышленного дизайна, является одной из приоритетных задач деятельности инжинирингового центра. Поэтому уже сейчас разработаны более 10 рабочих программ курсов дополнительного профессионального образования и прошли обучение 50 слушателей, в том числе по садоводству, ландшафтной архитектуре, системам орошения и водоподготовке.

Таким образом, созданный при РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева инжиниринговый центр выполняет образовательные и инжиниринговые проекты, а также услуги промышленного дизайна в области точного (координатного) земледелия, робототехники, нанотехнологий и наноматериалов, трибологии и эффективного использования водных ресурсов.

В настоящее время центром успешно выполняются контрольные показатели по дополнительной профессиональной подготовке, разработке роботизированных машин и новых металлорганических смазочных материалов, а также инжинирингу ряда других инновационных проектов.

Статья подготовлена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2021-032 от 23 марта 2021 г. о предоставлении гранта в форме субсидии на создание и развитие инжинирингового центра на базе образовательной организации высшего образования и (или) научной организации в рамках реализации Федерального проекта «Развитие инфраструктуры для научных исследований и подготовки кадров» национального проекта «Наука и университеты»

Библиографический список

1. Балабанов В.И., Федоренко В.Ф. и др. Технологии, техника и оборудование для координатного (точного) земледелия. М. : Росинформагротех, 2016. 240 с.
2. Balabanov V.I. Development of new elements of precision farming systems based on precision farming centre of Russian state agrarian university – Moscow agricultural academy named after K. A. Timiryazev // World Journal of Agriculture and Soil Science. 2018. Т. 1, № 1. С. 2.
3. Балабанов В.И. Полевая стратегия. Внедрение инноваций в координатном земледелии // Агротехника и технологии. 2016. №5. С. 50–53.
4. Балабанов В.И. Повышение качества отремонтированных двигателей внутреннего сгорания путем реализации избирательного переноса при трении // Вестник машиностроения. 2001. № 8. С. 14–19.
5. Балабанов В.И. Нанотехнологии и нанопрепараты для автотракторной техники // Применение нанотехнологий и наноматериалов в АПК : сб. докладов. М.: Росинформагротех, 2008. С. 77–81.

УДК 349.42

ПРАВОВОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ: ЗАКОНОДАТЕЛЬНЫЕ И ПРАВОПРИМЕНИТЕЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ (В СФЕРЕ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА)

Н.П. Воронина

*Московский государственный юридический университет имени О.Е. Кутафина (МГЮА),
Москва, Россия*

В современных условиях интенсивного развития биотехнологий важнейшим становится их значение в сельском хозяйстве как направлении государственной аграрной политики и объекта правового регулирования. Действующее законодательство дает ответы далеко не на все современные вызовы, порой, не устраняя барьеры, а, наоборот, увеличивая их.

Ключевые слова: биотехнологии, сельское хозяйство, модель правового регулирования

Введение. Биотехнологии в сельском хозяйстве – инновационный путь развития аграрного сектора, позволяющий решить одну из мировых проблем – проблему голода. Биотехнологии – способ решения продовольственной проблемы. Создание новых сортов сельскохозяйственных растений и животных с использованием биотехнологических методов – это направление биотехнологии в сфере сельского хозяйства [3], имеющее огромное перспективное значение.

Применение биотехнологий дает возможность снизить затраты на сельскохозяйственное производство и обеспечить конкурентные преимущества производимой сельскохозяйственной продукции благодаря «созданию инновационных продуктов с заранее заданными свойствами» [5].

В научной литературе представлен ряд исследований по вопросам правового регулирования применения биотехнологий, в том числе в сфере сельского хозяйства и обеспечения биологической безопасности, например, труды В.Б. Агафонов [1], Н.О. Ведышевой [2], Н.Г. Жаворонковой [1]. Вместе с тем можно наблюдать отсутствие научно-обоснованных предложений по совершенствованию правового регулирования применения биотехнологий на основе правового моделирования, что обуславливает разрозненный характер законодательных инициатив. Это предопределяет необходимость определения концептуальной модели правового регулирования применения биотехнологий в сельском хозяйстве, на основе которой будут сформулированы предложения по совершенствованию действующего законодательства.

Методы исследования. В качестве методов исследования были применены формально-логический и компаративный, а также метод правового моделирования. Это позволило проанализировать современное состояние правового регулирования применения биотехнологий в сельском хозяйстве, выявить законодательные и правоприменительные проблемы и определить концептуальную модель правового регулирования применения биотехнологий в сельском хозяйстве.

Полученные результаты и их обсуждение. В Российской Федерации уровень внедрения аграрных биотехнологий составляет 2%, но по оценке отдельных экспертов, возможный потенциал в нашей стране – 80% [3].

Стратегическую основу развития биотехнологий в Российской Федерации составляют Указ Президента РФ от 28 ноября 2018 г. № 680 «О развитии генетических технологий в Российской Федерации», Постановление Правительства РФ от 22 апреля 2019 г. № 479 «Об утверждении научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг.», Федеральная научно-техническая программа развития сельского хозяйства на 2017–2025 годы, утвержденная Постановлением Правительства РФ от 25 августа 2017 г. № 996, Прогноз научно-технологического развития Российской Федерации на период до 2030 г. и др.

Одно из условий эффективного развития биотехнологий – соответствующее правовое регулирование. Совершенствование правового регулирования применения биотехнологий в сельском хозяйстве должно осуществляться на системной основе.

В качестве этой основы может выступать концептуальная модель правового регулирования применения биотехнологий в сельском хозяйстве (далее – модель правового регулирования). Под ней «понимается совокупность существенных признаков и характеристик внешнего и внутреннего правового воздействия на поведение участников определенной сферы общественных отношений посредством взаимосвязанных правовых средств, методов и способов, направленных на эффективное достижение целей через реализацию непосредственных и опосредованных задач. С внутренней стороны концептуальная модель правового регулирования применения биотехнологий в сельском хозяйстве – это система существенных признаков и характеристик правового воздействия на внутренние и внешние отношения, складывающиеся между производителями сельскохозяйственной продукции с применением биотехнологий, органами государственной власти и потребителями сельскохозяйственной продукции, направленных на эффективное решение задач, посредством которых обеспечивается продовольственная и биологическая безопасность, применение интенсивных способов ведения сельского хозяйства, повышение конкурентоспособности России на международном рынке. С внешней стороны модель правового регулирования применения биотехнологий в сельском хозяйстве – совокупность нормативных правовых актов, регулирующих отношения по применению биотехнологий в сельском хозяйстве» [4].

Составной частью внутренней стороны модели правового регулирования должны быть нормы, направленные на обеспечение безопасности жизни и здоровья человека, сельскохозяйственных животных и растений, окружающей среды.

В РФ предусматривается введение ряда норм, направленных на охрану жизни и здоровья человека при осуществлении генно-инженерной деятельности. Это Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности», Федеральный закон от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды», Федеральный закон от 17 декабря 1997 г. № 149-ФЗ «О семеноводстве», Федеральный закон от 2 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов», Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения». В РФ запрещен оборот пищевой продукции, которая не имеет маркировки, содержащей сведения о пищевых продуктах, либо в отношении которых не имеется таких сведений. Аналогичный подход закреплен и в законодательстве Таможенного союза.

Частью механизма правового регулирования должны быть правовые нормы, направленные на обеспечение безопасности кормовых культур и лекарственных препаратов, полученных при помощи биотехнологий, для сельскохозяйственных животных. Она обеспечивается рядом мер, в том числе государственной регистрацией кормов и лекарств, полученных при помощи геномных технологий (порядок регистрации определен Постановлением Прави-

тельства РФ от 23 сентября 2013 г. № 839 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, включая указанную продукцию, ввозимую на территорию Российской Федерации», а также приказами Минсельхоза России от 28 февраля 2020 г. № 92 «Об утверждении Методики производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения» и от 27.03.2020 № 160 «Об утверждении Методики производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства кормов и кормовых добавок для животных».

Правовое регулирование применения биотехнологий в сельском хозяйстве должно включать правовые нормы, направленные на сохранение биоразнообразия. Поэтому действующее законодательство должно предусматривать процедуру сопоставления рисков от обычной сельскохозяйственной деятельности и рисков от деятельности с применением биотехнологий. Это обуславливает возможность применения биотехнологий только при условии уменьшения антропогенной нагрузки на окружающую среду.

Правовой механизм применения биотехнологий также должен содержать правовые нормы, регулирующие информирование общественности относительно биотехнологий и полученной при их применении сельскохозяйственной продукции. Относительно ГМ-сельскохозяйственной продукции в настоящее время на платформе Минздрава России ведется сводный государственный реестр ГМО, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 5 июля 2016 г. № 476н «Об утверждении Порядка ведения сводного государственного реестра генно-инженерно-модифицированных организмов, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, и Порядка внесения информации в сводный государственный реестр генно-инженерно-модифицированных организмов, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы»). Полагаем, что ведение данного реестра также может быть интегрировано в систему агроинформирования, как это осуществляется в ряде стран.

Анализ документов стратегического планирования в сфере биотехнологий позволяет сформировать ряд направлений в развитии биотехнологий: определение в документах стратегического планирования ориентиров для увеличения доли потребления биотехнологических продуктов; совершенствование правового регулирования применения биотехнологий и технического регулирования по продукции, стимулирующей вторичную переработку продукции и отходов ее производства; распространение мер государственной поддержки сельхозпроизводителей на биотехнологическую продукцию; стимулирование использования биотехнологий в компаниях с государственным участием; совершенствование системы поддержки экспорта в части продвижения на мировой рынок биотехнологической продукции; развитие государственно-частного партнерства. Это требует соответствующего правового обеспечения. В частности, изменения должны быть внесены в Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности», в нормативные правовые акты, регулирующие информационное взаимодействие производителей сельскохозяйственной продукции с применением биотехнологий, органами государственной власти и потребителями продукции. Необходимо утвердить методики, ре-

гламентирующие процедуру оценки рисков неконтролируемого распространения и использования биотехнологий.

Учитывая вышеизложенное, правовое регулирование применения биотехнологий в сельском хозяйстве в РФ является многоаспектным, основано как на положениях государственной политики в сфере развития биотехнологий, так и государственной аграрной политики, направлено на обеспечение продовольственной безопасности и повышение конкурентоспособности России на международном рынке. Правовые нормы, направленные на обеспечение безопасности применения биотехнологий, необходимо интегрировать также в законодательство о биобезопасности.

Заключение. Проведенное исследование позволило выявить ряд законодательных и правоприменительных проблем применения биотехнологий в сельском хозяйстве, обусловленных несовершенством правового регулирования в данной сфере общественных отношений. Также можно отменить определенную бессистемность предложений по совершенствованию действующего законодательства. Предложена авторская концептуальная модель правового регулирования применения биотехнологий в сельском хозяйстве как совокупности существенных признаков и характеристик внешнего и внутреннего правового воздействия на поведение участников определенной сферы общественных отношений посредством взаимосвязанных правовых средств, методов и способов, направленных на эффективное достижение целей через реализацию непосредственных и опосредованных задач. Эту модель можно охарактеризовать как с внутренней, так и внешней сторон правового регулирования. С внутренней стороны – это система существенных признаков и характеристик правового воздействия на внутренние и внешние отношения, складывающиеся между производителями сельскохозяйственной продукции с применением биотехнологий, органами государственной власти и потребителями сельскохозяйственной продукции, направленных на эффективное решение задач, посредством которых обеспечивается продовольственная и биологическая безопасность, применение интенсивных способов ведения сельского хозяйства, повышение конкурентоспособности России на международном рынке. С внешней стороны – совокупность нормативных правовых актов, регулирующих отношения по применению биотехнологий в сельском хозяйстве.

Библиографический список

1. Агафонов В.Б., Жаворонкова Н.Г. Теоретико-правовые проблемы обеспечения биологической безопасности Российской Федерации // Актуальные проблемы российского права. 2020. № 4. С. 187–194.
2. Ведышева Н.О. Правовое регулирование генетических технологий в сельском хозяйстве // Генетические технологии и право в период становления биоэкономики: монография. М. : Проспект. 2020. С. 53–58.
3. Власова И.М., Асмарян А.Г. Экономические и организационные аспекты развития агrobiотехнологий // Вестник Российского государственного аграрного заочного университета. 2017. № 24. С. 39–42.
4. Воронина Н.П. Правовое регулирование использования биотехнологий в сельском хозяйстве России и зарубежных стран // Аграрное и земельное право. 2020. № 7. С. 17–23.
5. О регулировании рынков генетически модифицированных продуктов. По материалам статьи Ревенко Л.С. из Интернета. Информацию подготовили Степанова А.Э., Берлова Г.А. // Все о мясе. 2007. № 6. С. 10.

УДК 332.1

ОПЫТ РАЗВИТИЯ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОГО ПРОЕКТА В КОЛЛАБОРАЦИИ ВУЗА И СЕЛЬХОЗПОТРЕБКООПЕРАЦИИ

О.А. Высоцкая¹, Н.М. Сурай²

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

²Московский государственный университет технологий и управления имени

К.Г. Разумовского (Первый казачий университет), Москва, Россия

Сельхозпотребкооперация занимает очень важное место в наращивании экономического потенциала России, создании стимулов для роста товарной продукции, а также в повышении устойчивости развития сельских территорий. Однако до настоящего времени сельхозпотребкооперация в большей степени выполняла заготовительную и сбытовую функции, в значительной степени нивелируя функцию производственную. Между тем вектор развития РФ сегодня направлен на создание и развитие высокотехнологичных производств. Сельскохозяйственные потребкооперативы должны стать неотъемлемой частью данного процесса. В статье представлен опыт создания такого высокотехнологичного производства с участием сельхозпотребкооперации и вузовской науки.

Ключевые слова: сельскохозяйственная потребительская кооперация, коллаборация, инновации, высокотехнологичное производство, малый бизнес

Введение. Развитие малых форм предприятий в высокотехнологичной сфере является одним из главных приоритетов государственной политики Российской Федерации. Не является исключением и сфера АПК. Малые формы хозяйствования образуют базу агропромышленного комплекса страны и являются потенциалом развития сельскохозяйственной потребительской кооперации. Сельскохозяйственная потребительская кооперация малых форм хозяйствования во всем мире имеет ведущее значение в аграрном секторе. Так, во Франции, по данным Coorde France, 75 % фермеров являются членами хотя бы одного потребкооператива [1]. В мировом сообществе базой развития сельского хозяйства являются фермеры, которые введены в систему кооперативов или в систему интеграции с более крупными компаниями. Так, компании Valio или Campina изначально создавались как сельскохозяйственные кооперативы фермеров. В развивающихся странах наблюдается подобная ситуация. Например, правительство Эфиопии поощряет кооперативы в качестве одного из основных направлений политики поддержки предоставления услуг, направленной на стимулирование преобразований в сельском хозяйстве, повышение продовольственной безопасности и снижение уровня нищеты в сельских районах. В результате правительственной стратегии индустриализации, ориентированной на развитие сельского хозяйства, начатой в 1990 г., число кооперативов в сельскохозяйственном секторе Эфиопии увеличивается из года в год. Согласно опросу, проведенному Агентством по трансформации сельского хозяйства, кооперативный сектор в Эфиопии увеличился примерно на 87% за последние пять лет. Число кооперативов заметно выросло в региональных штатах Тыграй, Оромия и Сомали [2].

Число сельскохозяйственных кооперативов в России в 2019 г. выросло на 30,3% по сравнению с аналогичным периодом годом ранее [3], что привело к появлению около 20 тысяч новых рабочих мест. Это свидетельствует о высокой заинтересованности национальной сельской экономики в объединении малых форм хозяйствования в сельскохозяйственные потребительские кооперативы. Президент России В.В. Путин отмечает: «Кооперация,

как явление, зародилась у нас в 19 веке и с тех пор стала прочной традицией жизни русского социума. Она играет значимую роль в укреплении сельского хозяйства и национальной экономики. На сегодня кооперация также должна работать в интересах людей, решать вопросы обеспечения продовольственной безопасности России» [4].

В 2018 г. подписан Указ «О национальных целях и стратегических задачах развития РФ до 2024 г.», закрепляющий за сельскохозяйственной потребительской кооперацией статус задачи государственного масштаба. В настоящее время вопросам развития сельскохозяйственной потребительской кооперации в Российской Федерации уделяется значительное внимание, в частности на территории страны реализуется национальный проект «Малое и среднее предпринимательство и поддержка индивидуальной инициативы» [5]. В стране ежегодно проводится Всероссийский съезд сельских кооператоров. А на XXXII съезде Ассоциации крестьянских (фермерских) хозяйств и сельскохозяйственных кооперативов России, который прошел в феврале 2021 г., были отмечены следующие приоритеты в отношении сельхозкооперативов: наращивание господдержки фермерства, повышение его конкурентоспособности, продвижение наиболее эффективных форм сельскохозяйственной кооперации.

Материалы и методы исследования. Теоретическую основу исследования составили труды отечественных и зарубежных ученых-экономистов в области функционирования малых форм хозяйствования и сельскохозяйственных потребительских кооперативов, опубликованные в специализированных научных и периодических изданиях. В ходе работы использовались: монографический, абстрактно-логический, расчетно-конструктивный, экономико-статистический, сравнительного анализа и другие методы экономических исследований.

Информационной базой исследования послужили законодательные и нормативно-правовые акты Российской Федерации, официальные данные Федеральной службы государственной статистики РФ, материалы Министерства сельского хозяйства РФ, материалы интервью, данные управлений сельского хозяйства обследованных регионов, данные официального сайта Ассоциации крестьянских (фермерских) хозяйств и сельскохозяйственных кооперативов России.

Результаты и обсуждение. В России по итогам 2019 г. число сельскохозяйственных кооперативов увеличилось на 30,3% по сравнению с 2018 г. (рис. 1).



Рис. 1. Динамика числа сельскохозяйственных потребительских кооперативов в РФ за период 2013–2019 гг.

Потенциальной базой для роста сельскохозяйственной потребительской кооперации является то, что во всех регионах страны созданы и действуют центры компетенций, которые предоставляют личным подсобным хозяйствам и членам сельскохозяйственных кооперативов так называемый коробочный продукт – комплекс мер поддержки для сельскохозяйственных кооперативов. Данная активность проводится при участии нескольких институтов развития: Корпорации МСП, Минсельхоза РФ, Росагролизинга, Россельхозбанка и Сбербанка. Ведется активная работа по организации оптово-распределительных центров, учредителем в которых является сельскохозяйственный кооператив.

Алтайский край является одним из крупнейших аграрных регионов в Российской Федерации. Его отличительной особенностью является высокая доля сельского населения, которая составляет 43% (по России в среднем 26,1%). На 1 января 2020 г. в Алтайском крае функционировало 56 сельскохозяйственных потребительских кооператива, что в разы меньше в целом, чем в таких флагманских регионах, как Липецкая область и Республика Татарстан. Основные виды деятельности сельскохозяйственных кооперативов в крае – производство, закуп и переработка молока, мяса, овощей и другого сырья. В рамках федерального проекта «Создание системы поддержки фермеров и развитие сельской кооперации» Алтайский край должен к 2024 г. обеспечить вовлечение в малое и среднее предпринимательство не менее 1032 субъекта, осуществляющих деятельность в сфере сельского хозяйства. В связи с этим в Алтайском крае одним из первых среди регионов России в рамках регионального проекта «Создание системы поддержки фермеров и развитие сельской кооперации» разработана и реализуется пилотная модель создания сельскохозяйственного потребительского кооператива.

Следует отметить, что в крае практически отсутствуют высокотехнологичные наукоемкие производства в сельских районах в рамках деятельности сельхозпотребкооперативов. Один из пилотных кейсов в данном направлении – создание наукоемкого производства на территории Чарышского района с участием представителей научного сообщества региона. Проект направлен на создание технологии глубокой переработки меда. Технология разрабатывалась 2,5 года, затем было принято решение о масштабировании. На рисунке 2 представлен SWOT-анализ данного проекта.

Самым перевешивающим фактором в принятии решения о размещении производства была возможность использования имиджа территории для позиционирования и продвижения продукта. Еще один фактор – близость к источнику сырья.

Сильные стороны: — расположение производства в экологически чистом районе, что повышает качество брендинга; — близость к источникам сырья; — экономия на сырье	Слабые стороны: — проблемы с качеством рабочей силы; — удаленность от транспортных центров; — высокие тарифы на электроэнергию
Возможности: — наличие инструментов господдержки по линии Минсельхоза РФ, корпорации МСП; — возможность привлекать льготное финансирование	Угрозы: — рост тарифов на электричество, на доставку до транспортного центра; — неурожай, болезни пчел; — ограниченность ресурсной базы

Рис. 2. SWOT-анализ проекта создания технологии глубокой переработки меда

Однако существенно сдерживающими факторами являются проблемы с квалифицированной рабочей силой, а также высокие тарифы для производства и логистики.

Заключение. Несмотря на наличие инструментов поддержки сельхозпотребкооперации, существуют явные проблемы для развития сети наукоемких производств. Речь в первую очередь идет о проблемах с рабочей силой и тарифами. Между тем развитие кооперативов в сельской местности может способствовать закреплению молодежи, повышению устойчивости социально-экономического развития, а также формировать пул конкурентоспособных предприятий, ориентированных также и на экспорт.

Библиографический список

1. Сердюкова М.Н., Николаева Е.В. Развитие сельскохозяйственной кооперации и малых форм хозяйствования в зарубежных странах // Вестник ЧелГУ. 2017. №10 (406). Экономические науки. Вып. 58. С. 147–155.
2. Kifle T.S., Tafesse W.G., Tekeste B., Miet M., Steven Van P., Marijke D'Haese Exploring variability across cooperatives: economic performance of agricultural cooperatives in northern Ethiopia // International Food and Agribusiness Management Review. 2021. Vol. 24(3). P. 397–419.
3. Браверман: количество сельхозкооперативов в России в 2019 г. выросло на треть URL: <https://tass.ru/msp/8520775> (дата обращения: 10.09.2021).
4. Путин рассказал о важности кооперации в сельском хозяйстве. URL: <http://www.kremlinrus.ru/news/165/77933/> (дата обращения: 01.05.2021).
5. Черненко Е.В., Бутырина Ю.А. Опыт регионов РФ по развитию сельскохозяйственной потребительской кооперации // Аграрная наука в XXI веке: проблемы и перспективы : сборник статей Всероссийской (национальной) научно-практической конференции. Саратов, 2020. С. 260–264.

УДК 663.18

ИНЖИНИРИНГОВЫЙ ЦЕНТР «ПРОМБИОТЕХ»: ИСТОРИЯ СТАНОВЛЕНИЯ И ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

И.Ю. Евдокимов, А.В. Гребенищикова, М.В. Ширманов, А.Н. Иркитова
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

В статье представлены данные по истории инжинирингового центра «Промбиотех», который был открыт на базе Алтайского государственного университета в 2015 г. Инжиниринговый центр выбран в качестве одного из 30 проектов создания инжиниринговых центров в Российской Федерации, которые были отобраны на конкурсе Минобрнауки и Минпромторга. В настоящее время центр оказывает услуги по разработке технологии производства биопрепаратов для различных отраслей народного хозяйства и, по оценке их эффективности.

Ключевые слова: инжиниринговый центр, Промбиотех, биопрепараты, сельское хозяйство.

Инжиниринговый центр (ИЦ) – юридическое лицо, оказывающее инженерно-консультационные услуги по подготовке процесса производства и реализации продукции (работ, услуг), подготовке строительства и эксплуатации промышленных, инфраструктурных и других объектов, предпроектные и проектные услуги (подготовка технико-экономических обоснований, проектно-конструкторских разработок и другие подобные услуги) [1].

Сложно составить единую классификацию инжиниринговых учреждений ввиду того, что подобной деятельностью занимается множество разнопрофильных организаций. В настоящее время выделяют следующие учреждения и предприятия, занимающиеся инжинирингом: конструкторские бюро; проектные компании; инжиниринговые учреждения; экспериментальные организации; изыскательно-проектные организации; технологические предприятия; заводы, имеющие инжиниринговые отделы.

Данный список учреждений также целесообразно расширить за счет включения в него высших учебных заведений и научно-исследовательских институтов. Ведь инжиниринговые услуги бывают не только строительные, но еще химические, биотехнологические, чем непосредственно занимаемся мы, и пр. [2].

В последнее десятилетие в Российской Федерации взят вектор на инновационное развитие промышленных производств [3]. Для достижения этой цели по всей стране были открыты инжиниринговые центры, деятельность которых направлена на разработку и практическое внедрение новых технологий в полный инжиниринговый цикл с их последующей коммерциализацией. Одним из 30 таких учреждений как раз и является ИЦ «Промбиотех», представляющий собой структурное подразделение Алтайского государственного университета (Барнаул, Алтайский край).

Лабораторно-промышленный комплекс «Промбиотех» был открыт в 2015 г. на базе АлтГУ совместно с биотехнологическими компаниями и ведущими научно-исследовательскими институтами РФ в рамках подпрограммы «Развитие инжиниринга и промышленного дизайна» государственной программы РФ «Развитие промышленности и повышение ее конкурентоспособности», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 15 апреля 2014 г. № 328. Центр создавался для проведения опытно-конструкторских работ в области биотехнологии, пищевой промышленности и сельского хозяйства, а также содействия в разработке, масштабировании, внедрении новых технологий на различных предприятиях. В 2015 г. Алтайский государственный университет победил в конкурсе Минобрнауки РФ, реализуемом в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», на разработку технологий производства импортозамещающих препаратов: кормового антибиотика и биоконсерванта для животноводства с использованием доступного отечественного сырья.

В 2015–2016 гг. на закупку оборудования в «Промбиотех» было потрачено более 100 млн рублей, а уже с 2016 г. опытное производство было введено в строй. В настоящее время инжиниринговый центр включает лабораторные помещения для микробиологических и биохимических исследований, опытно-промышленный участок, оборудованный ферментационными установками различной реакционной емкости (15 л, 250 л, а также установка промышленного синтеза из трех биореакторов), а также офис для работы с документами и ведения переговоров.

С момента основания ИЦ «Промбиотех» в качестве его партнеров выступали такие научные организации, как ФИЦ Биотехнологии РАН, ВИЖ им. Л.К. Эрнста, ФНЦ «ВНИИ-ТИП» РАН и пр. В 2015–2017 гг. центром реализовывались масштабные работы по промыш-

ленным испытаниям биопрепаратов для сельского хозяйства в рамках Федеральной целевой программы. Всего было проведено более 100 промиспытаний биологических препаратов («Энзимспорин», «Лактоамиловорин-СП», «Фермасил») на фермах и хозяйствах Алтайского края, Воронежской, Вологодской, Московской областей и других регионов РФ. В 2017 г. проводились испытания биофунгицида «Метабактерин».

В 2018 г. после победы в конкурсе краевых грантов в центре начались работы по расширению коллекции микроорганизмов, и на данный момент она насчитывает порядка 50 штаммов, среди которых представлены лактобациллы, бифидобактерии, споровые бациллы, дрожжи и другие микроорганизмы. Это позволило ИЦ «Промбиотех» заниматься созданием собственных биопрепаратов. Центр разработал дезинфектант для сельскохозяйственных помещений, а в 2019 г. выиграл внутриуниверситетский грант на создание синбиотической бактериальной закваски.

В этом же году у инжинирингового центра появился новый промышленный партнер – ООО «Арсал», для которого «Промбиотех» создал пробиотик для аквакультуры. За 2020 г. ИЦ выполнил 15 хозяйственно-договорных работ на сумму 1,519 млн руб. для промышленных партнеров.

В 2021 г. в центре разработано средство для защиты растений на основе споровых бацилл, выигран внутриуниверситетский грант на исследование эффективности биофунгицида в лабораторных условиях. Параллельно с этим начались промышленные испытания препарата на полях Алтайского научно-исследовательского института сельского хозяйства. Проведение данного рода работ запланировано на 2021–2023 гг.

К началу августа за 2021 г. «Промбиотех» уже исполнил 6 хозяйственно-договорных работ на сумму 800 400 рублей. Ключевым партнером ИЦ «Промбиотех» на данный момент является ООО ИПК «ЗетГен» (Новосибирская область).

В настоящий момент сотрудниками инжинирингового центра являются 6 человек с высшим биологическим образованием, А.Н. Иркитова имеет степень кандидата биологических наук. Коллектив активно занимается научно-исследовательской деятельностью: участвует в конкурсах грантов различных уровней (внутриуниверситетских, краевых, «Умник», «Старт», РНФ), имеет публикации в рейтинговых журналах РИНЦ, ВАК, WoS и Scopus, а также 10 патентов на изобретения.

ИЦ «Промбиотех» в данный момент предоставляет следующие услуги:

- проведение лабораторно-промышленных испытаний эффективности инновационных биопрепаратов для АПК;
- инженерно-исследовательские услуги по разработке технологических процессов производства биопрепаратов для сельского хозяйства, пищевой и перерабатывающей промышленности;
- разработка технологии получения новых биологических препаратов (в том числе наработка опытной партии).

До конца 2021 г. планируется расширение линейки биологических реакторов за счет введения в работу более вместительных биореакторов объемом 1000 л. Это позволит инжиниринговому центру реализовывать более крупные проекты.

С момента своего основания «Промбиотех» преимущественно проводил испытания эффективности препаратов своих промышленных партнеров. После создания коллекции собственных штаммов микроорганизмов инжиниринговый центр расширил пул своих услуг за счет разработки новых биопрепаратов. Наращивание производственных объемов способствует увеличению конкурентоспособности ИЦ как на региональном, так и на всероссийском уровнях.

Библиографический список

1. Постановление Правительства Российской Федерации от 22 февраля 2014 г. № 134 «Об утверждении Правил предоставления субсидий из федерального бюджета российским организациям на компенсацию части затрат на реализацию пилотных проектов в области инжиниринга и промышленного дизайна в рамках подпрограммы "Обеспечение реализации государственной программы" государственной программы Российской Федерации "Развитие промышленности и повышение ее конкурентоспособности"». 2014. 17 с.
2. Уразаев Д.Р. Инжиниринговые центры в структуре вузов // Научный журнал. 2019. № 2 (36). С. 24–26.
3. Чекмачев И.Ю., Иода Е.В. Инжиниринговый Центр как элемент инновационной инфраструктуры региона // Социально-экономические явления и процессы. 2014. Т. 9. № 9. С. 84–95.

УДК 664

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ РЕСУРСОВ СИБИРИ ДЛЯ ЛИКВИДАЦИИ ЙОДОДЕФИЦИТА НАСЕЛЕНИЯ РОССИИ

А.А. Ефремов^{1,2}, Е.Л. Демидов³, А.А. Волков²

¹СКТБ «Наука» ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

²Инжиниринговый центр «РОСТ», Красноярск, Россия

³Дивногорский хлебозавод, Красноярск, Россия

В Сибирском Федеральном округе, наряду с другими округами РФ, отмечен высокий уровень заболевания щитовидной железы, обусловленный недостатком йода. Статья посвящена проблеме обогащения продуктов питания витаминно-минеральными добавками, произведенными из жмыха кедрового ореха и дикорастущих сибирских ягод.

Ключевые слова: йододефицит, витаминно-минеральный комплекс, кедровый жмых, черника.

С давних времен кедровый орех служил не только излюбленным лакомством, но и ценным пищевым продуктом. Жирное масло, богатое витаминами (группы В, Е) и полиненасыщенными жирными кислотами $\omega 3$ и $\omega 6$, вместе с растительным белком, содержащим практически все аминокислоты и жизненно важными макро- и микроэлементами самого ядра кедрового ореха, и определяло физиологическую ценность орехов.

Высокое содержание жирного масла в ядрах кедрового ореха (более 60%) [1–7] не позволяло использовать кедровый орех в повседневном пищевом рационе. В то же время в последние годы в продаже стало появляться кедровое масло холодного отжима, а вместе с тем и так называемый кедровый жмых. Ценность кедрового жмыха заключается в том, что в нем сохранено содержание белков, клетчатки и макро- и микроэлементов, а сам он усваивается гораздо легче, так как содержит только остаточное количество жирного масла, не превышающее 10–15%.

Очевидно, что кедровый жмых – природный высококачественный витаминно-минеральный комплекс. И если в кедровом жмыхе содержится незначительное количество витаминов, то его особая ценность заключается в содержании макро- и микроэлементов, необхо-

димых человеку в процессе жизнедеятельности. Особую ценность составляют элементы, перечисленные в таблице 1 [8–12]. Кроме того, кедровый жмых является экологически безвредным, так как практически не содержит тяжелых металлов, таких как свинец, кадмий, мышьяк и ртуть.

В Сибирском федеральном округе, наряду с другими округами РФ, отмечен высокий уровень заболевания щитовидной железы [13–20]. Йод – единственный из микроэлементов, участвующий в образовании гормонов щитовидной железы – трийодтиронина и тироксина, а его недостаток приводит к развитию эндемического зоба, риску возникновения рака щитовидной железы и молочных желез, к ослаблению иммунной системы человека [13–15]. Наиболее тяжелые последствия йодный дефицит оказывает на растущий мозг ребенка, формируя его необратимые нарушения, приводящие в наиболее тяжелых случаях к кретинизму, в более мягких условиях – к снижению интеллектуального потенциала [16–18].

Ликвидация йододефицитных заболеваний – приоритетное направление деятельности международных организаций, таких как Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), Детский фонд Организации объединенных наций (ЮНИСЕФ), Международный Совет по контролю за йододефицитными заболеваниями (МС ЙДЗ) и др.

В связи с этим появилась отличная возможность – используя витаминно-минеральный комплекс кедрового жмыха, обогатить его химически закрепленным йодом, так как хорошо известно, что усвоение йода организмом протекает более эффективно, когда йод находится в связанной форме в органической матрице [5–6, 21]. Идея химического закрепления йода в кедровом жмыхе основана на том, что в нем имеется остаточное содержание жирного масла, в состав которого входят триглицериды ненасыщенных жирных кислот и, при благоприятном исходе, йод будет химически закрепляться по двойным связям этих кислот. Очевидно, что такой йодированный кедровый жмых может с успехом применяться в производстве хлебобулочных и кондитерских изделий с целью ликвидации йододефицита (табл. 1).

Таблица 1

Среднее содержание микро- и макроэлементов в йодированном кедровом жмыхе, производимом авторами

Элемент	Содержание, мг/100 г
Фосфор	987±46
Магний	1045±52
<i>Калий</i>	899±45
Натрий	223±11
Кальций	112±6
Железо	5±0,5
Марганец	1,2±0,03
Медь	2,6±0,04
Цинк	12,4±0,10
Йод	до 150

В СКТБ «Наука» ФИЦ КНЦ СО РАН отработаны все стадии процесса закрепления йода в кедровом жмыхе с получением кедровой муки, которая гомогенно смешивается с пше-

ничной мукой, что позволяет использовать такие смеси в качестве исходного сырья для получения хлебобулочных изделий, обогащенных йодом (рис. 1).

На Дивногорском хлебозаводе разработана рецептура выпекания йодового хлеба с содержанием йода до 75 мкг в 100 граммах хлеба (отметим, что суточная потребность йода для взрослого человека составляет 150–200 мкг) [21]. Завод производит до 1000 кг такого продукта в месяц.



Рис. 1. Жмых кедровый пищевой йодированный с содержанием наночастиц закрепленного йода 1500 мкг/грамм



Рис. 2. Йодовый хлеб ООО «ДиХлеб»

Учитывая тот факт, что йод в таком случае связан с органической матрицей (с ненасыщенными жирными кислотами остаточного кедрового масла), то он полностью усваивается организмом. При этом нормализуется деятельность щитовидной железы, укрепляется иммунитет человека, повышается его работоспособность, умственная способность, нормализуется протекание процессов роста и развития всего организма. Положительные результаты укрепления иммунной системы человека при потреблении йодового хлеба получены в Институте профилактического и лечебного питания при Красноярском государственном медицинском университете (КрасГМУ) (рис. 3).

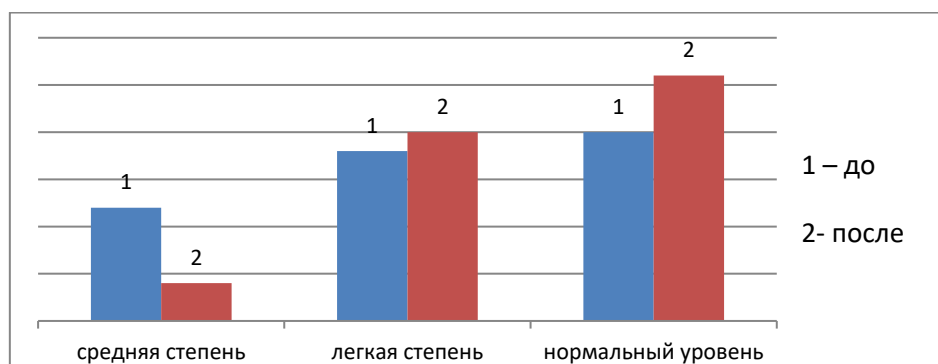


Рис. 3. Динамика показателей степени йодного баланса у обследованных основной группы (52 чел.) после употребления йодового хлеба в течение одного месяца

Для усиления физиологической активности пищевого продукта мы разработали рецептуру и отработали технологию изготовления биологически активной добавки, которая полу-

чила название омега-йод – йодированный кедровый жмых с глюкозой. Кроме того, в омега-йод можно вносить антиоксиданты дикорастущих сибирских ягод – клюквы, брусники, черники, голубики или их смесей. Предварительные исследования [23–26] показали, что концентраты вышеуказанных ягод богаты отдельными антоцианами (рис. 4), а их смесь надежно защищает организм человека от активных радикалов кислорода, снижая риск онкологических заболеваний.

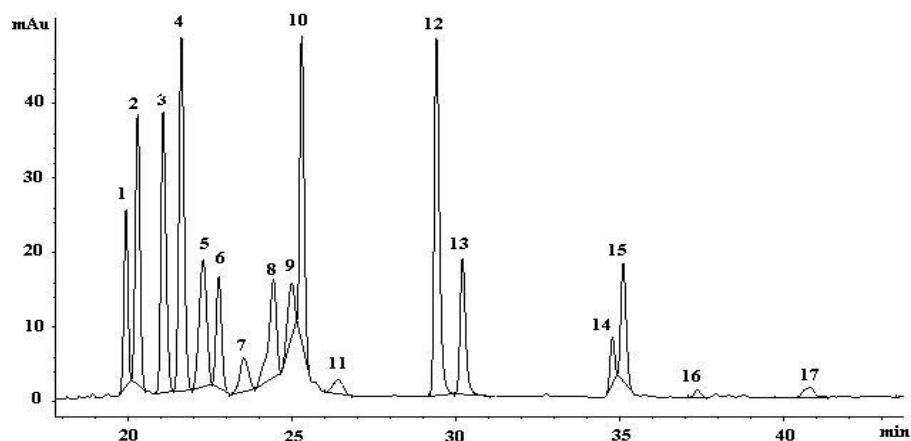


Рис. 4. Хроматограмма антоцианов плодов черники обыкновенной (1 – дельфинидин-3-галактозид; 2 – дельфинидин-3-глюкозид; 3 – цианидин-3-галактозид+ дельфинидин-3-арабинозид; 4 – цианидин-3-глюкозид; 5 – петунидин-3-галактозид; 6 – цианидин-3-арабинозид; 7 – петунидин-3-глюкозид; 8 – пеонидин-3-галактозид; 9 – петунидин-3-арабинозид; 10 – пеонидин-3-глюкозид; 11 – мальвидин-3-галактозид; 12 – пеонидин-3-арабинозид; 13-мальвидин-3-глюкозид)

Суммарное содержание антоцианов в соках дикорастущих ягод юга Красноярского края, согласно нашим данным высокоэффективной жидкостной хроматографии, составило величины, указанные в таблице 2.

Таблица 2

Суммарное содержание антоцианов в пересчёте на цианидин-3-глюкозид
в плодах сибирских ягод

№ п/п	Название ягоды	Содержание, мг/100 г мороженных плодов
1	Черника обыкновенная	1309±9
2	Рябина черноплодная	902±5
3	Черемуха обыкновенная	185±2
4	Жимолость обыкновенная	180±2
5	Голубика обыкновенная	117±2
6	Ирга овалолистная	93±6

Таким образом, биологически активная добавка омега-йод с добавками черники или рябины черноплодной нормализует деятельность щитовидной железы и защищает организм человека от высокореакционных радикалов кислорода.

Библиографический список

1. Ефремов А.А. Перспективы малотоннажной переработки кедровых орехов в продукты пищевого и технического назначения // Химия растительного сырья. 1998. № 3. С. 83–86.
2. Кутузов П.К. Богатства кедровой тайги. Красноярск, 1955. 79 с.
3. Бех И.А., Таран И.В. Сибирское чудо-дерево. Новосибирск, 1979. 114 с.
4. Ефремов А.А., Забродина С.В. Возможности комплексной переработки кедровых орехов с получением продуктов пищевого назначения // Экономика. Психология. Бизнес. 2004. № 2. С. 89–101.
5. Перцев К.В., Ефремов А.А., Оффан К.Б. Комплексная переработка кедрового ореха с получением продуктов пищевого и технического назначения // Достижения науки и техники – развитию сибирских регионов : тезисы докл. Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Красноярск, 1999. Ч. 2. С. 226–227.
6. Ефремов А.А., Перцев К.Б., Половинкина Н.И. Научно-практические аспекты комплексной переработки кедровых орехов // Ресурсы регионов России. 2001. № 4. С. 42–46.
7. Ефремов А.А., Гончаров Д.А. Жирнокислотный состав глицеридов кедрового и рыжикового масел, а также семян лопуха большого // Молодежь и химия : материалы Международной научной конференции. Красноярск. 2002. С. 318–319.
8. Семена кедрового / под ред. Н.Е. Судачковой. Новосибирск, 1979. 129 с.
9. Иванов В.А. Кедр и кедровый промысел. М., 1934. 225 с.
10. Каретников П.В. О химическом составе кедровых орехов и их влиянии на желудочную секрецию : автореф. дис. ... канд. техн. наук. Иркутск, 1967. 21 с.
11. Руш В.А. Химический состав орехов сибирского кедрового и некоторые его закономерности : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1968. 18 с.
12. Руш В.А., Лизунова В.В. Некоторые закономерности химического состава семян сибирского кедрового // Растительные ресурсы. 1969. Т. 5. Вып. 4. С. 519–526.
13. О мерах по профилактике заболеваний, связанных с дефицитом йода : Постановление Правительства РФ от 5 октября 1999 г. № 1119 (с изменениями и дополнениями). URL: <http://base.garant.ru/4176121/#ixzz4kWFyolvW>.
14. Трошина Е.А., Платонова Н.М. Метаболизм йода и профилактика йододефицитных заболеваний у детей и подростков // Вопросы современной педиатрии. 2008. Т. 7. № 3. С. 66–75.
15. Хамнуева Л. Ю., Андреева Л.С. Йододефицитные заболевания и синдром гипотиреоза: этиология, патогенез, диагностика, лечение. Иркутск, 2016. 44 с.
16. Платонова Н.М., Трошина Е.А. Йодный дефицит: решение проблемы в мире и России (25-летний опыт) // Consilium Medicum. 2015. № 4. С. 44–50.
17. Дефицит йода – угроза здоровью и развитию детей России: Национальный доклад / И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко, Е.А. Трошина и др. М., 2006. 124 с.
18. Ковальжина Л.С., Макарова Л.Б. Массовая профилактика йодного дефицита: особенности законодательства и информированность разных групп населения региона зобной эндемии // Медицина и образование в Сибири. 2015. № 3. С. 14–21.
19. Хинताल Т.В. Дефицит йода и йододефицитные заболевания: актуальность проблемы профилактики и лечения в Российской Федерации // Terra Medica Nova. 2010. № 1. С. 25–28.

20. Дзахмишева И.Ш. Профилактика йододефицита функциональными продуктами питания // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 10-11. С. 2418–2421.
21. Тутьельян В.А., Суханов Б.П., Австриевских А.Н., Позняковский В.М. Биологически активные добавки в питании человека. Томск, 1999. 295 с.
22. Ефремов А.А., Ефремов Е.А. Инновационные продукты при комплексной переработки кедровой сосны сибирской // *Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : материалы VII Всероссийской конференции с международным участием*. Барнаул, 2017. С. 151–153.
23. Полина С.А., Ефремов А.А. Сравнение антоцианового состава ягод Сибири методом ВЭЖХ // *Теория и практика хроматографии : сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой памяти профессора М.С. Вигдергауза*. Самара, 2015. С. 75.
24. Осипова С.А., Ефремов А.А. Определение антоцианов в плодах *Rubus Saxatilis*, *Cerasus Tomentosa* и кожуре *Garcinia Mangostana* методом ВЭЖХ // *Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : материалы VII Всероссийской конференции с международным участием*. Барнаул, 2017. С. 212–215.
25. Полина С.А., Хмарская Н.Е., Ефремов А.А. Сравнительный анализ условий экстракционного извлечения антоцианов *Aronia melanocarpa* Сибирского региона. // *Журнал Сибирского федерального университета. Химия*. 2015. № 2. С. 222–231.
26. Полина С.А., Хмарская Н.Е., Ефремов А.А. Антоцианы плодов *Vaccinium myrtillus* L. Красноярского края // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2015. №6. С. 29–34.

УДК 637.3

НАПРАВЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОГО РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

О.А. Задорина, И.В. Чишкова

ООО «ИНГРЕДИКО», Москва, Барнаул, Россия

Во всем мире потребители все чаще отдают предпочтение безопасным, полезным и вкусным продуктам с минимальным ингредиентным составом и оптимальным сроком годности. Основываясь на своем многолетнем опыте, компания Chr.Hansen разработала серию биозащитных культур FreshQ®, которые позволяют сохранить отличную свежесть производимых продуктов даже при нарушениях холодной цепочки хранения и сложных условиях производства. Биозащита – натуральный способ защиты продуктов питания от вредной микрофлоры.

Ключевые слова: защитные культуры, ферментированные продукты, микрофлора, биозащита, FreshQ.

С того момента, как наши предки в стремлении сохранить молоко как продукт питания получили первые простоквашу, кефир и йогурт, началась эпоха кисломолочных продуктов.

Кисломолочные продукты представляют собой результат направленной и контролируемой ферментации молока с применением или без применения концентрации его составляющих. И если самые первые продукты подразумевали лишь возможность частичного контроля микрофлоры, развивающейся в молоке, с помощью температуры и примитивных пересядок закваски, то на данный момент технологи молочных предприятий имеют внушительный арсенал средств контроля и управления процессом от фермы практически до реализации продукта.

Мощнейшая научная база, сформированная отечественными учеными в XX в., позволила поднять производство молочных продуктов на новый уровень и до сих пор имеет значительный задел на будущее. В современной России функционируют влиятельные научно-исследовательские институты, которые формируют повестку дискуссий в технологическом сообществе и предлагают отрасли пути развития.

Специалисты на предприятиях ежедневно применяют знания, полученные в научной среде, для производства безопасных и качественных молочных продуктов. Высокий уровень знаний технологии и микробиологии позволяет вырабатывать продукты со значительными сроками годности, а также великолепной органолептикой. Тем не менее даже при применении всех возможных технологических приемов существуют значительные риски для продукта, вышедшего с завода и отправленного в торговую сеть.

Укрупнение предприятий привело к увеличению сроков поставки продуктов в торговые сети, что требует более строгого микробиологического контроля, ведь в таких условиях велик риск прерывания цепочки холодного хранения, что влечет за собой развитие микрофлоры вторичного обсеменения, в том числе дрожжей и плесени.

Также становится актуальным вопрос сроков хранения молочной продуктов, таких как сметана, творог и йогурт, которые могут оставаться открытыми в холодильнике потребителя дольше рекомендованных 24 часов. На этом этапе риски заражения продуктов спорами плесени или дрожжами возрастают в несколько раз. При этом далеко не всегда потребители осознают возможные риски, а также влияние условий хранения на холодной полке магазина и бытовых холодильников на процесс порчи продукта – для потребителя главной мишенью недовольства становится именно производитель, особенно это заметно по публикациям в социальных сетях.

Зарубежные биотехнологические компании столкнулись с потребностью производителей усилить контроль качества продукта немного раньше отечественных, поэтому имеют опыт и готовые решения биозащиты молочных продуктов, и это не консерванты, полученные химическим либо микробиологическим путем. Эффективным и в то же время безвредным оказалось применение так называемых защитных, антагонистических к микроорганизмам порчи культур.

Компания Chr.Hansen вывела на российский рынок линейку культур FreshQ, представляющую собой концентраты определенных штаммов *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*.

Штаммы были отобраны по высокой антагонистической активности к развитию дрожжей и плесеней в кисломолочных продуктах: сметане, твороге, йогурте. Развитие микрофлоры, входящей в состав защитной культуры, происходит совместно с основной культурой, при этом не происходит замедления ферментации.

Однако уже на этом этапе включается первый антагонистический механизм – культуры конкурируют с микрофлорой вторичного обсеменения за питательные вещества.

Защитный эффект FreshQ® 1 в сметане

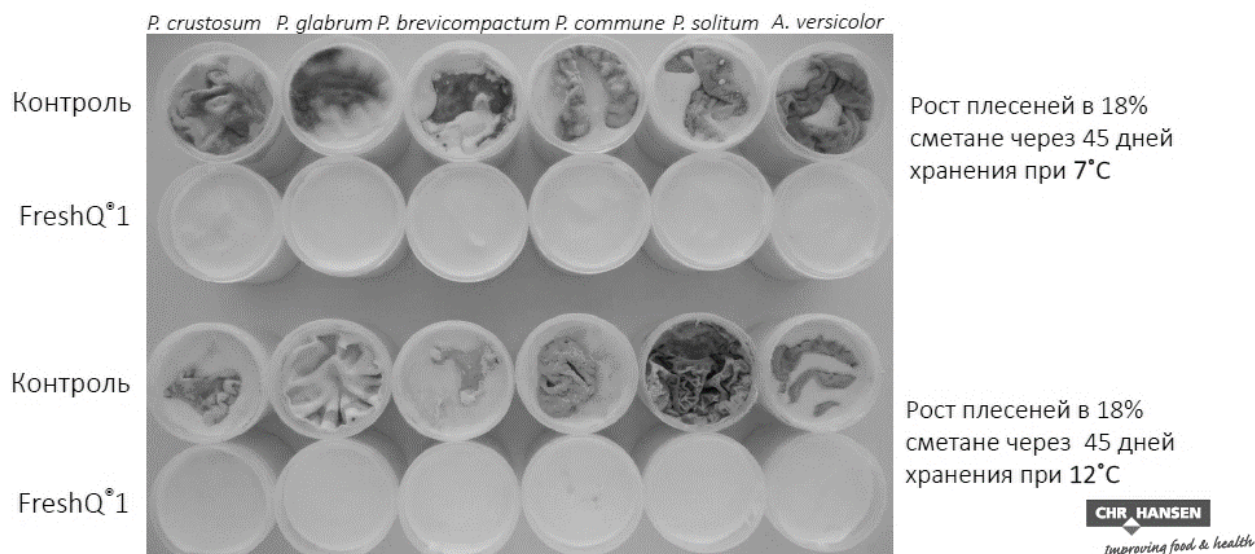


Рис. 1. Защитный эффект FreshQ® 1 в сметане

Сохранение качества и безопасности продукта в течение всего срока годности обеспечивается за счет второго антагонистического механизма – продуцирования защитной микрофлорой метаболитов, подавляющих рост микроорганизмов порчи.

Компания Chr.Hansen выделила более тридцати метаболитов, включая органические кислоты, производные аминокислот, циклические дипептиды, пероксид и другие соединения, оказывающие фунгистатический эффект. Все эти соединения являются натуральными продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, полностью безопасны для человека в том количестве, которое присутствует в продукте, но при этом комплексно воздействуют на споры дрожжей и плесеней, предотвращая их развитие.

В результате ферментации предприятие получает продукт с чистым вкусом и воспроизводимыми органолептическими показателями.

Помимо того, существуют данные о том, что микроорганизмы способны к межклеточному взаимодействию. Это позволяет им развить систему распознавания «свой-чужой» и активно применять ее для подавления нежелательных микроорганизмов. К сожалению, этот антагонистический механизм до конца не изучен, тем не менее, культуры серии FreshQ Chr.Hansen продемонстрировали его действие в лабораторных тестах.

Каждая культура серии была протестирована специалистами компании ООО «ИНГРЕДИКО» на ряде традиционных продуктов, и был получен положительный результат в процессе применения защитных культур.

УДК 620.2

ВЛИЯНИЕ ГМО-ПРОДУКЦИИ НА ЭКОЛОГИЧЕСКУЮ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННУЮ БЕЗОПАСНОСТЬ

А.С. Исрайилова

*Кыргызский экономический университет им. Рыскулбекова,
Бишкек, Кыргызская Республика*

В статье раскрывается влияние генно-модифицированных организмов на сферы экологической и продовольственной безопасности, проанализированы законодательные механизмы правового регулирования указанных сфер. Рассматривается опыт отечественных и зарубежных ученых в сфере исследований данной в области.

Ключевые слова: генная инженерия, трансгены, закон, регулирование, биосфера.

Генная инженерия возникла в результате исследований во второй половине XIX в. Швейцарский ученый Фридрих Мишер обнаружил нуклеин (ДНК). Позднее, в начале XX в., Уолтер Станборо Саттон доказал, что в хромосомах локализованы факторы Менделя, в Дании Вильгельм Йохансен назвал их генами. Далее исследованием занимались и достигли успехов в разные периоды XX в. видные ученые.

Благодаря генной инженерии появились возможности решения ряда проблем:

- демографических;
- экологических;
- экономических;
- продовольственного обеспечения.

Становление генной инженерии включает три этапа:

- свидетельство вероятности получения и создания молекул ДНК;
- организация работ для получения молекул ДНК и подтверждение их жизнеспособности;
- включение молекулы ДНК, перенос генов для встраивания.

В мире о продуктах ГМО население стало узнавать с 1987 г, за исключением научного сообщества, а промышленное выращивание продуктов ГМО для коммерческих целей начали в США с 1994 г. Томат – первая одобренная сельскохозяйственная культура в США.

В 1999–2007 гг. в прессе появились результаты научных исследований, доказывающие губительное воздействие ГМО-продуктов на организм теплокровных существ. Выводы научных исследований, проведенных биологом, указывают, что потребление трансгенной картошки оказало разрушительное воздействие на организм крыс, у них появились опасные для здоровья изменения печени и кишечника. Результаты, полученные и опубликованные, вызвали полемику в обществе. В поддержку его исследований был опубликован меморандум, подписанный крупными учеными-биологами.

В России показано, что при кормлении крыс трансгенной соей после рождения в течение 21 суток умерло 51,6% потомства, а выжившие вдвое уступали по весу и размерам своим сородичам, были недоразвитыми и ослабленными.

Прогрессивный рост в области биотехнологий в конце XX в. позволил науке вмешиваться в ген любого организма. Генная инженерия стала наукой, которая направлена на изменение человека и природы, позволяет создавать новые гены и изменять их структуру.

Российское законодательство определяет генную инженерию как совокупность методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

Это совокупность подходов и методов с целью приобретения биологических структур животных, белков, растений, микроорганизмов и индивидуальных генов с передаваемыми на генетическом уровне свойствами.

Технологии генной инженерии способствуют преодолению несовместимости между изначально неродственными организмами (животными). Функционирование генной инженерии происходит в замкнутой и открытой системе:

— замкнутая деятельность – это осуществление работ по предотвращению контакта с окружающей средой и населением при модификации, культивации, транспортировке, обработке, хранении, уничтожении, захоронении и т. д.;

— открытая деятельность – это осуществление работ с допущением контакта организмов с окружающей средой и населением при модификации, специальном применении в окружающей среде, медицине, импорте, экспорте, при обмене технологий и подобном открытая деятельность, самая распространенная в мире.

Выращивание в сельском хозяйстве трансгенных растений связано с высокой урожайностью, визуальным качеством. Широкомасштабное выращивание трансгенных растений вызывает беспокойство общества на международном и национальном уровне.

В США после 10 лет коммерческого производства трансгенных растений традиционные культуры оказались зараженными. Результаты лабораторного анализа обнаружили присутствие генетически модифицированного материала: в рапсе – 83 %, кукурузе – 50 % и сое – 50 %. США более 60 % кукурузы экспортируют в Африку и Азию. Биотехнологические компании активно внедряются на рынок развивающихся стран. Мексика наложила запрет на выращивание трансгенной кукурузы из-за происходящего заражения трансгенными модификациями традиционных сортов кукурузы.

Интродукция инородных типов во внешнюю среду – основная причина уменьшения разнообразия среди растений. Список инородных видов может увеличиться за счет использования в сельском хозяйстве трансгенных семян и выведенных при селекции животных, масштабы и последствия воздействия на коренную экосистему непредсказуемы. Созданные трансгенные растения имеют преимущество над естественными, они более устойчивы к пестицидам, вредителям и климату, стремительно распространяются на близлежащие территории, ставя под угрозу биологическое многообразие растений.

Защита и сохранение традиционных растений от заражения их модифицированными аналогами являются необходимостью для экологии в аграрной отрасли и сохранения природного разнообразия.

По заверению специалистов, если не остановить распространение трансгенных растений, в ближайшее время человечество может столкнуться с неустойчивостью сельского хозяйства и прямой зависимостью от международных корпораций и производителей ГМО-семян. Влияние ГМО-продуктов на человеческий организм слабо изучено, многие ученые считают, что употребление ГМО-лекарств, продуктов может повлиять на мутацию организма человека, снижение уровня иммунитета, вспышки аллергии и т.д.

Безопасность при употреблении ГМО-продуктов не гарантирована, влияние ГМО на организм человека слабо изучено. Мониторинг материалов конференций, круглых столов,

научных статей и публикаций в прессе выделяет риски и угрозы для человека и природы от распространения продуктов генной инженерии:

- угроза биоразнообразию;
- загрязнение натуральных растений трансгенными видами;
- появление инородных вирусов, инфекций и бактерий;
- химическое и биологическое загрязнение природной среды;
- мутации человеческого организма;
- мутации организма животных;
- угроза здоровью человека;
- исчезновение традиционной пищи;
- нарушение биосферы и т. д.

В 2001 г в Бангкоке на международной конференции «Новые биотехнологии в области продовольствия и сельского хозяйства: наука, безопасность, общество», организованной ВОЗ, ОЭСР, ООН и правительством Англии, производители трансгенных продуктов признали их опасность, ссылаясь на исследования.

Достижения в области ГМО огромны, прогнозы мутации живых существ, натуральных природных растений и появление неизвестных заболеваний попросту игнорируются транснациональными корпорациями, которые продолжают разрабатывать и поставлять новые сорта трансгенной продукции. Мировое сообщество на данном этапе развития не готово к отказу от ГМО-продукции.

Законодательство РФ декларирует право граждан на охрану и поддержание здоровья, обеспечение доброкачественными и безопасными продовольственными товарами, а также контроль за импортом, оборотом и производством продуктов питания. Приоритетная функция государства — сохранение здоровья, повышение уровня жизни, рост продолжительности жизни населения и улучшение демографической ситуации в стране. В соответствии с Конституцией человек, его права и свободы являются высшей ценностью, Российская Федерация – социальное государство, политика которого направлена на охрану здоровья, улучшение уровня жизни и природной среды.

Библиографический список

1. Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика: энциклопедический словарь. Минск : Тэхналогія, 1999. С. 82–86.
2. Зоны, свободные от ГМО / под ред. В.Б. Копейкиной. М. : Геом. 2007.
3. Иойрыш А.И., Красовский О.А. Правовые аспекты генной инженерии // Государство и право. 1997. № 3. С. 112–115.
4. Кузнецов С.А. Уголовно-правовая защита продовольственной безопасности (по материалам города Москвы) : автореф. дис. ... канд. юрид. наук. М., 2007. С. 14–15.
5. Кузнецов В.В., Куликов А.М., Митрохин И.А., Цыдендамбаев В.Д. Генетически модифицированные организмы и биологическая безопасность // Федеральный вестник экологического права. 2004. № 10.
6. Монастырский О.А. Трансгенные растения и проблемы защиты сельскохозяйственных культур от актуальных патогенов // Сборник материалов круглого стола Всероссийской конференции по экологической безопасности. М., 2002. С. 31–34.
7. Поликрапов В.С., Волков Ю.Г., Поликарпова В.А. Современная культура и генная инженерия: Философские размышления. Ростов н/Д. : Изд-во РГУ, 1991. С. 3–4.

8. Соколов М.С., Вельков В.В., Медвинский А.Б. Государственное регулирование растений и оценка экологических рисков их производства // Сборник материалов круглого стола Всероссийской конференции по экологической безопасности. М., 2002. С. 15–26.

УДК 631.145

КООПЕРАЦИЯ И ИНТЕГРАЦИЯ КАК КЛЮЧЕВЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ РАЗВИТИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

В.А. Кундиус

Алтайский государственный аграрный университет, Барнаул, Россия

В статье отражены результаты научных исследований теории и практики развития органического сельского хозяйства, предпосылки, связанные с проблемами продовольственного обеспечения, глобальной интенсификацией сельского хозяйства, которые обусловили рост заболеваний населения, экологические проблемы. Показаны сдерживающие факторы развития органического сельского хозяйства на основе биоинтенсивных технологий, эволюции форм кооперации и интеграции, кластерного подхода в разработке и апробации организационно-управленческих форм развития органического сельского хозяйства.

Ключевые слова: органическое сельское хозяйство, предпосылки, проблемы, механизмы, инструменты развития, кооперация, интеграция.

Введение. Глобальная интенсификация сельского хозяйства в связи с проблемами продовольственного обеспечения и необходимостью роста объемов его производства обусловили рост заболеваний, проблемы со здоровьем потребителей этой продукции, глобальные экологические проблемы неизбежно привели к необходимости изменения теорий экономического роста, которые стали рассматривать эти проблемы неотделимо от понятий «ответственное потребление», основанное прежде всего на рациональном питании, потреблении экологически чистой продукции и здоровом образе жизни. В этой связи получает развитие производство органической сельскохозяйственной продукции и продовольствия. В настоящее время во всём мире органическое земледелие занимает до 10% от традиционного сельского хозяйства.

В Алтайском крае выявлены ресурсный потенциал и, вместе с тем, сдерживающие факторы перехода к органическому сельскому хозяйству. Это сокращение численности населения региона и сельского населения, в частности; природно-климатические риски (отсутствие дифференциальной ренты I); недостаточное материально-техническое обеспечение сельскохозяйственного производства; неразвитая селекционно-племенная работа; низкий уровень экономической эффективности производства, недостаточность организационно-управленческой структуры производства органической продукции, сложности с сертификацией продукции, недостаточность биотехнологий и информационных ресурсов.

Обосновано, что перспективным направлением развития органического животноводства в Алтайском крае является его формирование на базе небольших сельскохозяйственных и фермерских хозяйств. Однако для решения проблем материально-технического обеспечения, технико-технологического развития, в том числе освоения биоинтенсивных технологий, сертификации продукции и сельскохозяйственных угодий для получения статуса «Органик»,

реализации произведенной продукции по экономически выгодным ценам требуется создание объединений на принципах кооперации и интеграции, формирование экокластеров.

Материалы и методы. Исследование основано на трудах российских и зарубежных ученых в области органического сельского хозяйства, кооперации и интеграционных процессов в агропромышленном комплексе и сельском хозяйстве, применены системный подход, абстрактно-логический, монографический, расчетно-конструктивный, экономико-статистический методы исследования. В статье выдвинута рабочая гипотеза, заключающаяся в том, что производство экологически чистого продовольствия оправдано двумя категориями сельскохозяйственных и перерабатывающих организаций (вновь создаваемыми, низкорентабельными или убыточными). Применение метода декомпозиции («дерева» целей) позволило определить базовые стратегии развития двух категорий организаций с учётом фаз жизненного цикла производства экологически чистого продовольствия. При планировании развития низкорентабельных или убыточных организаций обозначена система планов, учитывающая фазы развития производства и возможности адаптации к внешней среде. Представлен алгоритм системного анализа рассматриваемых категорий производителей продовольствия. В этой связи и исходя из эколого-экономической целесообразности нами предложено доведение экосистемного управления до уровня малых сел посредством формирования экокластеров сельских территорий на принципах кооперации, интеграции и бизнес-административного партнерства.

Результаты исследования. Мировой рынок органической продукции уже превышает 100 млрд евро, ежегодный прирост его составляет 10–15%, по прогнозам ВНИИЭСХ РАН к 2025 г. может превысить 200 млрд долл. Рынок органической сельскохозяйственной продукции уже превышает 100 млрд евро, ежегодный прирост его составляет 10–15% [1,2], по прогнозам ВНИИЭСХ РАН к 2025 г. может превысить 200 млрд долл [3].

В производстве «органической» сельскохозяйственной продукции лидируют страны Альпийской и Северной Европы, Бенилюкса и Балтии. Из ведущих экономик мира отмечают Италию, где доля по органическим зерновым культурам достигла 9,2% (рис. 1).

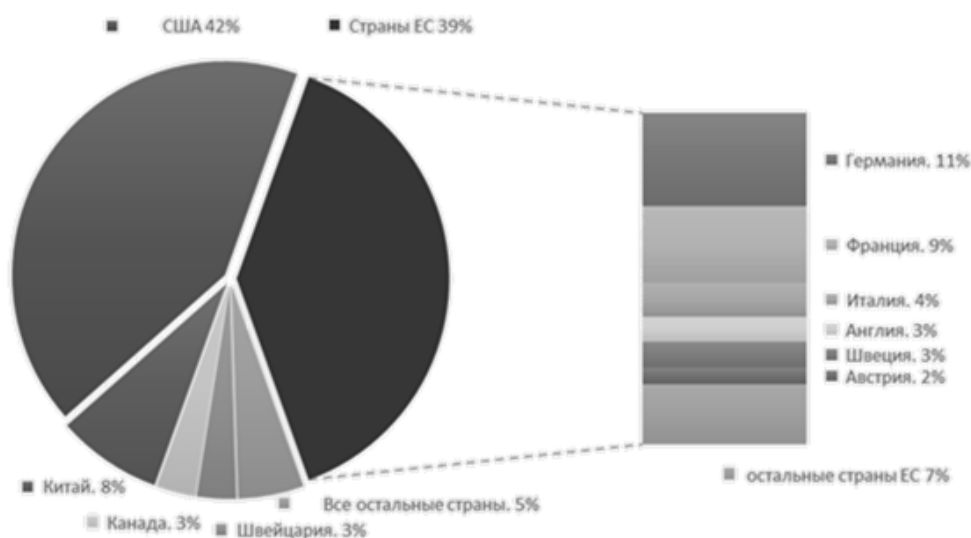


Рис. 1. Производство органической продукции в странах мира [1]

Несмотря на уникальный ресурсный потенциал и возможности, много нерешенных проблем и вопросов для развития органического сельского хозяйства. Российский рынок органической продукции становится похож на европейский по структуре производства (рис. 2).



Рис. 2. Структура российского рынка органической продукции [2]

Движущей силой развития производства экологически чистой продукции и продукции органического производства в России является прежде всего внутренний рынок. Но этот потенциал практически не реализован, находится по-прежнему в серой зоне экономики страны. По данным NeoAnalytics, емкость российского рынка экологической продукции оценивается в 300 млрд руб. Рынок заполнен лишь на 2% и имеет большой потенциал для роста [3]. Долговременные цели России – экспорто ориентированное сельское хозяйство и пищевая промышленность – в связи с тем, что страна имеет уникальный экспортный потенциал, обладает колоссальными природными ресурсами для производства экологически чистой продукции. Это 20% запасов пресной воды в мире, 9% пахотных земель планеты (115 млн. га), 58% мировых запасов чернозема [4], 38,8 млн га залежных сельскохозяйственных земель (включая пары), не получавших длительное время химизации. Примерно 67% пашни сосредоточено в сельскохозяйственных организациях, около 15% приходится на долю крестьянских (фермерских) хозяйств и индивидуальных предпринимателей, 17% пахотных угодий используется хозяйствами населения. В мире основной объем производства органической продукции растениеводства приходится на фермерские и личные подсобные хозяйства. В Алтайском крае на их долю приходится треть всех пахотных угодий [5].

При этом отработка системы мероприятий по развитию органического сельского хозяйства не может происходить спонтанно, либо в одном отдельно взятом предприятии, либо на всей территории региона одновременно. В этой связи предлагается кластерный подход, основанный на теории системности, кооперации, интеграции, инновационного развития. Идея кластерных технологий заключается в сочетании достижения конкурентоспособности участников кластерных формирований, кооперации и интеграции на географически ограниченной специализированной территории. Полученные научные и научно-практические данные в области производственных технологий, организационно-управленческих (в том числе нормативно-правового регулирования) позволяют определить социально-экономическую эффективность и перспективы трансграничного сотрудничества в агропромышленном секторе алтайских регионов России и Монголии. Исследования показывают, что увеличивается

количество крестьянских фермерских хозяйств в России, их размеры, доля в производстве сельскохозяйственной продукции (табл.).

Таблица

Продукция сельского хозяйства по категориям хозяйств в РФ, 1991–2020 гг., млрд руб.

Категории всех хозяйств	1991	1995	2000	2005	2010	2017	2018	2019	2020	2020, % к 2019
Хозяйства всех категорий	0,26	204	742,4	1381	2588	5107	5349	5908	6110	103,4
Сельскохозяйственные организации	0,18	102	335	615	1102	2818	3022	3439	3560	103,5
Хозяйства населения	0,08	97,6	383	681	1183	1655	1657	1666	1680	100,8
Крестьянские (фермерские) хозяйства	-	4,0	23,6	84,3	117	636	670	804	873	108,5

Примечание: Составлено автором по данным Федеральной службы государственной статистики. URL: <http://www.gks.ru/>; 2020 год <https://www.interfax.ru/russia/748531>

В Алтайском крае фермерство начинает вносить все более существенный вклад в экономику региона. В 2018 г. был зарегистрирован первый экспортно-ориентированный сельскохозяйственный потребительский снабженческо-сбытовой кооператив «Алтайский агропродовольственный союз». Кооператив был создан посредством слияния СССПК «Крестьянские подворья Алтая» и СКПК «Агрокредитсоюз». Предполагается создание нескольких видов экспортных кооперативов, в том числе кооперативы, объединяющие сельхозпроизводителей, ориентированных на поставку продукции на экспорт, кооперативы, объединяющие сельхозпроизводителей и трейдер-экспортеров [6].

Небольшие фермерские хозяйства могли бы обеспечить потребности внутреннего рынка. Кроме того, это хорошая возможность решить такие комплексные задачи развития, как повышение уровня жизни и занятости трудоспособного населения в сельской местности за счет вовлечения мелких фермеров, развития сельского и экотуризма, улучшить здоровье населения благодаря обеспечению доступа к здоровым продуктам питания, снижению негативного влияния на окружающую среду и сохранению природного наследия.

С экономических позиций для поддержки мелких фермеров не нужны долгосрочные и дорогостоящие государственные программы, достаточно помочь им перейти на более эффективный формат работы на основе биотехнологий и гарантированные каналы реализации продукции по приемлемым ценам. Этому может способствовать, например, создание информационно-консультационных служб, особенно в сфере разработки и применения биоинтенсивных технологий в сельскохозяйственном производстве, электронной площадки для торговли продуктами, которая позволит сократить путь от производителя к потребителю, избавившись от лишних посредников и, следовательно, сократив издержки. Если же говорить о выходе российской органической продукции на внешние рынки, то это более сложная и комплексная задача, с которой лучше могли бы справиться крупные компании с хорошо отлаженными процессами или же кооперативы мелких фермеров, объединенные под единым брендом в экокластере на принципах кооперации и интеграции воспроизводственных процессов.

Чтобы привлечь крупный бизнес и создать экономические предпосылки для инвестиций в эту сферу, потребуется более значительная поддержка государства через льготы, субсидии или гарантии. При этом сектор органической продукции за счет высокой добавленной стоимости и стабильно растущего спроса может выделяться на фоне других отраслей тем, что проекты в нем экономически считаются за пределами инвестиционного периода, а объем вложений определяется на четкий срок, необходимый для конвертации земель. Выводя фермеров на устойчивый уровень развития, государство инвестирует только на определенном конечном отрезке времени, а затем компания может работать самостоятельно, используя следующие меры финансовой поддержки в регионе. Грантовая поддержка на реализацию проектов в приоритетных сферах экономики по направлению «Сельскохозяйственная кооперация» – компенсация до 70% затрат на приобретение оборудования и транспортных средств для развития кооператива.

Большое значение должно быть отведено научным исследованиям в направлении формирования стратегии перехода сельского хозяйства на органические способы его ведения. При этом исследования в области сельскохозяйственной экологизации приобретают комплексный характер, необходимо решить все вопросы, связанные как с почвенным плодородием, качеством и сертификацией органической продукции, так и экономической эффективностью данного направления сельскохозяйственного производства. При этом отработка системы мероприятий по развитию органического сельского хозяйства не может происходить спонтанно, либо в одном отдельно взятом предприятии, либо на всей территории региона одновременно. В этой связи предлагается кластерный подход, основанный на теории системности, кооперации, интеграции, инновационного развития. Идея кластерных технологий заключается в сочетании достижения конкурентоспособности участников кластерных формирований, кооперации и интеграции на географически ограниченной специализированной территории [7–9].

Пример применения кластерных технологий в производстве органической продукции в Алтайском крае – организация и функционирование курортно-аграрного кластера «Алтайские луга», в котором успешно объединились сельскохозяйственные и туристско-рекреационные организации. Туристско-рекреационный кластер «Белокуриха», сформированный в 2011 г., выступил учредителем, объединив часть ресурсов с ОАО «Алтайские луга», поддерживая его развитие с целью обеспечения курорта Белокуриха органической продукцией для высококачественного питания гостей курорта, повышая еще в большей мере его имидж [10].

«В этой связи и, исходя из эколого-экономической целесообразности, нами предложено доведение экосистемного управления до уровня малых сел посредством формирования микрокластеров, экокластеров сельских территорий на принципах кооперации и бизнес-административного партнерства» [11].

Успешный опыт кооперации и интеграции в развитии производства и переработки органической сельскохозяйственной продукции имеет место за рубежом и в российских регионах. Известен опыт кооператива по производству органической продукции ПО «Солнечная планета» в Киргизии. Здесь в сертифицированное по международным стандартам производство органической продукции вовлечено 719 фермеров. Продукция кооператива продается в федеральных торговых сетях России и экспортируется в страны дальнего зарубежья. «Открытие» рабочего сезона в Киргизии весной этого года «Солнечная планета» начала с предоставления фермерам в качестве презента биоудобрений из разряда стимуляторов и средств защиты, чем заложила опытные экспериментальные наблюдения действий данных препаратов на плодовых деревьях. По направлению внедрения международного опыта создания эф-

фективных моделей сотрудничества начиная от момента подготовки фермерских хозяйств к сезону до конечного этапа – сбыта продукции (по факту – поставка на рынок Европы и России) Фондом GIZ проводятся интенсивные тренинги фермеров по требованиям Евросоюза касательно выращивания органической продукции, по внедрению Системы внутреннего контроля безопасности пищевой продукции, выращенной с использованием технологий органического растениеводства. Предметом договоров с кооперативами является поставка фермерами, входящими в кооператив, для «Солнечной планеты» органической продукции. На данный момент – это чернослив, курага, грецкий орех (очищенный и в скорлупе), органик-молоко грецкого ореха, органик ореховое кофе, сок прямого отжима из диких органик яблок. Кроме этого, при совместном финансировании «Солнечной планеты» и Фонда GIZ ведется закупка оборудования и строительство современного холодильного и модернизация сушильного цехов по всем стандартам FSSC» [12].

Успешно функционирует СПК «ЭкоХутор» в Орловской области. Организован в 2012 г., выращивает зерновые и крупяные культуры, расширяет производство продуктов мукомольной и крупяной промышленности. Дополнительные виды деятельности: пчеловодство, предоставление услуг в области растениеводства, переработка и консервирование мяса, производство и консервирование мяса птицы. «Муку получают из органического зерна, выращенного на своих полях, где основой технологии является беспашотное земледелие, при котором не применяется никакая-либо отравляющая химия, и сама земля не травмируется грубой обработкой. Мука исключительно цельнозерновая – ржаная и пшеничная, и только собственного производства. Используется жерновая мельница, она одновременно бережно перетирает все части зерна, сохраняя его ценность. Любое изделие из такой муки питает и оздоравливает весь организм! Из этой муки и производят экологически чистый бездрожжевой цельнозерновой хлеб ручной работы, состав которого можно перечислить на пальцах одной руки: цельнозерновая мука, родниковая вода, мёд с собственной пасеки и немного соли. Технология хлебопечения основана на традиционных русских рецептах, уходящих своими корнями в XIV в. А целебное молоко получают от коров, пасущихся на полях, не обработанных химикатами, и питаются кормами, выращенными на собственных полях» [13].

Дискуссии по проблемам развития органического сельского хозяйства на принципах кооперации и интеграции ведутся в средствах массовой информации, в научных публикациях и на конференциях. «Кооперация – настоятельная необходимость для производителей органической продукции», – резюмировали участники конференции «Кооперация в органическом сельском хозяйстве — возможности для МСП», которая проходила 22 июля 2021 г. в рамках проекта Союза органического земледелия «Органическое сельское хозяйство – новые возможности» [14]. Сущностные основы кластеризации, институционально-экономическая природа кластеров, их инновационная направленность были представлены авторами на страницах журнала «Экономика регионов». В частности, Д. Фроловым и Д. Грушевским изложена эволюция научных взглядов по развитию кластеров, начиная с их основоположника М. Портера, приходят к выводу, что «наиболее перспективным направлением регулируемого развития регионального экономического производства является разработка кластерных технологий точечного инновационного роста» [15]. В исследованиях Ю.Г. Лавриковой, О.А. Романовой рассматриваются теоретические возможности и практический опыт кластерного развития экономики регионов [16]. Нами обоснованы перспективы и модели инновационно-кластерного развития агропромышленного комплекса (АПК) региона [7, 8, 9, 17].

В публикациях ученых-гравриков критиковались стратегические установки приоритетного проекта развития АПК. Решение проблем структурных преобразований региональных

АПК многими учеными-аграрниками, специалистами Минсельхоза РФ видится через формирование и развитие агропромышленных кластеров, что позволит преодолеть ведомственную разобщенность в управлении аграрным хозяйством и сельскими территориями.

Заключение. Таким образом, большой объем выпускаемой сельскохозяйственной продукции, высокий экологический рейтинг, активное развитие малых форм хозяйствования, наличие потенциальных рынков сбыта органической продукции, таких как санаторно-курортные зоны, сельский туризм, близость рынка Азиатско-Тихоокеанского региона, наличие предприятий, производящих биологические средства защиты и стимуляторы роста для органического земледелия, имеющиеся производственные мощности в аграрном секторе свидетельствуют о высоком потенциале производства органической продукции в Алтайском крае.

Региональная модель развития органического сельского хозяйства представляется следующим образом:

- обобщение нормативно-правовой базы производства и оборота органической продукции с заданными характеристиками;
- формирование системы сертификации органической продукции на мировом уровне;
- маркетинговые исследования востребованности органической продукции на внутренних и внешних рынках;
- проведение анализа мирового научно-практического опыта и разработка прогноза производства, оборота и использования органической продукции в регионе;
- разработка и внедрение биоинтенсивных технологий в производство и переработку органической продукции;
- развитие науки и образования в сфере органического производства;
- формирование экосистемного управления с центрами компетенций.

Для реализации этой модели необходимо:

Продолжить научные исследования в направлении формирования стратегии перехода сельского хозяйства на органические способы его ведения на основе биоинтенсивных технологий. В этой связи неизбежно развитие кооперации крестьянских (фермерских), личных подсобных хозяйств и сельскохозяйственных потребительских кооперативов, оказывающих услуги сельского туризма и реализующих другие виды несельскохозяйственной деятельности. При этом отработка системы мероприятий по развитию органического сельского хозяйства не может происходить спонтанно, либо в одном отдельно взятом предприятии, либо на всей территории региона одновременно. В этой связи предлагается кластерный подход, основанный на теории системности, кооперации, интеграции, инновационного развития.

Создать экономические условия и обеспечить стимулы организации объединений в форме кооперативов, экобиокластеров, которые позволяют оптимизировать расходы на научное обеспечение, информатизацию, применение биотехнологий в производстве и переработке сельскохозяйственной продукции, ее сертификации и доведении до потребителя.

Приоритетными субъектами государственной поддержки и предоставления грантов на реализацию инновационных проектов считать сельскохозяйственные кооперативы, фермерские хозяйства и другие сельскохозяйственные организации, производящие органическую продукцию.

Усилить подготовку специалистов высшего и среднего профессионального образования по направлениям биологизации производства, органического сельского хозяйства и переработки сельскохозяйственной продукции с введением в учебные планы дисциплин по биотехнологиям и организации производства органической продукции.

Увеличить финансирование и государственную поддержку создания производственной и социальной инфраструктуры в сельской местности с целью создания соответствующих современному уровню технического и технологического развития условий проживания и работы сельских жителей.

Исследования проведены, статья публикуется при финансовой поддержке РФФИ по гранту на реализацию научного проекта № 19-510-44011 «Разработка концепции развития органического сельского хозяйства на основе прогрессивных методов и технологий». Благодарим Российский фонд фундаментальных исследований за финансовую поддержку наших исследований

Библиографический список

1. Ежегодный консолидированный отчет IFOAM-2019. URL: <https://ifoam.bio>.
2. Организация органического сельскохозяйственного производства в России: информ. изд. М. 2018. 124 с.
3. Органическое сельское хозяйство: инновационные технологии, опыт, перспективы: науч. аналит. обзор. М., 2019. 92 с.
4. Порфирьев Б.Н. «Зеленая» экономика: реалии, перспективы и пределы роста. М., 2013. 31 с.
5. Органические пищевые продукты: [пер. с англ.]. 2-е изд. М. : Весь мир. 2006. 72 с.
6. Кундиус В.А., Соколова О.Н., Стрельцов А.Е. Фермерская кооперация и агропромышленная интеграция: общее и особенное в перспективах развития // Фундаментальные и прикладные исследования кооперативного сектора экономики. 2018. № 6. С. 141–152.
7. Кундиус В.А. Инновационно-кластерное развитие АПК региона // Сибирская деревня: история, современное состояние, перспективы развития : материалы 7-й Международной научно-практ. конференции (27–28 марта 2008 г.) : в 3 ч. Омск, 2008. Ч. 3. С. 86–93.
8. Кундиус В.А. Модели инновационно-кластерного развития АПК региона // Изменяющаяся Россия: аграрные преобразования начала XXI века – результаты и перспективы : научные труды НАЭКОР. Вып. 12: в 2 т. М., 2008. Т. 1. С. 242–249.
9. Кундиус В.А. Кластерный подход к реализации стратегии инновационного развития АПК региона // Экономика региона. 2011. №4(28). С. 117–133.
10. URL: <https://www.altaregion22.ru/info/tour/turproekty/belokurikha-claster.php>
11. Kundius V., Voronkova O. Innovative technologies and challenges production of organic ecological products in the regions of Russia – IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 274 (2019) 012070 DOI: 10.1088/1755-1315/274/1/012070 / AGEGI 2018. P. 53–60.
12. «Солнечная планета» заключила 21 договор с фермерскими кооперативами Киргизии по производству органической продукции. URL: <https://www.agbz.ru/news/solnechnaya-planeta-zaklyuchila-21-dogovor-s-fermerskimi-kooperativami-kirgizii-po-proizvodstvu-organicheskoy-produktsii>
13. Экохутор — производитель органических продуктов. URL: <https://vk.com/ecohutorr>.
14. Органическое сельское хозяйство – новые возможности. URL: https://vk.com/union_of_organic_agriculture
15. Фролов Д.П., Грушевский Д.В. Институционально-экономическая природа кластеров // Экономика региона. 2008. № 2. С. 230–234.

16. Романова О. А., Лаврикова Ю. Г. Кластерное развитие экономики региона: теоретические возможности и практический опыт // Экономика региона. 2007. № 3. С. 40–51.
17. Кундиус В.А., Глотко А. Формирование агропромышленной политики на основе кластерного подхода // Экономика депрессивных регионов: проблемы и перспективы развития региональных экономик : труды Международной научно-практической конференции. Барнаул, 2007. С. 357–371.

УДК 633.791

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАЗРАБОТОК В ПРОМЫШЛЕННОМ ХМЕЛЕВОДСТВЕ

О.Н. Мироненко¹, Л.П. Хлебова¹, Е.С. Бровко¹, М.Д. Хлыновский²

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

²Чарышский сельскохозяйственный потребительский кооператив имени академика
С.Н. Хабарова, с. Тулата, Алтайский край, Россия

Хмелеводство является одной из наиболее трудоемких отраслей растениеводства и в последние десятилетия в России характеризуется сложным материально-техническим обеспечением, снижением производственных и экономических показателей. Одним из способов повышения экономической и экологической эффективности производства может стать применение биотехнологических разработок. В работе приведены перспективные направления использования биотехнологических методов в размножении ценных сортов хмеля и оздоровлении маточных насаждений, селекции и защите растений от болезней и вредителей на плантациях.

Ключевые слова: хмелеводство, биотехнологические методы, посадочный материал, культура *in vitro*.

Незаменимым сырьем для пивоварения является хмель (*Humulus lupulus* L.), вьющееся многолетнее эфирно-масличное и лекарственное растение. Для хмелеводства России последние 30 лет характерно ухудшение материально-технического обеспечения хмелеводческих предприятий, снижение площадей, занятых хмелем, и валового сбора шишкового сырья, что привело к практически полной зависимости пивоваренной отрасли от импортных поставок хмелепродуктов [11, 13, 23, 29, 30].

Основным регионом возделывания хмеля в России является Чувашия, где хмелеводство включено в перечень приоритетных направлений развития сельхозпроизводства в республике [16]. На базе Чувашского НИИ сельского хозяйства – филиала ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока» ведется селекция, выращивание посадочного материала и поддержание мировой коллекции хмеля, которая находится на одном уровне с коллекциями исследовательских учреждений зарубежных стран мира [19, 24, 32].

В последние годы наблюдается повышение интереса сельхозтоваропроизводителей к выращиванию хмеля, но ощущается дефицит качественного посадочного материала. Одним из способов интенсификации производства является использование биотехнологических методов.

Целью исследований является выявление перспективных направлений применения биотехнологических разработок для повышения экономической и экологической эффективности производства хмеля.

Хмелеводство является одной из наиболее трудоемких отраслей растениеводства с высокими агротехническими требованиями культуры к возделыванию. Недостаточный уровень механизации в хмелеводстве обусловлен сложностью использования машин, связанных с агробиологическими особенностями растения, и наличием на плантациях шпалер [10, 12, 16, 18].

Хмель как многолетняя монокультура возделывается на одном участке до 10–15 и более лет. В производстве хмель размножают вегетативно: стеблевыми, зелёными, корневищными черенками, этиолированными побегами – ростками, выросшими в почве [20, 26, 30]. С одного куста хмеля можно заготовить не более 10 стеблевых и до 100–150 зеленых черенков. Ограниченность периода вегетации для формирования стандартных саженцев хмеля (95–100 дней) требует создания оптимальных условий выращивания [17].

Вегетативное размножение и длительное производственное использование монокультуры на одном участке приводит к повреждению и поражению разнообразными видами фитофагов и фитопатогенов, численность которых с годами повышается. Так, например, в условиях Украины культуру хмеля поражают более 90 видов насекомых, более 20 патогенных организмов [31]. В Чувашии наибольший ущерб посадкам ежегодно наносят обыкновенный паутинный клещ, хмелевая тля, ложная мучнистая роса и комплекс гнилей [8, 32].

Одной из главных проблем в растениеводстве в настоящее время является зараженность посадочного материала и многолетних посадок системными патогенами, для которых не существует эффективных средств защиты. Наличие в растениях вирусов, вириодов, фитоплазм и бактериальных патогенов снижает урожайность и качество сельскохозяйственных культур. Проблему усугубляет вероятность переноса патогенов насекомыми-переносчиками (преимущественно тлей) с зараженных растений на здоровые, что отражается на эффективности всей плантации. Распространённость вирусных болезней в условиях России варьирует от 32 до 80 % в зависимости от культуры и региона возделывания [14].

Для хмеля на территории Европы и европейской части России отмечено около 20 вирусных болезней: инфекционная стерильность хмеля, хлороз, крапивообразность листьев хмеля, некроз жилок, скручивание листьев, разные виды мозаик и др. [3, 6, 20, 25, 31]. Так, например, по исследованиям в Самарской области хмеля дикорастущего и в любительском садоводстве с использованием индикаторных и иммуноферментных методов вирусоподобные признаки отмечены у 30–90% обследованных растений [3]. В насаждениях хмеля на территории Беларуси из вирусов, поражающих культуру, наиболее распространены вирусы мозаики яблони (ArMV) (до 31,4 % растений, по отдельным сортам до 100%) и некротической кольцевой пятнистости листьев сливы (PNRSV) (до 14,2 % растений) [6], вирус мозаики хмеля (ArMV) (Милоста, 2010). На хмеле в западной Европе кроме вирусов отмечен вириод карликовости хмеля (HSV) и латентный (скрытый) вириод хмеля (HLV) [20].

Многолетнее использование насаждений, многочисленные вредители и болезни обуславливают проведение неоднократных обработок плантаций хмеля разнообразными средствами защиты растений, что может являться причиной накопления в почве и продукции пестицидов, тяжелых металлов и других опасных веществ. В основных хмелепроизводящих странах производится до 12 химических обработок за вегетационный период, в Чувашии 2–3, что частично обусловлено гибелью большинства зимующих форм вредителей хмеля в морозный зимний период [16]. Существенно сократить число обработок растений пестицидами и повысить урожайность дает возможность использование биопрепаратов и закладка насаждений оздоровленным посадочным материалом.

Актуальная задача получения оздоровленного посадочного материала может быть решена с использованием биотехнологических и молекулярно-генетических методов. В зарубежном и отечественном производстве наиболее широкое распространение получили методы клонального микроразмножения растений *in vitro*, которые позволяют в короткие сроки размножить и оздоровить ценные генотипы, что можно использовать как непосредственно в производстве, так и для ускорения селекционного процесса [4, 5, 9, 27, 28]. Определение степени инфицирования нативных образцов с посадок и в культуре *in vitro* проводят с использованием высокочувствительных методов (растений-индикаторов, электронной микроскопии, иммуноферментного анализа ИФА и ПЦР-анализа). Для оздоровления растений от вирусных или микоплазменных заболеваний используют культуру апикальных меристем, термо-, крио-, химио- и электротерапию, а также разные сочетания этих методов (комбинированная терапия) [2, 14, 21, 22]. Для долгосрочного сохранения оздоровленных образцов и ценного генетического материала используют методы криоконсервации [1]. Такие работы широко проводятся с плодовыми, ягодными, декоративными растениями, картофелем, а в после годы появились исследования и по культуре хмеля [6, 7, 15].

Результаты экспериментов, выполненных в 2021 г. на базе Алтайского центра прикладной биотехнологии Алтайского государственного университета, по введению в культуру *in vitro* хмеля сортов 'Taurus', 'Spalter Select', 'Marynka', 'Bor', 'Флагман', свидетельствуют о специфической реакции разных генотипов на условия культивирования. Наилучшие показатели результативности введения и размножения эксплантов хмеля отмечены для сортов 'Taurus' и 'Флагман', менее успешными были эксперименты с сортами 'Marynka', 'Bor'. Зависимость коэффициентов размножения эксплантов от уровня гормонов в питательной среде и пассажа культивирования обуславливают разработку технологии клонального микроразмножения индивидуально практически для каждого сорта.

Закключение. Одним из способов интенсификации производства хмеля и производства более экологически чистой продукции является использование биотехнологических методов при размножении и оздоровлении ценных сортов, а также биологических средств защиты растений от болезней и вредителей на плантациях. Производство элитного посадочного материала высокопродуктивных сортов хмеля должно включать: 1) определение степени инфицирования патогенами маточного и посадочного материала с помощью высокочувствительных методов; 2) использование культуры клеток и тканей растений для оздоровления маточных растений от вирусных инфекций; 3) клональное микроразмножение оздоровленных растений для ускоренного получения высококачественного посадочного материала и закладки маточных плантаций; 4) криоконсервацию для долгосрочного сохранения ценных генотипов. Показатели результативности введения и размножения эксплантов хмеля в культуре *in vitro* зависят как от условий культивирования, так и от особенностей сорта.

Исследование выполнено при поддержке Управления Алтайского края по пищевой, перерабатывающей, фармацевтической промышленности и биотехнологиям (Соглашение № 3 от 14.04.2021)

Библиографический список

1. Reed B.M. In Vitro Storage of Hop (*Humulus L.*) Germplasm // *Acta Horticulturae*, 2005. № 668. С. 249–255.
2. Антонова О.Ю., Апаликова О.В., Ухатова Ю.В. и др. Оздоровление микрорастений трех культурных видов картофеля (*Solanum tuberosum L.*, s. *phureja* Juz. & Buk.

и *s. stenotomum* Juz. & Buk.) от вирусов методом комбинированной термо-химиотерапии // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 1. С. 95–104.

3. Богоутдинов Д.З. Вироидные, вирусные и фитоплазменные болезни хмеля // АгроXXI. 2014. №7-9. С. 20–23.

4. Бычкова О.В., Хлебкова Л.П., Титова А.М., Оразов А. Производство оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур с использованием биотехнологических методов // Пища. Экология. Качество : сборник материалов XVI Международной научно-практической конференции, Барнаул, 24–26 июня 2019 г. Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2019. С. 140–142.

5. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2004. 202 с.

6. Гашенко О.А. Вирусные заболевания растений вида *Humulus lupulus* L. в Республике Беларусь и получение посадочного материала хмеля обыкновенного в культуре *in vitro* : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Самохваловичи Минской обл., 2018. 23 с.

7. Гашенко О.А., Кастрицкая М. С., Кухарчик Н. В. Микроразмножение сортов хмеля в культуре *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. 2019. № 68. С. 111–118.

8. Данилова Ю.С., Каштанова О.А., Трейвас Л.Ю. Основные вредные организмы на хмеле обыкновенном в Чувашии // Защита и карантин растений. 2013. № 9. С. 46–48.

9. Егорова Н.А. Разработка биотехнологических методов для селекции эфиромасличных растений // Научный и инновационный потенциал развития производства, переработки и применения эфиромасличных и лекарственных растений : материалы Международной научно-практической конференции, Симферополь, 13–14 июня 2019 г. Симферополь : Ариал, 2019. С. 120–135.

10. Захаров А.И., Макушев Е.А., Захаров Д.А., Толстова М.Л. Факторы повышения эффективности производства хмеля в Чувашской Республике // Вестник Казанского ГАУ. 2017. № 4(46). С. 106–109.

11. Каратаева О.Г. Оценка современного состояния хмелеводства по основным экономическим показателям // Вестник Московского государственного агроинженерного университета имени В.П. Горячкина. 2008. № 5/1. С. 61–63.

12. Каратаева О.Г. Перспективы развития отрасли хмелеводства Чувашской Республики // Вестник Московского государственного агроинженерного университета имени В.П. Горячкина. 2009. № 8-1(39). С. 78–80.

13. Каратаева О.Г. Формирование эффективной системы обеспечения продовольственной безопасности в Российской Федерации на основе модернизации хмелеводства в Чувашской Республике // Модели, системы, сети в экономике, технике, природе и обществе. 2021. № 2. С. 70–78.

14. Карпушина М.В., Супрун И.И. Методы и подходы к элиминации вирусов в условиях *in vitro* и *in vivo* // Плодоводство и виноградарство Юга России. № 63(3). 2020. С. 254–269.

15. Кастрицкая М.С., Кухарчик Н.В., Гашенко О.А. Микроразмножение сортов хмеля *in vitro* // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. 2014. № 2. С. 75–80.

16. Концепция развития хмелеводства в Чувашской Республике на 2020–2025 годы, утв. Распоряжением Кабинета Министров Чувашской Республики от 20.08.2020 № 738-р. URL: <https://docs.cntd.ru/document/570901006>.

17. Коротков А.В., Гаврилова С.Е., Короткова З.П. Применение сидеральных культур в качестве зеленого удобрения при зеленом черенковании хмеля // Вестник Марийского государственного университета. Серия: Сельскохозяйственные науки. Экономические науки. 2017. Т. 3, № 2 (10). С. 29–33.
18. Куровская Н.А. Инновационное развитие отрасли хмелеводства на Украине: реалии и перспективы // Никоновские чтения. 2008. № 13. С. 573–575.
19. Леонтьева В.В. Характеристика сортов хмеля в пивоварении // Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве : материалы V Международной научно-практической конференции. Киров : ФАНЦ Северо-Востока, 2019. С. 46–48.
20. Милоста Г.М., Лапа В.В. Агробиологические основы выращивания хмеля в Республике Беларусь: монография. Гродно : ГГАУ, 2010. 286 с.
21. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. Биотехнология освобождения от вирусов и клональное микроразмножение декоративных и плодовых растений // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. Т. 134. 2012. С. 213–227.
22. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н. Биотехнология освобождения от вирусов и клональное микроразмножение декоративных и плодовых растений // Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада. Т. 138. 2014. С. 5–56.
23. Назарьев Р.С., Крутских О.А., Худякова Т.М. Совершенствование производственно-территориальной структуры хмелеводства Чувашской Республики // Вестник ТГУ. Т. 20, вып. 6. 2015. С. 1601–1605.
24. Никонова З.А., Короткова З.П. Создание и сохранение коллекции хмеля обыкновенного в качестве генофонда для селекции // Нива Поволжья. 2017. № 4(45). С. 104–108.
25. Основные мероприятия по защите хмеля от болезней, вредителей и сорняков на дерново-подзолистых почвах Республики Беларусь / Г.М. Милоста, В.В. Лапа, А.А. Регилевич, О.С. Ярошинская. Гродно : ГГАУ, 2010. 14 с.
26. Перспективная ресурсосберегающая технология производства хмеля : метод. рекомендации /сост. А.С. Якимов, А.Н. Смирнов, С.С. Данилов и др. М. : Росинформагротех, 2008. 52 с.
27. Плаксина Т.В., Пищева Г.Н. Биотехнология в селекции, размножении и сохранении растений // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. 2014. № 12. С. 22–30.
28. Расторгуев С.Л., Квочкин А.Н., Соловых Н.В. Применение методов биотехнологии в агропромышленном секторе страны // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 12. С. 8–9.
29. Соловьев А.М. Некоторые социально-экономические аспекты российского рынка алкогольной продукции // Научные труды: Институт народнохозяйственного прогнозирования РАН. 2009. Т. 7. С. 322–336.
30. Технология возделывания хмеля : метод. рекомендации / под общ. ред. А.А. Фадеева. Опытный : Чувашский НИИСХ, 2016. 39 с.
31. Трибель С.А., Струкова С.И. Система учетов вредителей и болезней в посадках хмеля // Защита и карантин растений. 2012. № 2. С. 42–47.
32. Фадеев А.А., Никонова З.А., Осипова Ю.С. Сохранение коллекции хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus* L.) и выделение источников для формирования рабочей генетической коллекции // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2014. № 4 (41). С. 21–25.

УДК 330.3

О МЕРАХ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПОДДЕРЖКИ РАЗВИТИЯ МАЛОГО И СРЕДНЕГО ПРЕДПРИНИМАТЕЛЬСТВА В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

О.А. Пястолов¹, Э.А. Арустамов^{1,2,3}, А.Ф. Стойнова³

¹Высшая школа корпоративного управления РАНХиГС, Москва, Россия

²Московский государственный областной университет, Москва, Россия

³Российский университет кооперации, Москва, Россия

Статья посвящена анализу современного состояния и проблемам развития малого и среднего бизнеса в Российской Федерации, предложена корректировка миссии, цели развития малого и среднего предпринимательства в Российской Федерации. Также выявлены факторы, сдерживающие развитие предпринимательской деятельности и предложены системные меры, способы, механизмы, поддержки малого и среднего бизнеса. В работе рассмотрены и проанализированы нормы действующего в Российской Федерации мер поддержки малого и среднего бизнеса. Проведен ретроспективный анализ действующей нормативно правовой базы. Также изучен аспект применения перспективных направлений развития научно-технического прогресса и востребованность его результатов в общей теории управления предпринимательской деятельностью. Авторами предложены коррективы и дополнения модели управления малым и средним бизнесом с учетом возрастающих возможностей научно-технического прогресса, развитием и совершенствованием общей теории управления и перспективами работы на внешних рынках. Проведенное исследование помогает дополнить теоретическую картину эффективности применения нормативно правовой базы малым и средним бизнесом, обеспечивает устойчивое поступательное развитие теории управления предпринимательством в условиях сложившейся эпидемиологической ситуации в стране. Некоторые авторские работы, связанные с этой проблемой, представлены в литературе

Ключевые слова: малое и среднее предпринимательство, миссия, цель, государственная поддержка, льготное кредитование, способы и механизмы обеспечения развития малого и среднего предпринимательства, государственное регулирование малого бизнеса.

Введение. Малый и средний бизнес в Российской Федерации, будучи новым экономическим явлением 25 лет назад, в настоящее время состоялся и является важнейшим способом ведения предпринимательской деятельности и обеспечения занятости граждан страны.

Сектор малого предпринимательства сосредоточен в основном в сферах торговли и предоставления услуг населению, образовательной деятельности. Средние предприятия в большей степени представлены в сферах с более высокой добавленной стоимостью – в обрабатывающей промышленности, строительстве, сельском хозяйстве, общепите [2].

Малые и средние предприятия – это 5,6 млн хозяйствующих субъектов, рабочие места для 18 млн граждан в РФ. Около одной пятой валового внутреннего продукта РФ, а во многих субъектах РФ треть и более валового регионального продукта создаются такими организациями и предприятиями [9].

Малое и среднее предпринимательство в РФ – это в первую очередь (по структуре основных средств) микробизнес (95,5% общего числа субъектов малого и среднего предпринимательства). Число средних предприятий сравнительно невелико. На малые и средние предприятия приходится только 5–6% общего объема основных средств и 6–7% объема инвестиций в основной капитал в целом по стране [3].

Одной из проблем развития малого и среднего предпринимательства в РФ можно выделить низкую инновационную и инвестиционную активность малых и средних предприятий, а также рост уровня неформальной (латентной) занятости в сфере малого и среднего предпринимательства, что связано в первую очередь со сложными процедурами государственного регулирования, административным давлением, высоким уровнем финансовой нагрузки и ограниченными возможностями доступного кредитования на цели развития [5].

Хочется отметить, что малый и средний бизнес развиваются на территории РФ неравномерно. Согласно статистическим данным на 10 субъектах Российской Федерации с наибольшим количеством малых и средних предприятий – юридических лиц приходится около 46% общего количества субъектов малого и среднего предпринимательства – юридических лиц [10].

Индикатор экономической активности до 2019–2020 гг. показывает две большие ямы: левая яма – 69%, правая – 64%. Эти две ямы говорят о снижении экономической активности предприятий МСБ в силу локдауна, который был в 2020 г. Ниже индикатор экономической активности по отраслям иллюстрирует, что 20 апреля 2020 г. имеются тенденции на снижение экономической активности, потому что объявлен локдаун. Позитивным моментом является уровень открытости региональных экономик по набору законодательных опций и мер административной поддержки в России, который повышается [10] (рис. 1).

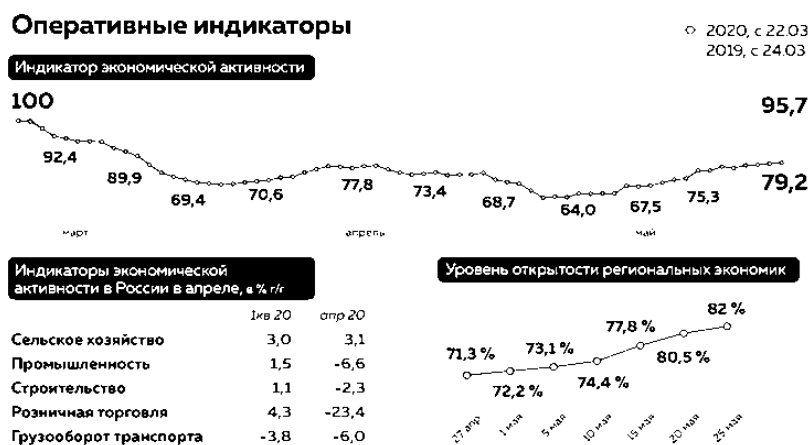


Рис. 1. Структура экономической активности предприятий МСБ

Цели и задачи развития малого и среднего предпринимательства в РФ. Миссией развития малого и среднего предпринимательства в РФ должно стать создание конкурентоспособной на мировом уровне, гибкой и адаптивной современной экономики, которая обеспечивает высокий уровень индивидуализации товаров и услуг, высокую скорость технологического обновления и стабильную занятость граждан путем развития сферы малого и среднего предпринимательства. Для достижения этих позиций в развитии с учетом обеспечения неотставания в цифровизации отрасли (МСБ), необходимо модернизировать концепцию развития МСБ на уровне Правительства РФ.

А целью развития МСП малого и среднего предпринимательства в РФ должно стать развитие сферы малого и среднего предпринимательства как одного из факторов, с одной стороны, инновационного развития и улучшения отраслевой структуры экономики, а с другой стороны, социального развития и обеспечения стабильно высокого уровня занятости.

Для достижения названной выше цели базовыми индикаторами должно выступать увеличение:

- в 2,5 раза оборота малых и средних предприятий в постоянных ценах по отношению к 2019 г. за счет цифровых платформ сбыта продукции;
- в два раза производительности труда в секторе малого и среднего предпринимательства в постоянных ценах по отношению к 2019 г. за счет инновационных технологий и цифровизации операционной деятельности;
- доли обрабатывающей промышленности в обороте сектора малого и среднего предпринимательства (без учета индивидуальных предпринимателей) до 20% за счет государственной поддержке кредитования МСБ;

- доли занятого населения в секторе малого и среднего предпринимательства в общей численности занятого населения до 35% за счет государственных программ и региональных программ информационной поддержки МСБ.

Достижение целевых индикаторов реализации необходимо обеспечить за счет выделения следующих целевых групп (секторов) малых и средних предприятий (табл.).

Таблица

Секторы для реализации целевых индикаторов

Целевая группа (сектор)	Специализация
Массовый сектор	Предприятия, которые, как правило, специализируются на осуществлении торговых операций, предоставлении услуг гражданам, производстве и реализации сельскохозяйственной продукции и, таким образом, играют ключевую роль в обеспечении занятости, повышении качества и уровня комфорта среды для проживания
Высокотехнологичный сектор	Экспортно-ориентированные предприятия, предприятия в сферах обрабатывающего производства и предоставления услуг, быстрорастущие предприятия, которые обеспечивают внедрение инноваций и решают задачи по диверсификации экономики и повышению ее конкурентоспособности

Одним из способов достижения цели может послужить интеграция функций поддержки малого и среднего предпринимательства в одном государственном органе (по принципу одного окна).

Одно из приоритетных направлений государственной политики в сфере малого и среднего предпринимательства на современном этапе – вывод на новый качественный уровень мер и инструментов поддержки малых и средних предприятий, что будет реализовано в рамках деятельности Федеральной корпорации поддержки и развития МСБ.

В частности, Корпорацией будет обеспечено решение следующих задач (рис. 2). Вторым приоритетным механизмом достижения цели может послужить стимулирование спроса на продукцию малых и средних предприятий, который включает в себя развитие конкуренции на локальных рынках, поддержку малого и среднего предпринимательства в социальной сфере, а также развитие онлайн-торговли и потребительского рынка [4].

- 1 оказание финансовой, инфраструктурной, имущественной, юридической, методологической и иной поддержки субъектам малого и среднего предпринимательства
- 2 привлечение денежных средств российских, иностранных и международных организаций в целях поддержки субъектов малого и среднего предпринимательства
- 3 организация системы информационного, маркетингового, финансового и юридического сопровождения инвестиционных проектов, реализуемых субъектами малого и среднего предпринимательства
- 4 организация мероприятий, направленных на увеличение доли закупок товаров, работ, услуг отдельными видами юридических лиц у субъектов малого и среднего предпринимательства
- 5 обеспечение проведения совместно с конкретными заказчиками, определяемыми Правительством РФ, и органами государственной власти субъектов РФ мероприятий по развитию субъектов малого и среднего предпринимательства
- 6 обеспечение взаимодействия с органами государственной власти субъектов РФ, органами местного самоуправления, иными органами и организациями в целях оказания поддержки субъектам малого и среднего предпринимательства
- 7 обеспечение совершенствования мер поддержки малого и среднего предпринимательства

Рис. 2. Задачи Федеральной корпорации поддержки и развития МСБ

Малые и средние предприятия, работающие в сфере потребительского рынка, помимо решения социальных задач, связанных с созданием рабочих мест для граждан, обеспечивают

индивидуальный подход к покупателям, узкую товарную специализацию, а также являются одним из основных каналов сбыта для мелких и средних производителей, в том числе местных сельскохозяйственных производителей. В связи с этим важнейшими приоритетами выступают развитие многоформатной инфраструктуры потребительских рынков и создание необходимых условий для развития торговли, услуг общественного питания и бытовых услуг.

Развитие потребительского рынка будет необходимо осуществить по следующим направлениям (рис. 3).

Третьим способом достижения поставленной цели может послужить обеспечение доступности финансовых ресурсов для малых и средних предприятий, включая стимулирование коммерческих банков к расширению кредитования малого и среднего предпринимательства, развитие микрофинансирования, долгосрочного финансирования и лизинга.

Финансовая поддержка малого и среднего предпринимательства должна будет осуществляться на основе дифференциации субъектов малого и среднего предпринимательства по выделенным целевым секторам – массовому и высокотехнологичному [7].

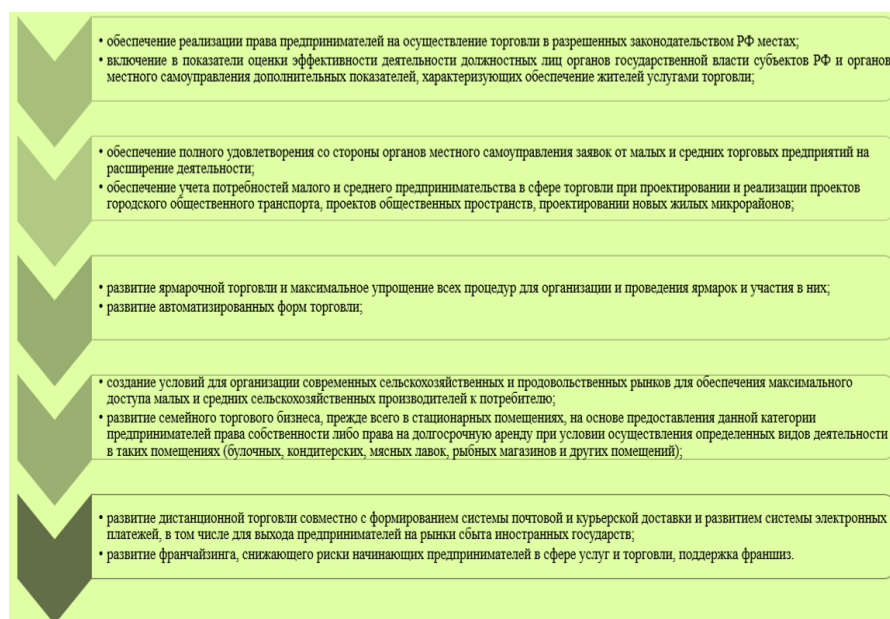


Рис. 3. Преимущественные направления для развития потребительского рынка

Для улучшения условий кредитования малых и средних предприятий коммерческими банками стоит обеспечить реализацию мер по следующим направлениям:

- реализация механизмов электронного документооборота при кредитовании малых и средних предприятий;
- расширение программ кредитования субъектов малого и среднего предпринимательства, реализуемых кредитными организациями;
- разработка системы стандартов кредитования субъектов малого и среднего предпринимательства [1].

Проблема доступа субъектов малого и среднего предпринимательства (в первую очередь из массового сектора) к финансовым ресурсам решается в том числе и за счет развития микрофинансирования. Для расширения доступности микрофинансовых услуг необходимо создать условия для эффективного взаимодействия микрофинансовых организаций с заемщиками, органами государственной власти, Центральным банком Российской Федерации и соответству-

ющими институтами поддержки, а также для дальнейшего развития кредитной кооперации (в том числе в рамках деятельности сельскохозяйственных кредитных кооперативов) [8].

Развитию лизинговой поддержки малых и средних предприятий будут способствовать механизмы стимулирования кредитования лизинговых компаний, направленные на поддержку производителей оборудования и транспорта для передачи в финансовую аренду лизингополучателям – субъектам малого и среднего предпринимательства.

Четвертым важным механизмом достижения цели по развитию малого и среднего предпринимательства может послужить повышение качества государственного регулирования в сфере малого и среднего предпринимательства.

Малые и средние предприятия несут высокие издержки при выполнении требований контрольно-надзорных органов. В краткосрочной перспективе снижение административной нагрузки на малые и средние предприятия при осуществлении контрольно-надзорной деятельности будет обеспечено за счет поэтапного внедрения решений, принятых в 2019–2020 гг., включая формирование и ведение единого реестра проверок; обеспечение трехлетнего моратория на проведение плановых проверок в отношении субъектов малого предпринимательства; апробацию риск-ориентированного подхода при осуществлении государственного контроля (надзора) и муниципального контроля в отдельных сферах; введение запрета требовать при проведении проверки предоставления документов, которые могут быть получены контрольно-надзорными органами от других органов власти в рамках межведомственного информационного взаимодействия [6].

Упрощение отчетности – ещё один механизм поддержки МСП. Любые акты, регламентирующие предпринимательскую деятельность, должны быть такими, чтобы их можно было соблюдать с наименьшими затратами, т.е. необходимо упрощать правила ведения бухгалтерского учета на малых и средних предприятиях.

И последним очень важным и необходимым механизмом поддержки и развития малого и среднего бизнеса мы бы выделили стимулирование развития предпринимательской деятельности на отдельных территориях РФ.

Необходимо использовать следующие инструменты реализации политики в сфере развития малого и среднего предпринимательства на региональном и муниципальном уровнях (рис. 3).

- 1 выделение региональных отраслевых точек роста малых и средних предприятий
- 2 регулярная разработка и реализация программ (подпрограмм), содержащих мероприятия, направленные на развитие малого и среднего предпринимательства
- 3 создание и развитие объектов инфраструктуры поддержки субъектов малого и среднего предпринимательства (в том числе межрегиональных)
- 4 
- 5 предоставление льгот по налогам в рамках специальных налоговых режимов
- 6 выделение территорий опережающего развития и содействие развитию кластеров малых и средних предприятий
- 7 оказание имущественной поддержки субъектам малого и среднего предпринимательства

Рис. 3. Инструменты реализации политики в сфере развития МСБ

Заключение. Рассмотрена модернизация концепции по поддержке и развитию малого и среднего предпринимательства, основанная на формировании элементов механизма государственной поддержки МСП. Среди предложенных мероприятий весьма важным является осуществление мер по снижению административных барьеров на пути создания МПС (упрощение регистрации и лицензирования МП, льготный порядок подключения к объектам инфраструктуры, льготы по аренде помещений, доступ к приватизации государственного и муниципального имущества и др.). Авторы осуществили всесторонний анализ изучения существующих проблематик и мер господдержки, скорректировавшими их для достижения поступательного развития и положительного эффекта развития МСБ в РФ.

Библиографический список

1. О развитии малого и среднего предпринимательства в Российской Федерации : Федеральный закон от 24.07.2007 №209-ФЗ (ред. от 29.06.2015).
2. О государственно-частном, муниципально-частном партнерстве в Российской Федерации и внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации: Федеральный закон от 13 июля 2015 года №224-ФЗ.
3. Об утверждении Стратегии развития малого и среднего предпринимательства в Российской Федерации на период до 2030 года : Распоряжение Правительства РФ от 02.06.2016 №1083-р (ред. от 30.03.2018).
4. Аверин А.В., Рязанов А.А. Совершенствование механизмов государственной поддержки субъектов малого и среднего предпринимательства Московской агломерации // Известия Тульского государственного университета. Экономические и юридические науки. 2019. № 1-1. С. 24–31.
5. Алексеев А.Н., Батулкин Д., Козырев А. Малый и средний бизнес в условиях инновационной экономики: основные трудности и направления поддержки // Транспортное дело России. 2019. № 1. С. 39–41.
6. Воробьёва В.Г., Ивлева Е.С. Методические рекомендации совершенствования системы государственного регулирования и поддержки малого и среднего предпринимательства в России // Экономика и предпринимательство. 2019. №3 (104).
7. Банк России — официальный сайт. URL: <http://www.cbr.ru/statistics/? PrtId=sors> (дата обращения: 05.04.2021).
8. Глобальный мониторинг предпринимательства 2019. URL: https://dprpko.ru/assets/files/2020/glob_monitor_2019_2020.pdf (дата обращения: 07.04.2021).
9. Министерство экономического развития Российской Федерации – официальный сайт. URL: <https://www.economy.gov.ru/> (дата обращения: 05.04.2021).
10. Федеральная служба государственной статистики РФ — официальный сайт URL: <http://www.gks.ru>.
11. Валигурский Д.И., Авдокушина М.Н., Алексунин В.А. и др. Торговое дело, коммерция, маркетинг, менеджмент. Теория и практика. М., 2019. 410 с.
12. Арустамов Э.А., Пахомкин А.Н., Платонов А.П., Рыкова И.В., Организация предпринимательства. М., 2001.
13. Арустамов Э.А. Организация предпринимательской деятельности. М., 2008. 331 с.
14. Арустамов Э.А. Основы бизнеса. М., 2019. 230 с.

УДК 606

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ДИЗАЙН: ВОЗМОЖНОСТИ НОВЫХ РЕШЕНИЙ ДЛЯ ИЗВЕСТНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ

И.М. Самохвалов, Д.И. Водолажский, Д.В. Чегодарь, А.В. Кубышкин

*Инжиниринговый центр Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского,
Симферополь, Россия*

В статье рассматриваются концептуальные аспекты развития современной биотехнологии с точки зрения соотношения научных и технологических подходов. Подчеркивается открытая цикличность биотехнологий. Делается заключение о неразрывности связи разработки нового дизайна существующих биотехнологий и соответствующих фундаментальных научных исследований. Выдвигается идея о том, что в перспективе биотехнология будет необходимым драйвером развития фундаментальной науки, а также возможно их полное или частичное слияние.

Ключевые слова: биотехнология, дизайн, регенеративная медицина, эмпиризм, биологическая теория.

Введение. Говоря о дизайне в биотехнологии, необходимо различать дизайн в узком смысле, или инженерный/эстетический дизайн, т.е. конкретный способ технологического решения уже опробованного метода, прошедшего стадию proof-of-principle. Чаще всего имеется в виду именно это понимание биотехнологического дизайна по аналогии с дизайном одежды, обуви, различных аксессуаров и т.д. Яркий пример – работа известной группы eco-LogicStudio [1]. Одно из оригинальных дизайнерских решений – распечатка больших трехмерных древовидных структур, предоставляющих нишу для фотосинтетических цианобактерий с целью очищения городского воздуха, в первую очередь для понижения уровня углекислого газа (<https://design-mate.ru/read/megapolis/biotechnology-in-construction>). В самом использовании цианобактерий для обогащения воздуха кислородом нет ничего нового, в условиях насыщения среды ионами железа они более эффективно, чем высшие растения, усваивают углекислый газ [2]. Однако оригинальная ажурная древовидная структура ниши обеспечивает оптимальное освещение цианобактерий и позволяет серьезно увеличить клеточный объем на единицу площади, что очень важно в городских условиях. Таким образом, происходит количественная оптимизация процесса без каких-то качественных сдвигов в технологии.

Очевидно, что разработка усовершенствованной архитектуры, инженерных и компьютерных обеспечений конкретных биотехнологических решений не является задачей для биологов и/или медиков. В лучшем случае, с ними могут посоветоваться и принять их мнение к сведению. В этой работе мы будем в основном обсуждать биотехнологический дизайн в его фундаментальном, базовом смысле, т.е. как процесс создания и тестирования рабочей биотехнологической модели, основанной на фундаментальных научных данных. Принципиально новое решение для уже известных биотехнологий может быть найдено только на основе оригинальных исследований. Соотношение фундаментальных исследований, манифестированных в биологических теориях, и биотехнологического дизайна в базовом понимании – предмет обсуждения в этой работе.

Эмпирическое и теоретическое в становлении биотехнологических моделей. В расширенном понимании биотехнология представляет собой комплекс процессов модифи-

кации биологических организмов, включая человека, для обеспечения потребностей человека. Первыми биотехнологиями считают доисторические процессы domestikации животных и растений, последующий искусственный отбор методами традиционной селекции, которая в сущности представляет собой начальные этапы примитивной геной инженерии. Очевидно, что дизайн таких ранних биотехнологий был совершенно стихийным, руководствовался в основном здравым смыслом [3], основывался на чистом эмпиризме, т.е. на субъективных ощущениях происходящего или результатов работы.

Частично такая традиция сохранялась и позже, например, когда в начале XX в. произошел практически взрывной рост бродильной и микробиологической промышленности, т.е. микробиологических биотехнологий [4]. Здесь, однако, ситуация была несколько иной. Микробиотехнологический дизайн основывался на старинном эмпиризме производства (ферментации) алкогольных напитков из продуктов растительного или животного происхождения. В то же время микробиотехнологические модели на то время уже учитывали достижения фундаментальной микробиологии и клеточной теории. Следует заметить, что в то время биологическое теоретизирование (в широком смысле) еще только начинало складываться в работах Дарвина, Менделя, Пастера, Коха, Мечникова, Моргана и др. Интересно, что первичный интерес Луиса Пастера к микробиологии был вызван тем, что к нему за помощью обратился некий незадачливый предприниматель М. Vigot из Лилля, который безуспешно пытался получать крепкий алкоголь из столовой свеклы, используя старинную «винную» технологию [5].

Изобретение генных технологий основывалось на базовой теории переноса наследственной информации, разработка которой началась с работ Грегора Менделя, кульминировала в 1953 г. в знаменитой работе Уотсона и Крика [6], окончательно оформилась с 70-м годам прошлого столетия. Удельный вес фундаментальной теории в подходе к биотехнологическому дизайну возрос, тем не менее притягательность простых решений в простых системах никуда не делась. Таким образом, новые генные технологии по своей сути представляют собой значительно усовершенствованную форму эмпиризма. Например, генетическая модификация сельскохозяйственных культур основывалась на экспериментальном (эмпирическом) поиске единичных генов растений, отвечающих за экономически целесообразные признаки или приобретение новых свойств организма. То же самое, в значительной мере, относится к таким современным типам биотехнологий, как биокомпьютинг, бионика, биофармакология, биоремедиация и биоинформатика.

Однако в ходе дальнейшего развития биотехнологий, особенно с увеличением значения биомедицинских технологий, опора только на эмпиризм может оказаться недостаточной для успешного применения с минимальным риском для здоровья человека и соответствия современным этическим нормам. Становится очевидным, что использование складывающихся биологических теорий приобретает огромное значение. Наиболее ярко это проявляется в развитии регенеративной медицины, которая в будущем станет ведущим и самым сложным типом биотехнологий [7]. В регенеративной медицине биотехнологический дизайн начинается со сравнительной оценки эффективности предполагаемой модели с уже существующими традиционными методами лечения. Важное значение приобретает этическая оценка предполагаемых регенеративных биотехнологий. В будущем, с появлением новых поколений биотехнологии, значение фундаментальных исследований и опробованных биологических теорий (таких как теория клональной селекции в иммунологии) в разработке новых биотехнологических дизайнов будет неуклонно возрастать.

Тем не менее эмпирический подход не может быть забыт. Чисто теоретические подходы к биодизайну неприменимы в силу определенной ограниченности и опровержимости любой, особенно биологической, теории. Скорее необходима правильная, обусловленная каждым конкретным случаем комбинация этих двух основных подходов (эмпиричного и теоретического) познания.

Почему это важно для усовершенствования конкретного биомедицинского дизайна? Важно понять, какой объем фундаментальных исследований будет необходимо провести для того, чтобы перспективные биотехнологии стали эффективнее предыдущих, были этичны, конкурентоспособны и экономически выгодны.

Биотехнологический дизайн как циклический процесс. Биотехнологический дизайн, как и любой технологический дизайн, является по своей сути открытым циклическим процессом (рис. 1).

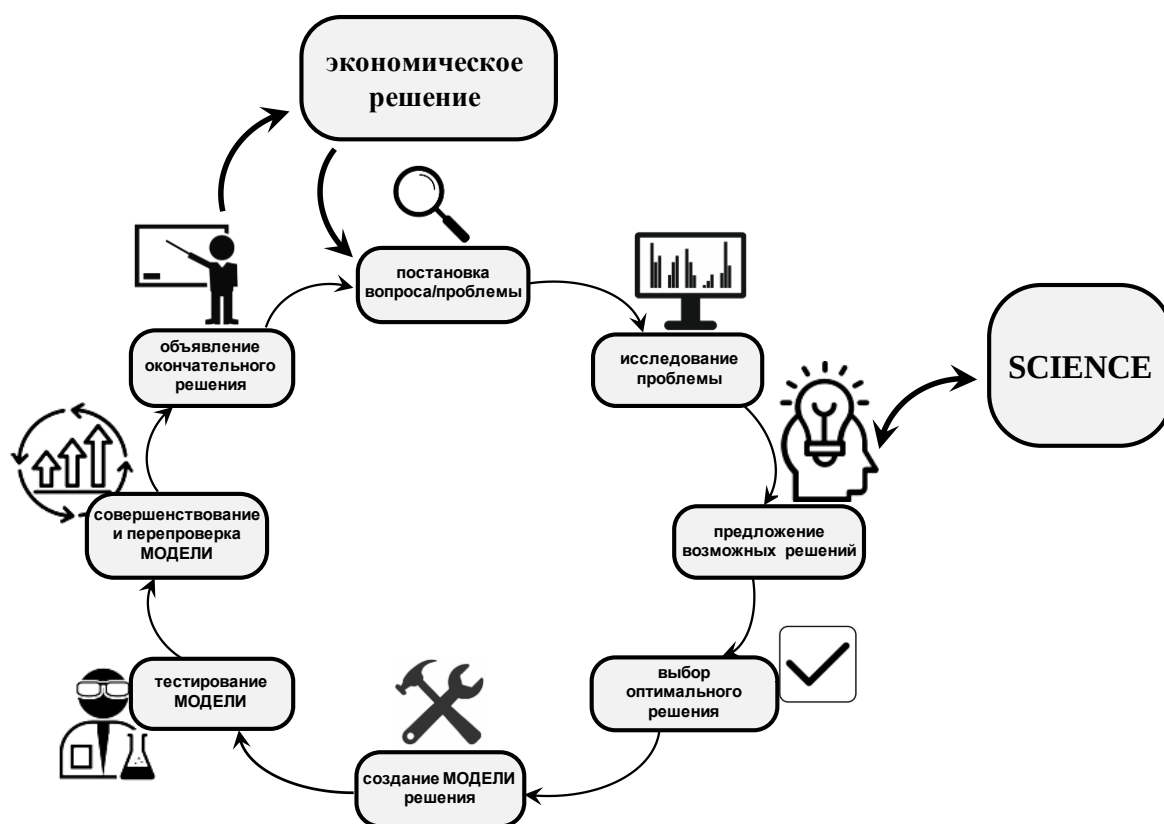


Рис. 1. Современный биотехнологический дизайн – открытая циклическая система

Ключевую роль играет правильная постановка проблемы, что зачастую обуславливает успешность всего проекта. Детальное исследование проблемы непосредственно связано с правильной постановкой вопроса и позволяет не сделать ненужных ошибок с самого старта. Затем следуют предложения возможных решений и выбор оптимального решения, что необходимо для того, чтобы понять, есть ли разумное биотехнологическое решение проблемы, будет ли это решение конкурентоспособным по сравнению с существующими небиологическими технологиями и методами лечения. В лучшем случае конкуренции практически не существует, как например в случае биоинформатики.

Важное значение, особенно в последнее время, имеет также этичность биотехнологического решения. Любое решение должно быть опробовано на определенной модели или модельной системе, которые сродни известным экспериментальным моделям. В медицинских

технологиях – это преклинические исследования на животных и клинические исследования после информированного согласия пациента или родственников. Наиболее важный и длительный этап – совершенствование и перепроверка модели и технологии. Если перепроверка заканчивается положительно, следует объявление о создании биотехнологии и ее экономическом решении, зачастую приводящем к внедрению в применение или производство. Однако практически всегда тут же начинается процесс редизайна успешной модели на основе уже накопившихся к тому времени новых фундаментальных знаний. Таким образом, полный цикл может повториться снова, в том же направлении и с теми же этапами.

Критическая взаимосвязь между фундаментальными исследованиями и редизайном биотехнологий. Связь между фундаментальными исследованиями и редизайном биотехнологии можно наглядно продемонстрировать на примере эволюции методологии дендритно-клеточных вакцин (ДКВ), применяемой в иммунотерапии ряда онкологических заболеваний. Известно, что противоонкологическое действие дендритных клеток (ДК) основано на эффективной активации этими клетками цитотоксических Т клеток, которые в свою очередь являются основой противораковой иммунной защиты [8]. В первоначальном дизайне биотехнологии ДКВ из периферической крови выделяли моноциты, которые затем дифференцировали в ДК под воздействием ряда цитокинов. Затем эти ДК активируются («нагружаются») пациент-специфичными онкоантигенами. Активированные ДК затем ретрансплантируют пациенту для активации иммунной системы и массового уничтожения опухолевых клеток активированными цитотоксическими Т клетками. Такой подход имеет ряд недостатков, так как зачастую моноциты онкологических больных повреждены и не могут эффективно генерировать ДК *in vitro*. Кроме того, моноцитарные ДК (мо-ДК) представляют собой только часть большого гетерогенного пула ДК человека, и их функционал несколько ограничен.

В новом дизайне ДКВ-биотехнологии используются достижения современной биологии стволовых клеток. Было показано, что в отсутствии сыворотки и экзогенных гемопоэтических цитокинов человеческие плюрипотентные стволовые клетки (чПСК) эффективно генерируют весь ряд миелоидных предшественников [9, 10], способных в том числе развиваться в ДК. Это достижение может использоваться в новом дизайне ДКВ-иммунотехнологий, имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с мо-ДКВ-методом. Первое: использование чПСК решает проблему наработки необходимых количеств ДК для активации и иммунотерапии. Второе: чПСК, аналог самых ранних зародышевых тканей, может генерировать различные типы ДК с более широким функционалом по сравнению с мо-ДК. Третье: новый подход дает чисто технологическое преимущество, заключающееся в возможности формирования запаса замороженных ДК для перспективной терапии в любое время.

Этот пример показывает основной механизм взаимодействия фундаментальных исследований с биотехнологическим циклом. Однако такое соотношение будет меняться в связи с процессами, происходящими в современном обществе и биологических науках.

Перспективы на будущее. Тот рывок в развитии современной (физико-химической) биологии, который произошел во второй половине прошлого столетия, не мог длиться долго. В современной биологии наблюдается некоторое замедление или даже некий застой, без новых идей и прорывов. В то же время слово «биотехнология» у всех на слуху, развитие биотехнологий активно поддерживается развитыми государствами, туда вливаются большие ресурсы. Биотехнологии стали востребованными, от них ожидают серьезных успехов в решении многочисленных проблем человечества.

Замедление фундаментальных прорывов и «биотехнологический взрыв» приводят к тому, что уже сейчас, и особенно в перспективе, биотехнология будет определять направления развития фундаментальной науки, а ее достижения даже станут частью новых теорий. Говоря образно, биотехнологический локомотив начнет тянуть вагоны науки. Больше того,

в связи со все более сложными задачами, которые решает и будет решать биология в будущем, наука будет вынуждена слиться с биотехнологиями для обеспечения адекватных человеческих и финансовых ресурсов.

Примером, который подтверждает проведенное выше предположение, служит регенеративная медицина соматических стволовых клеток, в частности стволовых клеток крови (СКК, HSC в интернациональной литературе). Развитие биотехнологий СКК сильно тормозится отсутствием эффективных методов генерации и сохранения мультилинейного потенциала СКК. Такое положение усиливает в последнее время стимуляцию фундаментальных исследований, посвященных развитию биологии и физиологии СКК. Сегодня исследователи, изучающие СКК, практически превратились в биотехнологов в сфере регенеративной медицины. То же самое можно сказать о биоинформатике как одном из типов биотехнологий. Современная биология все более немыслима без биоинформатики.

Заключение. В отличие от часто применяемого термина «промышленный дизайн», который имеет дело с оптимизацией уже устоявшихся технологий, современный «биотехнологический дизайн» отражает особенности биотехнологического процесса и во многом основывается на достижениях фундаментальной науки. Причем трансляция теории в технологию происходит на стадии предложения возможных решений для технологического дизайна. На современном этапе биология и биотехнология меняются местами, вторая начинает осуществлять постановку задач для первой. Таким образом, вложение денег в биотехнологии также положительно отражается на развитии фундаментальной науки.

Библиографический список

1. Peters T. EcoLogicStudio // Architectural Design. 2010. № 80 (3). P. 110-115.
2. Long B.M., Hee W.Y., Sharwood R.E., Rae B.D., Kaines S., Lim Y-L., Nguyen N.D., Massey B., Bala S., von Caemmerer S., Badger M.R., Price G.D. Carboxysome encapsulation of the CO₂-fixing enzyme Rubisco in tobacco chloroplasts // Nat Commun. 2018. № 9 (1). P. 35–70.
3. Verma A.S., Agrahari S., Rastogi S., Singh A. Biotechnology in the realm of history // J Pharm Bioallied Sci. 2011. № 3 (3). P. 321–323.
4. Vitorino L.C., Bessa L.A. Technological microbiology: development and applications // Front Microbiol. 2017. № 8. P. 827.
5. Ligon B. Louis Pasteur: a controversial figure in a debate on scientific ethics // Semin Pediatr Infect Dis. 2002. № 13 (2). P. 134–141.
6. Watson J.D., Crick F.H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid // Nature, 1953. № 171 (4356). P. 737–738.
7. Ntege E.H., Sunami H., Shimizu Y. Advances in regenerative therapy: a review of the literature and future directions // Regen Ther. 2020. № 14. P. 136–153.
8. Calmeiro J., Carrascal M.A., Tavares A.R., Ferreira D.A., Gomes C., Falcão A., Cruz M.T., Neves B.M. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy: the role of human conventional type 1 dendritic cells // Pharmaceutics. 2020. № 12 (2). P. 158.
9. Shah Z., Philonenko E.S., Ramensky V., Fan C., Wang C., Ullah H., Zhang B., Volchkov P., Samokhvalov I.M. MYB bi-allelic targeting abrogates primitive clonogenic progenitors while the emergence of primitive blood cells is not affected // Haematologica. 2021. № 106 (8). P. 2191-2202.
10. Philonenko E.S., Tan Y., Wang C., Zhang B., Shah Z., Zhang J., Ullah H., Kiselev S.L., Lagarkova M.A., Li D., Dai Y., Samokhvalov I.M. Recapitulative haematopoietic development of human pluripotent stem cells in the absence of exogenous haematopoietic cytokines // J Cell Mol Med. 2021. № 25 (18). P. 8701–8714.

УДК 663.18

ВНЕДРЕНИЕ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ ИННОВАЦИОННЫХ BIOTEХНОЛОГИЙ VBTECH В СФЕРЕ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ЭКОЛОГИИ

И.С. Сысоев

Бриг-МВ, Группа компаний НИИ Высоких Технологий, Владивосток, Россия

Анализ социально-экономической ситуации России в аграрном секторе последних лет свидетельствует, что здесь применяются устаревшие технологии, сорта растений, несовершенные методы и формы организации производства и управления. Значительно уменьшилось количество образцов вновь конструируемых механизмов средств автоматизации сельскохозяйственных работ, снизилась интенсивность процесса освоения и внедрения инновационной техники и технологий сельскохозяйственного производства крупными хозяйствами и мелкими фермерами. Биотехнология – одно из ключевых направлений качественного технологического развития в целом ряде отраслей экономики. Потенциал возможностей и спектр применения биотехнологии превратил отрасль наряду с нанотехнологиями в ведущий фактор развития экономик отдельных государств и мирового сообщества в целом. Внедрение и развитие в АПК Алтайского края инновационной биотехнологии VBTEch: проекта «МегаМини-Биозавод VBTEch. Биотехнологическое производство в помещении размером с лабораторию» позволит создать в крае высокотехнологичные научно-производственные биотехнологические комплексы по выпуску микробиологических биопрепаратов, что является наиболее рациональным и экономически обоснованным путем модернизации биологической промышленности Алтайского края.

Ключевые слова: сибирское земледелие инновационное развитие, внедрение, инновация, биоизмелеление, биотехнологии, ноу-хау, модернизация биологической промышленности, биоудобренения, энергосберегающие технологии

Характеристика проблемы. С практической точки зрения Алтайский край обладает рядом конкурентных преимуществ, к числу которых можно отнести следующие.

1. Алтайский край – житница не только Сибири, но и всей страны. По объёмам производства зерна и в первую очередь высококачественной пшеницы край входит в первую пятёрку регионов России, а зерновое поле Алтая является самым большим в России. Здесь производится в пределах 40% зерна в Западно-Сибирском регионе.

2. Развитие биотехнологий в Алтайском крае. Стратегическим региональным документом, руководством к действию, является краевая программа «Развитие биотехнологий в Алтайском крае на период до 2020 года».

Проблема или возможность. При всем наличии конкурентных преимуществ региона в рамках развития агропромышленного комплекса имеются существенные проблемы, решение которых, на наш взгляд, становится безотлагательным для обеспечения конкурентоспособности и дальнейшего динамичного развития АПК Алтайского края.

1. Снижение плодородия почв. В настоящее время в Алтайском крае, как и в большинстве субъектов Российской Федерации, продолжается снижение плодородия почв, ухудшается состояние земель, используемых или предоставленных для ведения сельского хозяйства. Идет медленное, но постоянное снижение гумуса. Во втором цикле (1972–1987 гг.) пахотные почвы с низким содержанием гумуса составляли 31,9%, в третьем цикле (1980–1996 гг.) –

34,5%, в четвертом (1986–2001 гг.) – 36,7%, в пятом (1990–2007 гг.) – 44,3%, в шестом (2016 г.) – 45,9% пахотных площадей» [1, 3].

2. Низкая урожайность культур. Алтайский край является крупным агропромышленным регионом, занимающим лидирующие позиции в России как по площади посева культур, так и объемам производства зерна и его переработки.

По объему внесения как минеральных, так и органических удобрений в расчете на один гектар площади посева Алтайский край существенно уступает другим аграрным регионам РФ. Так, в среднем по РФ внесение минеральных удобрений составило 42 кг/га, а в Алтайском крае ниже в 7 раз [4]. Однако обращает на себя внимание тот факт, что урожайность в крае редко превышает 14 ц/га (например, в 2005 г. это было 8,8 ц/га, в 2015 г. 11 ц/га и т.д.). По этому показателю край почти всегда находится на самых последних местах по РФ – отставание от среднероссийского показателя в 1,5–2 раза и больше. Уже давно это никого не удивляет.

Фактически край добивается успехов в валовом сборе зерна, применяя так называемый экстенсивный путь развития, или, другими словами, используя обширные территориальные возможности, а не эффективность использования земельных ресурсов. Если говорить о том, что Алтайский край – это всё-таки житница России, то урожайность зерна должна быть увеличена принципиально [2].

3. Низкое использование нетрадиционных удобрений. В Алтайском крае катастрофически снижается плодородие почв. Снижается из-за того, что мы применяем очень низкие нормы внесения минеральных удобрений и совсем забыли про такой важный фактор, как органические удобрения, а они не только повышают плодородие, но и сохраняют экологию. В 1990 г. на Алтае вносили 9 млн тонн органических удобрений (компост, навоз, помет), в среднем на один гектар пашни приходилось две тонны органики. Начиная с 1995 г. объемы стали уменьшаться. В последние годы органические удобрения стали применяться очень ограниченно. При этом в регионе каждый год накапливается отходов животноводства и птицеводства около 7 млн тонн! Чтобы совсем не затовариться, навоз вывозят на свалки. А это – золото [1].

4. Производство органической продукции. Потенциал Алтайского края высок и определен благоприятными агроклиматическими условиями региона, развитыми отраслями животноводства и растениеводства, имеющимися технологиями производства органической продукции.

5. Проблема создания собственных высокотехнологичных биотехнологических производств в Алтайском крае. В Региональной программе «Развитие биотехнологий в Алтайском крае на период до 2020 года» определена цель: модернизация традиционных для региона видов деятельности на основе формирования практики применения и массового внедрения биотехнологий, а также создания собственных биотехнологических производств.

В направлении агробиотехнологий в Алтайском крае, как и в России, нет примеров создания новых высокотехнологичных биотехнологических производств (кроме фармпроизводств) в отличие от создания новых биопрепаратов.

Проблема биотехнологической отрасли

Сегодня биотехнология – это наука, промышленность и многомиллиардный бизнес, однако широкому проникновению биотехнологий в экономику мирового хозяйства препятствуют проблемы современных биотехнологий.

В числе системных проблем биотехнологической отрасли можно выделить высокую капиталоемкость, а, следовательно, длительную окупаемость из-за следующих причин:

— дорогостоящее биотехнологическое оборудование;

— энергоемкие технологии производства.

Проблема биотехнологической науки

В настоящее время в конструкциях биотехнологического оборудования наблюдается научный и производственный застой (стагнация), особенно в производстве биооборудования для промышленного производства биопрепаратов. Нет или очень мало инновационных разработок.

Инновационное решение

Создание в Алтайском крае высокотехнологичного и высокодоходного наукоёмкого промышленного биотехнологического производства на основе инновационной биотехнологии VBTech.

Уникальность проекта. Наше главное преимущество перед конкурентами – это создание современного (цифрового) промышленного высокотехнологичного биотехнологического производства с уникальным оборудованием, низкзатратной технологией и с минимальными капитальными затратами.

Основным элементом высокотехнологичного промышленного биотехнологического производства является оригинальная конструкция биореактора/ферментёра VBTech: НОУ-ХАУ «Устройство и способ производства биомассы аэробных микроорганизмов».

Биореактор/ферментёр VBTech – российский биореактор нового типа. Применено высокотехнологичное инновационное конструктивное решение (НОУ-ХАУ): оригинальная конструкция биореактора/ферментёра при полном соответствии требованиям асептики.

Достоинствами такой конструкции:

- крайняя простота и дешевизна;
- низкая себестоимость производства биопрепаратов.

Так, при полном соответствии требованиям асептики и объемом всего 30 л имеет производительность традиционного промышленного биореактора с объемом 750 литров при минимальных капитальных затратах и позволяет организовать «крупнотоннажное промышленное высокотехнологичное биотехнологическое производство в помещении размером с лабораторию».

Инновационная технология VBTech позволяет кардинальным образом разрешить не только «затратный» вопрос промышленной биотехнологии, сделать низкзатратным производство растениеводческой продукции, которая является кормовой базой для животноводства, но и дать дорогу широкомасштабному развитию биотехнологии: от идеи до внедрения законченных разработок в промышленное производство.

Биореакторы составляют основу биотехнологического производства.

Продукция «МегаМини-Биозавода VBTech»:

1. Наукоёмкая технология производства VBTech.
2. Элитные российские микробиологические биопрепараты:
 - 1) сельское хозяйство: полная замена минеральных удобрений и химических препаратов, повышение урожайности, кормовая база животноводства, сохранение и восстановление плодородия земель, экологически чистые продукты растениеводства;
 - 2) экология: биологическое оздоровление и восстановления плодородия деградированных и техногенно нарушенных земель, переработка отходов различных производств;
 - 3) инновационное высокотехнологичное биотехнологическое оборудование (по Fabless-технологии).

Технология VBTech позволяет создать сеть МегаМини-Биозаводов VBTech в регионах с развитым сельскохозяйственным производством, что является наиболее рациональным и экономически обоснованным путем модернизации биологической промышленности.

Так, «МегаМини-Био завод VBTech» по испытанному производству азотного биоудобрения имеет:

- объем производства: от 12 000 до 30 000 и более литров в месяц;
- общая площадь производственных помещений: 250–300 кв. м;
- рентабельность производства (rom) – более 300% (цены РФ) и более 500% (цены Китая);
- срок окупаемости проекта: 12–18 месяцев (с момента начала производства).

Степень новизны проекта: технология VBTech не имеет прямых аналогов на мировом рынке аналогичной продукции.

Технология производства VBTech (пилотная линия в ручном режиме) и готовая продукция (азотное биоудобрение) прошли успешные испытания: Приморский край (Россия, 1990-е гг., Северный Китай. 2001 г., Белоруссия. 2009 г., Вьетнам 2012 г.).

Ожидаемые результаты. Внедрение и развитие проекта «МегаМини-Био завод VBTech» в решение проблем и задач Региональной программы «Развитие биотехнологий в Алтайском крае на период до 2020 года» (п. 2.1–2.5).

Решение следующих проблем:

1) создания в крае собственных высокотехнологичных биотехнологических производств, проблем промышленной биотехнологии. Технология VBTech позволяет создать сеть МегаМини-Био заводов VBTech в регионах с развитым сельскохозяйственным производством, что является наиболее рациональным и экономически обоснованным путем модернизации биологической промышленности.

2) снижения плодородия почв, урожайности сельскохозяйственных культур в крае, уровня внесения удобрений на 1 га. Восстановить плодородие почв, повысить урожайность и рентабельность производства сельскохозяйственной продукции – сегодня это одна из основных задач сельхозпроизводителей с применением биоудобрений (биопрепаратов), производимых по низкзатратной технологии VBT, в качестве полноценной замены химических удобрений и препаратов в необходимом количестве для внесения в почву на уровне средних по России;

3) низкого использования нетрадиционных удобрений. Применение биопрепаратов, производимых по низкзатратной технологии VBT для биопереработки отходов животноводства и птицеводства в биоорганические удобрения;

4) биологизации сельского хозяйства края, производства органической продукции.

Применение биопрепаратов, производимых по низко затратной технологии VBT – фактор значительного снижения себестоимости органической продукции. Развитие органического земледелия может стать мощным стимулом для сельского хозяйства Алтайского края.

Заключение. Внедрение и развитие в АПК Алтайского края инновационной биотехнологии VBTech: проекта «МегаМини-Био завод VBTech. Биотехнологическое производство в помещении размером с лабораторию» позволит:

1. Создать в крае высокотехнологичные научно-производственные биотехнологические комплексы (на базе сети Мини-БИО заводов VBTech) по выпуску микробиологических биопрепаратов (биотехнологическую продукцию), что является наиболее рациональным и экономически обоснованным путем модернизации биологической промышленности Алтайского края.

2. Восстановить плодородие почв, повысить урожайность и рентабельность производства сельскохозяйственной продукции, что является сегодня одной из основных задач сельхозпроизводителей:

- 1) производить полностью экологически чистую продукцию, которая сможет решить задачу импортозамещения, а также последующий выход ее на внешние рынки;
- 2) сделать рентабельной собственную кормовую базу для животноводства;
- 3) вывести сельскохозяйственную отрасль края на российский и мировой уровень, при которой продукция с маркировкой «Made in Altai» («Сделано в Алтае») гарантируется высоким качеством и экологической безопасностью;

3. Создать в Алтайском крае высокотехнологичные биотехнологические производства, нацеленные:

- а) на переработку сельскохозяйственной продукции, биологическое оздоровление и восстановления плодородия деградированных и техногенно нарушенных земель,
- б) обеспечение плодородия земель сельскохозяйственного назначения (Федеральный закон N 101-ФЗ, ФЗ N 308-ФЗ от 31 июля 2020).

Для этого необходимо регулярное обследование сельхозземель. Восполнение (восстановления) плодородия почв – обязанность собственника. Химическими методами состояние почвы восстановить практически невозможно;

- в) переработку отходов различных производств;
- г) для обслуживания животноводческой отрасли (корма, добавки, ветпрепараты) и пищевой промышленности.

4. Важно создать в крае производство биотехнологического оборудования VBTech- (биореакторов /ферментеров, МегаМини-Биозаводов – компактных российских крупнотоннажных промышленных биопроизводств с низкзатратной технологией).

5. Создать в крае производственную базу современных биотехнологических разработок в кооперации с биотехнологическими центрами региональных вузов, инжиниринговым центром «Промбиотех», Федеральным Алтайским научным центром агробиотехнологий, ООО ПО «Сиббиофарм» – Бердск («Агробиотехнологии», «Пищевые биотехнологии», «Лесные биотехнологии») как технологическую площадку внедрения и развития российских биотехнологий.

6. В результате деятельности предприятий биотехнологической отрасли существенно повысится внимания иностранных инвесторов к региону в целом.

7. Задача Алтайского края – занять ведущие позиции в развитии биотехнологической индустрии в Сибирском федеральном округе, выйти на путь практической реализации стратегии развития Алтайского края «От биопродуктов к биоэкономике».

Экологическая составляющая проекта обусловлена возможностью замещения химических удобрений, средств защиты растений на биологические, микробиологической утилизации отходов АПК, что приведёт к улучшению экологической обстановки в агропромышленном секторе.

Библиографический список

1. Антонова О. Золото на свалках // Altapress.ru <https://altapress.ru> (дата обращения: 19.08.20).
2. Вологдин Е.В. Растениеводство в Алтайском крае в период 2000–2017 гг. // Экономические исследования и разработки. 2019. Вып. 4.
3. Мониторинг плодородия почв земель сельскохозяйственного назначения Алтайского края : справочник. Барнаул, 2018. 382 с.
4. Оценка экономической эффективности применения удобрений сельскохозяйственными предприятиями в условиях Алтайского края. Барнаул, 2016.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ: ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ПРИВЛЕЧЕНИЯ ТАЛАНТЛИВОЙ МОЛОДЕЖИ В ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНУЮ ИНДУСТРИЮ

УДК 378.14

О ПОДГОТОВКЕ КАДРОВ ПО НАПРАВЛЕНИЮ 19.03.01 «БИОТЕХНОЛОГИЯ» В АЛТАЙСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

*Н.Г. Базарнова, А.В. Захарченко, О.В. Базарнова
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия*

В статье изложено содержание учебного плана, приведен перечень, объем в зачетных единицах трудоемкости и часах базовых, вариативных и дисциплин по выбору, осваиваемых студентами направления подготовки 19.03.01 «Биотехнология» в Алтайском государственном университете.

Ключевые слова: направление подготовки, биотехнология, дисциплины учебного плана, базовая часть, вариативная часть, дисциплины по выбору.

Миссия университета – не только передавать существующие знания, но и создавать новые. Без этого невыполнима задача перевооружения производства, которую государство ставит перед бизнесом. Она под силу молодым специалистам, которые придут из университетов. Логично, что работодатели традиционно отдают предпочтение выпускникам классических вузов, подготовленных фундаментально, знающих новое и способных его создавать. Ученые и студенты Института химии и химико-фарцевтических технологий – постоянные поставщики новых инновационных технологий для предприятий пищевой, перерабатывающей, а также фармацевтической промышленности. Львиная доля исследований сосредоточена на одной из приоритетных для региональной экономики отраслей – сфере биотехнологий. Богатый бэкграунд позволил вузу в свое время получить необходимые разрешительные документы на подготовку и выпуск бакалавров по направлению 19.03.01 «Биотехнология».

Следуя вектору государственной политики, в вузе поддерживают исследования в сфере медицинских биотехнологий и биофармации. Разработку биофармпрепаратов методами рекомбинантных технологий проводят магистры и аспиранты в рамках магистерской программы, реализуемой совместно с государственным научным центром вирусологии и биотехнологии «Вектор». Здесь же студенты химфака, а ныне Института химии и химико-фармацевтических технологий испытывают свойства физиологически активных веществ, извлекаемых из лекарственных растений, полученных биотехнологическими методами микроклонального размножения.

В нынешних условиях выпускать на рынок труда «функционеров» уже недостаточно. Работники должны не только хорошо знать производственную технологическую линию, но и обладать компетенциями в разных областях и быть генераторами и разработчиками инновационных технологий на действующих производствах. Наша задача – подготовка тех, кто будет находить, создавать и внедрять новые инновационные технологии и материалы.

Структура подготовки кадров в Институте химии и химико-фармацевтических технологий включает ряд направлений и специальностей, которые позволяют формировать у студентов компетенции на высоком уровне. Специфика обучения в институте заключается в ее междисциплинарности. В настоящее время осуществляется подготовка по пяти укрупненным группам специальностей и направлений подготовки (УГСН). УГСН 04.00.00 – Химия – это бакалавриат, магистратура, специалитет. 04.03.01 Химия (бакалавр) – включает несколько профильных модулей. Направленность магистерских программ: квантовые технологии, компьютерный наноинжиниринг и физикохимия материалов; химико-аналитический контроль живых и техносферных систем; сверхкритические флюидные технологии в производстве фармацевтических препаратов (разработана по программе ФАРМА-2020, госконтракт № 05.РА14.12.0013 от 07.11.2014), реализуется с базовой кафедрой ЗАО «Алтайвитамины»; разработка биофармацевтических препаратов на основе рекомбинантных технологий (разработана по программе ФАРМА-2020, госконтракт № 05.РА14.12.0011 от 07.11.2014). Фундаментальная и прикладная химия (04.05.01) (квалификация: Химик. Преподаватель химии) со специализациями: органическая химия; физическая химия твердых тел, коллоидных систем и наноматериалов. Научные специальности аспирантуры (04.06.01 Химические науки): аналитическая химия, органическая химия, физическая химия. Проведено три набора студентов на специальность 33.05.01 «Фармация».

В институте реализуется подготовка по блоку инженерных направлений подготовки: 20.03.01. 20.04.01 «Техносферная безопасность», реализуется совместно с базовой кафедрой ГУ МЧС РФ по Алтайскому краю. Совместно с базовой кафедрой ООО «Ренессанс Косметик» реализуется направление подготовки 18.03.01 «Химическая технология» с профилем «Химическая технология синтетических биологически активных веществ, химико-фармацевтических препаратов и косметических средств».

Первый набор студентов по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология» проведен в 2017-18 учебном году с полным возмещением затрат за обучение из собственных средств. В 2020-21, 2021-22 учебных годах проведен набор на бюджетные места соответственно 25 и 10 человек. Контрольные цифры приема на 2022-23 учебный год – 35 человек.

Учебный процесс организован и реализован в соответствии с ФГОС ВО от 11.03.2015 №193, объем образовательной программы составляет 240 зачетных единиц трудоемкости (зет). Структура образовательного процесса включает блоки теоретического, практического обучения и государственной итоговой аттестации (табл. 1–4).

Таблица 1

Дисциплины теоретического обучения – базовая часть

Наименование дисциплины	Объём, зет	Объём, час
Базовая часть	120	4320
Русский язык и культура речи	3	108
Безопасность жизнедеятельности	6	216
Философия	3	108
История	3	108
Физическая культура и спорт	2	72
Психология	3	108
Иностранный язык	9	324
Правоведение	3	108
Экономика	3	108
Социально-гуманитарный модуль	6	216
<i>Социология</i>	2	72
<i>Культурология</i>	2	72
<i>Конфликтология</i>	2	72
Математика	13	468
Физика	9	324
Информатика	3	108
Неорганическая химия	3	108
Аналитическая химия	3	108
Органическая химия	6	216
Дополнительные главы органической химии	3	108
Физическая химия	6	216
Начертательная геометрия. Инженерная графика	6	216
Биология с основами физиологии растений	6	216
Техническая термодинамика и теплотехника	6	216
Основы биохимии и молекулярной биологии	3	108
Теоретические основы биотехнологии	3	108
Процессы и аппараты биотехнологических производств	3	108
Электроника и электротехника	3	108
Метрология, стандартизация и сертификация	3	108

Таблица 2

Дисциплины теоретического обучения – вариативная часть

Наименование дисциплины	Объём, зет	Объём, час
	99	3892
Инструментальные методы анализа в биотехнологических производствах	3	108
Компьютерные технологии проектирования процессов биотехнологии	3	108
Медико-биологические основы безопасности и токсикология	3	108
Надёжность технических систем и техногенный риск	3	108
Микробиологический контроль качества продуктов для агробизнеса	5	180
Методы контроля и сертификации биотехнологических производств	3	108
Основы экономики и управления биотехнологическим производством	3	108
Материаловедение и технология конструкционных материалов	4	144
Безопасность эксплуатации биотехнологических установок	3	108

Окончание табл. 2

Биотехнология растений	3	108
Технология производства базидиальных грибов	3	108
Основы биохимии вторичного обмена растений	3	108
Медицинские биотехнологии	3	108
Сельскохозяйственные биотехнологии	3	108
Системы защиты среды обитания	9	324
Производство средств защиты растений	3	108
Химия биологически активных веществ	6	216
Производство пробиотиков для животноводческих хозяйств	6	216
Элективные дисциплины по физической культуре и спорту		328

В таблице 3 курсивом отмечены дисциплины, которые не были выбраны студентами данного курса для изучения.

Таблица 3

Дисциплины теоретического обучения – вариативная часть

Наименование дисциплины	Объём, зет	Объём, час
Дисциплины (модули) по выбору 1 (ДВ.1)	6	216
Направленный синтез БАВ в культуре клеток и тканей растений	6	216
<i>Теоретические основы медицинских биотехнологий</i>	6	216
<i>Направленный синтез БАВ в растительном биотехнологическом сырье</i>	6	216
Дисциплины (модули) по выбору 2 (ДВ.2)	6	216
Методы обработки растительного сырья	6	216
<i>Химические и биотехнологические методы переработки растительного сырья</i>	6	216
<i>Введение в иммунохимический анализ</i>	6	216
Дисциплины (модули) по выбору 3 (ДВ.3)	6	216
Спектральные методы исследования растительных веществ	6	216
<i>Избранные главы хроматографических методов анализа</i>	6	216
<i>Основы рекомбинантных технологий</i>	6	216
Дисциплины (модули) по выбору 4 (ДВ.4)	6	216
Химический и хроматографический анализ растительных веществ	6	216
<i>Избранные главы спектроскопических методов анализа</i>	6	216
<i>Введение в технологию рекомбинантных вакцин</i>	6	216
Дисциплины (модули) по выбору 5 (ДВ.5)	6	216
Материалы на основе продуктов биоконверсии растительного сырья	6	216
<i>Продукты биоконверсии растительного сырья</i>	6	216
<i>Введение в технологию рекомбинантных белков</i>	6	216

Таблица 4

Практическое обучение и государственная итоговая аттестация

Наименование дисциплины	Объём, зет	Объём, час
ПРАКТИКИ	15	540
Учебная практика	3	108
Практика по получению первичных профессиональных умений и навыков, в том числе первичных умений и навыков научно-исследовательской деятельности	3	108
Производственная практика	12	432
Научно-исследовательская работа	3	108

Окончание табл. 4

Практика по получению профессиональных умений и опыта профессиональной деятельности	3	108
Преддипломная практика	6	216
Государственная итоговая аттестация	6	216
Защита выпускной квалификационной работы, включая подготовку к процедуре защиты и процедуру защиты	6	216
Введение в профессию (адаптивная дисциплина для лиц с ограниченными возможностями здоровья)	2	72

В 2021 г. проведен первый выпуск бакалавров по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология». Учебный процесс для студентов института уникален возможностью сочетать его с научно-исследовательской деятельностью начиная с первого года обучения, выполнить выпускную квалификационную работу по заказу работодателя от предприятия или организации интересующего вида экономической деятельности и прекрасно трудоустроиться.

УДК 615.1: 37: 60 (571.150)

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ПРОВИЗОРА В АЛТАЙСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ МЕДИЦИНСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

В.М. Воробьева, Ю.В. Дегтярева, Ю.В. Шабалина

Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

В статье рассмотрены вопросы биотехнологического образования студентов медицинского университета, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация». Учебным планом АГМУ предусмотрено изучение дисциплин: «Теоретические основы биотехнологии» и «Биотехнология лекарственных средств», которые изучаются последовательно на третьих и четвертых курсах, что позволяет обучающимся поэтапно осваивать принципы современных методов конструирования лекарственных препаратов и сформировать универсальные, общепрофессиональные и профессиональные компетенции. Для преподавания дисциплины «Теоретические основы биотехнологии» выбран проектный метод как система обучения в процессе самостоятельного планирования и выполнения. Освоение биотехнологических дисциплин формирует целостную систему знаний у студентов-провизоров, от начала разработки и получения антибиотиков, моноклональных антител, рекомбинантных белков, векторных вакцин до разработки, внедрения, производства, контроля, хранения и реализации готового лекарственного препарата.

Ключевые слова: фармация, биотехнология, образование, учебный проект, рекомбинантные белки.

В эпоху постгеномных исследований разработки биотехнологии находят все более широкое применение в производстве лекарственных средств и диагностикумов, что обусловлено как высокой потребностью, так и возможностью неограниченного получения методами клеточной и генетической инженерии природных белковых регуляторов, таких как соматотропин, инсулины, эритропоэтин, колониестимулирующие факторы, цитокины, лабораторных и коммерческих тест-систем для диагностики инфекционных, наследственных и онколо-

гических заболеваний, установления факта беременности, выявления наркотических веществ, рекомбинантных и векторных вакцин. Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности изучения названного направления научно-технического прогресса студентами фармацевтических специальностей с целью проведения информирования и консультирования при отпуске и реализации лекарственных препаратов, и других товаров аптечного ассортимента в соответствии с инструкцией по применению. Постоянное расширение номенклатуры лекарственных препаратов таргетной направленности стимулирует необходимость пересмотра программы обучения провизоров для формирования трудовых функций профессиональных стандартов.

При разработки образовательной программы в соответствии с требованиями ФГОС ВО 33.05.01 «Фармация», утвержденного приказом Минобрнауки РФ № 219 от 27.03.2018 в учебном плане было предусмотрено изучение таких дисциплин, как «Теоретические основы биотехнологии» и «Биотехнология лекарственных средств», которые изучаются последовательно на третьем и четвертом курсах, что позволяет обучающимся поэтапно осваивать принципы современных методов конструирования лекарственных препаратов и сформировать универсальные, общепрофессиональные и профессиональные компетенции.

Биотехнологические дисциплины являются интегрирующими предметами, изучение которых базируется на знаниях биологии, биохимии, микробиологии, органической химии и тесно связаны с фармакологией, фармакогнозией, фармацевтической химией и фармацевтической технологией. Успешность биотехнологического образования будущего провизора зависит от уровня информированности студентов по современным тенденциям развития науки и производства, а также от заинтересованности обучающихся в получении новых знаний и овладении навыками информационно-коммуникационных технологий.

Теоретические основы биотехнологии были отнесены в учебном плане к части, формируемой участниками образовательных отношений, изучаются в третьем семестре в объеме 72 часов, из которых 10 часов составляет лекционный курс, 35 часов отводится на самостоятельное освоение предмета, 27 часов практических занятий. По завершению процесса обучения студенты сдают зачет в виде компьютерного тестирования. На освоение биотехнологии лекарственных средств в 8-м семестре выделено 144 часа, из которых лекции составляют 18 часов, практические занятия 51 час, самостоятельная работа обучающегося – 39 часов, подготовка к экзамену – 36 часов. Экзамен проходит в виде компьютерного тестирования и устного собеседования по двум теоретическим вопросам и задаче. С учетом информационных потребностей будущих провизоров составлены рабочие программы названных дисциплин, сформированы фонды оценочных средств, учебно-методический комплекс для электронной образовательной платформы Moodle.

Дисциплина «Теоретические основы биотехнологии» знакомит студентов третьего курса с историей развития биотехнологии, традиционными методами создания биообъектов-сверхпродуцентов, изменениями молекулярных механизмов внутриклеточной регуляции в результате индуцированного мутагенеза и отбором продуцентов по устойчивости к аналогам целевого продукта, принципами и этапами технологии рекомбинантных ДНК.

Для раздела «Молекулярная биотехнология» дисциплины «Теоретические основы биотехнологии» выбран проектный метод как система обучения в процессе самостоятельного планирования и выполнения, при которой обучающиеся приобретают знания и умения постепенно усложняющихся практических заданий-проектов, что обеспечивает формирование компетенций. Проектный метод способствует формированию критического, творческого мышления, умению работать с информацией, развитию коммуникативных умений [2, 3].

Выполнение проекта начинается с планирования действий по разрешению проблемы. Каждый проект обязательно требует исследовательской работы. Результатом работы над проектом является продукт. Подготовленный продукт должен быть представлен заказчику и (или) представителям общественности в форме презентации или портфолио. Учебный проект – это самостоятельная завершённая работа обучающегося, выполненная под руководством преподавателя. Метод проекта для обучающегося – переход от исполнения указаний, от выслушивания и реагирования – к общению, ответственности и получению самостоятельных полномочий. Преподаватель в этом случае выступает в роли консультанта и эксперта [2, 3].

Примером задачи для учебного проекта является техническое задание на получение грантов при проведении научных исследований. Целевым продуктом задания является конкретный белковый регулятор, который при патологическом процессе может быть использован как лекарственное средство. Студент-исследователь имеет возможность продемонстрировать умение выбирать альтернативный продуцент, метод получения гена с акцентом на использование банка генов или геномных библиотек. При реализации учебного проекта обучающийся также предлагает выбор векторной молекулы для доставки клонируемого гена, варианта переноса генетической информации, селективного гена-маркера и метода идентификации клеток-реципиентов с рекомбинантной ДНК. При выполнении учебного проекта для получения клонируемого гена студент может рассматривать следующие методы: рестриктазный, ферментативный на основе матричной РНК, химико-ферментативный на основе данных секвенирования белка (Вестерн-блоттинг) или секвенирования ДНК (дидезоксинуклеотидный метод Ф. Сенгера, Саузерн-блоттинг), синтез на основе ПЦР. Среди методов переноса генетической информации студент использует такие методы, как трансдукция, трансформация, трансфекция, сферопластирование, электропорация и др. Результаты своего исследовательского учебного проекта обучающиеся докладывают на студенческой конференции. Теоретические основы биотехнологии формируют базовые знания для изучения биотехнологии лекарственных средств.

Биотехнология лекарственных средств рассматривает особенности фармацевтических субстанций в зависимости от способа получения, требования правил надлежащей производственной практики, последовательность стадий и операций биотехнологического процесса витаминов, аминокислот, антибиотиков, инсулинов и других конкретных лекарственных средств, реализуемых на фармацевтическом рынке [1].

Освоение биотехнологических дисциплин формирует целостную систему знаний у студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация», от начала разработки и получения антибиотиков, моноклональных антител, рекомбинантных белков, векторных вакцин до разработки, внедрения, производства, контроля, хранения и реализации готового лекарственного препарата.

Библиографический список

1. Воробьева В.М., Турецкова В.Ф. Слагаемые и структура биотехнологического процесса производства лекарственных средств. Барнаул, 2007. 172 с.
2. Краснова В.В. Проектная деятельность в реализации ФГОС нового поколения // Юный ученый. 2016. №6.1. С. 31–33.
3. Розанов Л.Л. Метод проектов как педагогическая технология // Педагогика. 2014. № 4. С. 74–77.

УДК 601.2; 601.4

СОЗДАНИЕ И РАЗВИТИЕ ЦЕНТРА ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОИНЖЕНЕРИИ В УРАЛЬСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

И.С. Киселёва, А.А. Ермошин

Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

Уральский федеральный университет – участник Программы повышения конкурентоспособности российских университетов, проекта 5-100. В ходе реализации этого проекта в 2016 г. на базе Института естественных наук и математики (ИЕНиМ) началось создание Центра фундаментальной биотехнологии и биоинженерии в составе 4 лабораторий: биоинженерии, биомедицинской физики, молекулярных и клеточных биотехнологий и геномных исследований. Цель создания центра – развитие фундаментальных исследований, перспективных для создания новых биотехнологических и биоинженерных решений в сферах медицины, сельского хозяйства, экологии. В течение 2017–2018 гг. лаборатории были оснащены современным оборудованием, позволяющим вести исследования в области нанотоксикологии, нанобиомиметики, биопринтинга, психофармакологии, клеточных технологий, поиска биологически активных веществ природного происхождения, молекулярной генетики, геномных исследований, эко- и агробiotехнологий. Сформирован кадровый потенциал Центра, в котором более 60% составляют молодые ученые, в том числе пять иностранных специалистов (постдоки и аспиранты). Стажировки в ведущих российских и зарубежных университетах прошли 14 исследователей, что привело к формированию новых компетенций. Созданные условия обеспечили рост показателей деятельности Центра: публикационная активность выросла в 13 раз; в 10 раз снизились затраты на исследования в расчете на одну статью. Ресурсы центра активно используются при подготовке студентов всех уровней образования и аспирантов.

Ключевые слова: центр фундаментальной биотехнологии и биоинженерии, эффективность исследований.

Введение. Быстрое и эффективное развитие фундаментальных областей биологии, трансфер знаний в индустриальную сферу обусловлены необходимостью создания современных биотехнологий и биоинженерии для ответов на глобальные вызовы, такие как обеспечение растущего человечества необходимым количеством качественных продуктов питания, поддержанием «здоровой» среды обитания, решением медицинских проблем, поиска и разработки новых дешевых возобновляемых источников энергии и др. В России была принята Федеральная программа научно-технологического развития (ФПНТР), которая уделяла большое внимание развитию биотехнологий и биоинженерии, для реализации которых в 2012–2020 гг. были выделены средства в объеме 1178 млрд рублей [1, 2]. В 2016 г., ориентируясь на приоритетные направления развития науки, в Уральском федеральном университете был запущен проект создания Центра фундаментальной биотехнологии и биоинженерии (далее – Центр, ЦФББ) на основе существующих научных групп этого профиля.

Методы и инструменты реализации проекта. Для реализации проекта был осуществлен ряд решений и изменений в соответствии с известными подходами к стратегическому управлению [3].

Во-первых, к реализации проектов Центра были привлечены молодые исследователи, в том числе трое иностранных постдоков и двое иностранных аспирантов. В настоящее время молодые сотрудники составляют более 60% от общего количества работающих в проектах Цен-

тра. Для приобретения новых компетенций 14 молодых исследователей проекта прошли стажировки в ведущих научных центрах и университетах: Университет Хиросимы, Университет Окаямы (Япония); Малопольский центр биотехнологий (Польша); Университет Бхаратиара (Индия), Университет Внутренней Монголии (Китай) и др. Это позволило освоить новые методы и технологии и расширить тематики исследований. Кроме того, сформировались новые партнерские связи с ведущими учеными разных стран. В настоящее время сотрудники центра работают в коллаборации с 19 партнерами из Польши, Японии, Германии, Франции, Китая, Бразилии, США, Беларуси и других стран. Совместно с ними опубликовано более 60 статей.

Во-вторых, был осуществлен переход от проектной команды к штатному расписанию. Это позволило привлечь на постоянные позиции тех молодых исследователей, которые приобрели новый опыт в ходе стажировок. Вместе с тем были сформированы временные творческие коллективы из числа профессорско-преподавательского состава для дальнейшего развития новых и существующих направлений деятельности. Это позволило перейти от индивидуальных исследований к работе в командах, где каждый член коллектива имел определенные функции в соответствии с имеющимися компетенциями, что обеспечило рост эффективности исследований.

В-третьих, была проведена большая работа по развитию материальной базы исследований. Приобретено современное высокотехнологичное, уникальное оборудование, на котором способны работать прошедшие стажировки исследователи: секвенаторы Applied Biosystems и Oxford Nanopore; система изучения мембранного транспорта MIFE, биопринтер для 3D печати живыми клетками, комплекты оборудования для работы с клеточными культурами растений, животных, человека и многое другое. Было принято решение о закреплении ответственных за использование и обслуживание новых приборов, что обеспечило их эффективную эксплуатацию и расширило кооперацию с коллективами, выполняющими смежные проекты.

В-четвертых, для организации новых лабораторий были выделены дополнительные площади за счет перераспределения ранее неэффективно использованных офисных и складских помещений.

Все эти меры позволили достичь существенного роста показателей деятельности Центра. Было подготовлено 12 заявок на гранты РФФИ и РНФ, выиграны 6 грантов РФФИ. Выполнено 7 хоздоговоров. Гранты и хоздоговоры обеспечили софинансирование проекта. С 2016 по 2020 г. были опубликованы 161 статья в журналах из баз Scopus и WoS, что составляет 1340% к уровню 2016 г. (табл.). Это сопоставимо и даже значительно превышает опубликованные данные в среднем по Российской Федерации [4]. Подано две заявки на патенты.

Таблица

Показатели деятельности Центра фундаментальной биотехнологии и биоинженерии
Уральского федерального университета

Год	Публикации в Scopus и WoS	Объем доходов из внебюджетных источников, руб.	Коэффициент рентабельности (Объем доходов/затраты ППК)	Затраты на статьи развития (оборудование, стажировки, ремонты), %
2016	12	424 600	0,11	69,1
2017	28	4 648 780	0,44	85,1
2018	30	4 261 300	1,92	56,2
2019	46	2 300 000	1,97	4,5
2020	45	3 152 105	1,21	9,1

Эффективным средством развития исследований и консолидации новых структурных подразделений явилось проведение семи международных конференций, симпозиумов, совещаний.

Результаты научных исследований. За время реализации проекта окончательно сформировалась тематика исследований: молекулярные и клеточные биотехнологии; молекулярные механизмы морфогенеза; биологические ресурсы и биотехнологии; биологические объекты как источники БАВ; биомедицина; биоинженерия; экобиотехнологии.

По направлению исследований «Биологические ресурсы и биотехнологии: биологические объекты как источники БАВ» проведено изучение 16 видов ксилотрофных грибов Урала, выявлено 4, обладающих высокой антиоксидантной и антирадикальной активностью, в том числе виды, подавляющие пролиферацию раковых клеток. Изучено влияние грибных экстрактов на рост растений и их устойчивость к абиотическим стрессорам. Выявлено протекторное действие 5% экстракта *Achillea millefolium* в отношении генотоксичных химиотерапевтических препаратов. Изучено образование фармакологически ценных соединений (стероидных гликозидов) в клеточной биомассе якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.) Показано накопление кумаринов группы келлактона в биомассе каллусных и суспензионных культур вздутоплодника сибирского; подобраны условия оптимизации выхода биологически активных веществ этих растений в культурах *in vitro* [5]. Получены каллусные культуры соплодки из листовых эксплантов. Показана высокая биологическая активность их экстрактов, не уступающая нативным растениям. Изучено генетическое разнообразие локальных популяций растений *Taraxacum officinale* L., *Sanguisorba officinalis* и *Plantago medium* как традиционного лекарственного сырья и источника БАВ.

По направлению «Экобиотехнологии» проведена оценка генетического разнообразия популяций видов рода *Alisum* как потенциального гипераккумулятора никеля для биоремедиации [6]. Вид введен в культуру *in vitro*, получены линии клеточной селекции, пригодные для фиторемедиации. Выделен комплекс металлоторерантных ростстимулирующих бактерий для ремедиации техногенно нарушенных территорий [7, 8].

Проведена комплексная оценка влияния тяжелых металлов и засоления на изменение экспрессии генов фенилпропаноидного пути и транскрипционных факторов семейства MYB и ERF. Показана взаимосвязь между физиолого-биохимическими и молекулярно-генетическими механизмами устойчивости растений и лигнификацией клеточных стенок как один из механизмов их адаптации к неблагоприятной среде [9].

По направлению «Биомедицина и психофармакология» впервые дана молекулярно-генетическая характеристика клеща *Ixodes kazakstani*, эндемичного вида, переносчика природно-очаговых инфекций. Установлен эффект высокой консервативности генома наряду с его высокой эволюционной пластичностью у возбудителя природно-очаговой инфекции *Borrelia bavariensis*. Получены новые сведения по генетическому разнообразию возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека *Anaplasma phagocytophilum*, в азиатской части России. На основе мультилокусного сиквенса-типирования выявлено 15 новых уникальных для России сиквенса-типов и 39 новых аллелей [10].

Разработан новый метод изучения поведенческой активности на зебраданио, расширяющий инструментарий методов нейрофенотипирования. Показана роль нейроглии зебраданио в моделировании заболеваний ЦНС [11, 12].

Созданы математические модели электромеханического сопряжения в кардиомиоцитах. Разработан новый метод исследования кинетики взаимодействия ионов Ca^{2+} с миофиламентами в миокарде, который может быть использован для не прямой оценки взаимодействия ионов кальция с миофиламентами как в здоровом, так и в патологически измененном миокарде. Разработан новый метод получения одиночных кардиомиоцитов сердца млекопитающих [13].

Показан возможный путь адресной доставки лекарств-цитостатиков с использованием железо-молибденовых наночастиц полиоксиметаллатов [14].

В области биоинженерии и биомиметики разработан способ получения сфероидов диаметром 200 и 80 мкм из двух клеточных линий – клеток HeLa и мезенхимальных стволовых клеток, который будет использован для выращивания сфероидов с целью последующей биопечати; предложен оригинальный метод бесконтактного точного нанесения микро-капель суспензии клеток на подложку. Разработан оригинальный метод формирования наноструктур на поверхности алюминиевых пластин, позволяющий создавать супергидрофильные и супергидрофобные поверхности, и исследована их стабильность. Разработаны методики создания стабильных водных суспензий с высокой концентрацией наночастиц оксидов металлов CuO, NiO, Fe_2O_3 , ZnO, TiO_2 , Al_2O_3 , PbO, CdO, Mn_3O_4 , и сульфидов Cd и Pb методом лазерной абляции в жидкости с использованием наносекундного импульсного лазера для проведения нанотоксикологических исследований. В области биомиметики изучена структурная окраска чешуек крыльев ряда видов бабочек. Экспериментально определенные параметры наноструктур чешуек использовались для компьютерного моделирования спектра отражения света.

Одним из результатов развития исследований в ходе реализации проекта стала защита семи кандидатских и одной докторской диссертации.

Образовательная деятельность. Пересмотрены учебные планы направления подготовки «Биология» для магистрантов и бакалавров, введены новые дисциплины: агробиотехнологии, экобиотехнология, генетические ресурсы растений для агро- и биотехнологий, медицинские биотехнологии, нанобиотехнологии и др. В лабораториях центра выполнено более 20 выпускных работы бакалавров по направлениям подготовки: «Биология», «Физика», «Нанотехнологии»; магистерские диссертации в рамках образовательных программ «Фундаментальная биология и биотехнологии», «Biodiversity in a Changing World», «Доклинические исследования лекарственных средств и биомедицина», всего более 20 исследований.

Заключение. Современный уровень исследований и организационная структура Центра фундаментальной биотехнологии и биоинженерии УрФУ обеспечивают сегодня возможности тиражирования опыта по созданию и развитию такого центра. Лаборатории Центра открыты для индивидуальных стажировок молодых исследователей, прохождения практик студентами всех уровней подготовки, подготовки аспирантов, выполнения совместных проектов.

Библиографический список

1. Прогноз научно-технологического развития России: 2030. Биотехнологии / под ред. Л.М. Гохберга, М.П. Кирпичникова; Высшая школа экономики. М., 2014. 48 с.

2. ВП-П8-2322. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (утв. Правительством РФ 24.04.2012 № 1853п-П8).
3. Гительман Л.Д. Менеджмент – твоя работа. Действуй на опережение. М., 2011. 544 с.
4. Федотов А.В., Васецкая Н.О. Анализ эффективности механизмов стимулирования публикационной активности российских ученых // Университетское управление: практика и анализ. 2013. № 1. С. 60–69.
5. Tomilova S.V., Khandy M.T., Kochkin D.V., Galishev B.A., Klyushin A.G., Nosov A.M. Effect of Synthetic Auxin Analogs (2,4-D and α -NAA) on Growth and Biosynthetic Characteristics of Suspension Cell Culture of *Tribulus terrestris* L. // Russian Journal of Plant Physiology. 2020. 67 (4). P. 636–645.
6. Tripti, Kumar A., Maleva M., Borisova G., Chukina N., Morozova M., Kiseleva I. Nickel and copper accumulation strategies in *Odontarrhena obovata* growing on copper smelter influenced and non-influenced serpentine soils: A comparative field study // Environmental Geochemistry and Health. 2021. 43. S.1401–1413.
7. Kumar A., Tripti, Voropaeva O., Maleva M., Panikovskaya K., Borisova G., Rajkumar M. Bioaugmentation with copper tolerant endophyte *Pseudomonas lurida* strain EOO26 for improved plant growth and copper phytostabilization by *Helianthus annuus* // Chemosphere. 2021. № 266. 128973.
8. Filimonova E., Lukina N., Glazyrina M., Borisova G., Tripti, Kumar A., Maleva M. A comparative study of *Epipactis atrorubens* in two different forest communities of the Middle Urals, Russia // Journal of Forestry Research. 2019. V. 31. № 6. P. 1–10.
9. Tugbaeva A. S., Plotnikov D. S., Ermoshin A. A., Kiseleva I. S. Antioxidant enzymes and cell wall formation in tobacco plants under salt stress // AIP Conference Proceedings. 2019. № 2063. 030022.
10. Mukhacheva T. A., Shaikhova D. R., Kovalev, S. Y. Asian isolates of *Anaplasma phagocytophilum*: Multilocus sequence typing // Ticks and Tick-borne Diseases. 2019. V. 10. №4. P. 775–780.
11. Demin K.A., Lakstygai A.M., Volgin A.D., ...Zabegalov K.N. et al. Cross-species Analyses of Intra-species Behavioral Differences in Mammals and Fish // Neuroscience. 2020. V. 429. P. 33–45.
12. Zabegalov K.N., Wang D., LongEn Yang L. et al. Decoding the role of zebrafish neuroglia in CNS disease modeling // Brain Research Bulletin. 2020. V. 4. № 166. P. 44–53.
13. Khokhlova A., Konovalov P., Iribe Gentaro, Solovyova O., Katsnelson L. The Effects of Mechanical Preload on Transmural Differences in Mechano-Calcium-Electric Feedback in Single Cardiomyocytes: Experiments and Mathematical Models // Frontiers in Physiology. 2020. V. 11. P. 171.
14. Ostroushko A.A., Gagarin I.D., Grzhegorzhevskii K.V., Gette I.F., Vlasov D.A., Ermoshin A.A., Antosyuk O.N., Shikhova S.V., Danilova I.D. The physicochemical properties and influence on living organisms of nanocluster polyoxomolybdates as prospective bioinspired substances // Journal of Molecular Liquids. 2020. № 301. 110910.

УДК 378.14

О ПЕРСПЕКТИВАХ СЕТЕВОГО ОБУЧЕНИЯ ПО НАПРАВЛЕНИЮ ПОДГОТОВКИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»

И.В. Микушина

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

Сетевая форма реализации образовательных программ способствует формированию новых компетенций, новых форм обучения, подготовке личности к жизни и возможности владения новыми специальностями и технологиями благодаря использованию ресурсов нескольких образовательных организаций, а также при необходимости использования ресурсов иных организаций.

Ключевые слова: образовательная программа, направление подготовки, биотехнология, сетевая форма.

Ключевыми характеристиками современного общества являются развивающиеся быстрыми темпами социальная и научно-техническая сферы, а также повсеместное внедрение новых идей и технологий. В связи с этим на темпы экономического развития все больше влияет воспроизводство научных знаний, опирающееся на новаторскую основу.

Современное профессиональное образование формирует основу и актуальную повестку всех инновационных подходов в исследованиях, ориентированных на развитие или модернизацию единого информационно-образовательного, научного и производственного пространства.

В связи с этим происходит существенная трансформация системы высшего профессионального образования, включая всю его многокомпонентную структуру. Основной задачей становится формирование новых компетенций, новых форм обучения, подготовка личности к жизни и возможности овладевать новыми специальностями и технологиями.

Как отмечают специалисты [1], необходимо формирование образовательной инновационной экосистемы для всех уровней образования. Именно инновационная образовательная среда способна обеспечить формирование инновационных компетенций; приобретение личного опыта участия в разработке, распространении и внедрении инноваций; расширение возможностей самообразования; интеграции научной и деловой активности в области инноваций; участие в практической реализации перспективных инновационных проектов [1].

Широкие перспективы для формирования инновационной образовательной среды предоставляет внедрение сетевых форм реализации образовательных программ.

Согласно Федеральному закону № 273-ФЗ [5] сетевая форма реализации образовательных программ обеспечивает возможность реализации образовательной программы с использованием ресурсов нескольких образовательных организаций, а также при необходимости с использованием ресурсов иных организаций.

В методических рекомендациях по применению сетевых форм реализации образовательных программ [2] показаны принципиальные отличия традиционной и сетевой модели, которые представлены на схеме (рис. 1).

Традиционная модель**Сетевая модель**

Рис. 1. Традиционная и сетевая модели реализации образовательных программ [2]

Сетевая форма реализации образовательных программ содержит огромный потенциал повышения качества и результативности кадрового обеспечения экономики в условиях ограниченности ресурсов и ужесточения требований к кадрам со стороны работодателей. Применение механизмов сетевого взаимодействия способствует решению проблемы дефицита ресурсов одной образовательной организации для удовлетворения (реализации) требований к качеству подготовки кадров и привлечению организаций-партнеров для совместной реализации образовательных программ.

В сетевой форме реализации образовательных программ могут принимать как несколько образовательных организаций, так и организации работодателей в части проведения производственной практики и (или) учебной практики, лабораторных, практических занятий. Формы и виды занятий определяются взаимодействующими организациями самостоятельно в рамках договора в соответствии с возможностями сторон и потребностями в обеспечении качественных условий реализации образовательной программы.

Сетевая форма обучения характеризуется прежде всего тем, что обеспечивает междисциплинарность образовательных программ подготовки кадров, обладающих уникальными компетенциями, для наукоемких отраслей и научных проектов, а также привлекает материальные и кадровые ресурсы образовательных и не образовательных партнерских организаций [3].

Основной задачей сетевого обучения является создание условий для интеграции образовательных, материальных, кадровых и научных ресурсов, обеспечивающих высокое качество образования по приоритетным направлениям развития и подготовки востребованных на рынке труда специалистов с уникальными компетенциями, а также тиражирование лучших практик для развития отраслевых прикладных исследований [3]:

Реализация образовательных программ в сетевой форме регламентируется в соответствии с нормативными документами [4]. Отдельно необходимо отметить, что «сетевая форма реализации образовательных программ обеспечивает возможность освоения обучающимся образовательной программы и (или) отдельных учебных предметов, курсов, дисциплин (модулей), практики, иных компонентов, предусмотренных образовательными программами (в том числе различных вида, уровня и (или) направленности) с использованием ресурсов нескольких организаций, осуществляющих образовательную деятельность, включая ино-

странные, а также при необходимости с использованием ресурсов иных организаций». Такие подходы позволяют обеспечить высококачественную междисциплинарную подготовку, используя механизмы «включенного обучения».

В Алтайском государственном университете на основании приказа Министерства науки и высшего образования РФ и Министерства просвещения РФ от 5 августа 2020 г. № 882/391 «Об организации и осуществлении образовательной деятельности при сетевой форме реализации образовательных программ» разработаны локальные нормативные акты, способствующие использованию сетевых возможностей для создания и реализации основных профессиональных образовательных программ.

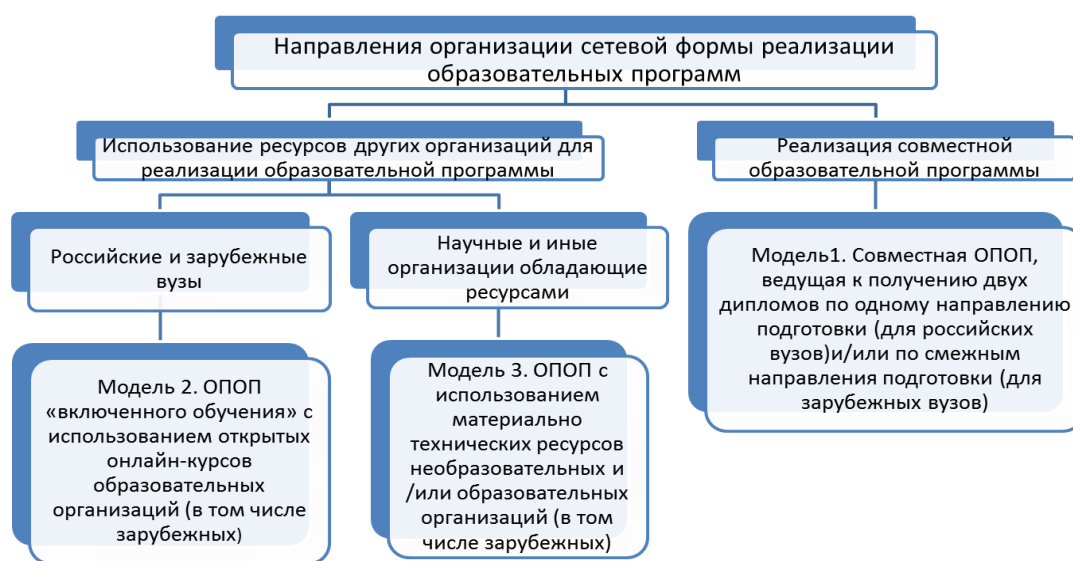


Рис. 2. Направления организации сетевой формы реализации образовательных программ

Модель «включенного обучения» позволяет создавать наиболее обширную образовательную сеть и использовать в образовательном процессе по образовательной программе лучшие практики реализации дисциплин в специализированных вузах.

Модель 2. ОПОП «включенного обучения» с использованием открытых онлайн-курсов образовательных организаций (в том числе зарубежных) предусматривает несколько вариантов реализации сетевой формы образовательной программы:

Вариант 1: ОПОП «включённого обучения» с использованием открытых онлайн-курсов образовательных организаций (в том числе зарубежных);

Вариант 2: ОПОП «включённого обучения» с использованием онлайн-курсов АлтГУ;

Вариант 3: ОПОП «включённого обучения» при освоении части основной профессиональной образовательной программы – отдельных учебных дисциплин / модулей, иных компонентов – в других образовательных организациях или в АлтГУ.

В настоящее время по образовательной программе направления подготовки 19.03.01 «Биотехнология» имеется опыт использования онлайн-курсов других образовательных организаций. Так, студенты данного направления подготовки на основании типового договора

с Федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС» изучали дисциплину «Метрология, стандартизация и сертификация» на портале «Открытое образование». Это способствовало формированию практического опыта использования основных статистических методов, применяемых для обработки результатов, использования в профессиональной деятельности понятий, терминов и определений в области метрологии.

Таким образом, использование механизмов сетевой реализации образовательных программ может обеспечить междисциплинарную подготовку на высоком уровне, объединить образовательные организации различной отраслевой направленности для повышения международной конкурентоспособности и востребованности будущих специалистов с широким спектром профессиональных и надпрофессиональных компетенций.

Библиографический список

1. Эффективные модели осуществления инновационной деятельности в системе образования : сборник материалов к межрегиональным семинарам, проведенных в рамках со-
провождения развития инновационной инфраструктуры в системе образования URL:
http://edu.sfu-kras.ru/sites/edu.sfu-kras.ru/files/sbornik_effektivnyx_modelej_osushhestvleniya_innovacionnoj_deyatelnosti.pdf
2. Агентство стратегических инициатив : методические рекомендации по применению сетевых форм реализации образовательных программ. URL:
https://asi.ru/upload/upload_docs/staffing/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B5%20%D1%80%D0%B5%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B4%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B8%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BF%D1%80%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%8E%20%D1%81%D0%B5%D1%82%D0%B5%D0%B2%D1%8B%D1%85%20%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%20%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%B8%20%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D0%BD%D1%8B%D1%85%20%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%BC.pdf
, (дата обращения: 14.10.2021).
3. Весна Е.Б., Гусева А.И. Модели взаимодействия организаций при сетевой форме реализации образовательных программ // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 6. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=10934> (дата обращения: 14.10.2021).
4. Приказ Министерства науки и высшего образования РФ и Министерства просвещения РФ от 5 августа 2020 г. № 882/391 «Об организации и осуществлении образовательной деятельности при сетевой форме реализации образовательных программ» Официальный интернет-портал правовой информации URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202009110027?index=4&rangeSize=1>, (дата обращения: 14.10.2021).
5. Федеральный закон от 29.12.2012 № 273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации».

УДК 37.022:37.032

ФОРМИРОВАНИЕ КРЕАТИВНЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ В ДОВУЗОВСКОМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ОБРАЗОВАНИИ

Т.В. Погребная, А.В. Козлов, О.В. Сидоркина

Сибирский федеральный университет, средняя школа № 82, Красноярск, Россия

В статье рассматриваются вопросы развития талантов учащихся школ в области научно-технического творчества и мотивации их к инновационно-проектной деятельности в области биотехнологий. Мотивация формируется через успешность в школьной проектной деятельности благодаря применению теории решения изобретательских задач (ТРИЗ). Овладение учащимися ТРИЗ осуществляется в интеграции с изучением различных предметов и в ходе проектной деятельности авторскими методами в инновационной образовательной технологии ТРИЗ-педагогика: методом изобретения знаний и методом инновационных проектов. Приводятся примеры уроков биологии методом изобретения знаний.

Ключевые слова: биотехнологии, развитие талантов, проектная деятельность, мотивация через успешность, ТРИЗ, ТРИЗ-педагогика, метод изобретения знаний, метод инновационных проектов.

Четвёртая технологическая революция, формирование шестого технологического уклада и Индустрии 4.0 связаны с NBIC-конвергенцией: объединением в различных производственных процессах нано-, био-, информационных и когнитивных технологий. Сфера применения биотехнологий расширяется. Одновременно расширяется и сфера применения когнитивных технологий, всё чаще они используются совместно.

В составе когнитивных технологий можно выделить два больших класса:

1. Технологии компьютерного моделирования ряда функций человеческого мозга.
2. Технологии усиления мышления и воображения самого человека (за счёт организации процесса мышления в соответствии с законами развития антропогенного и неантропогенного мира).

Первый класс когнитивных технологий используется чаще всего в готовых изделиях и процессах производства (классические примеры – распознавание текста компьютером, выбраковка пиломатериалов с помощью технического зрения и т.п.). Второй класс когнитивных технологий применяется в процессе проектирования новых изделий, производственных процессов и др., когда численная оптимизация изделия или процесса в рамках его прежней структуры уже не даёт существенного повышения эффективности, и требуется создание идеи новой структуры, т. е. объекта интеллектуальной собственности: изобретения, «ноу-хау» и т.п. Названные когнитивные технологии прошли серьёзный многовековой путь развития. С античных времён (Зенон Элейский, Гераклит, Сократ, Аристотель) до середины XX в. (А. Осборн, У Гордон, Э. де Боно и др.) это были дивергентные методы, т. е. методы мысленного «отхода» от стереотипных представлений без «прихода» к правильному представлению о структуре более эффективной системы. Из множества идей, создаваемых именно этими методами, лишь отдельные оказываются правильными. В середине XX в. в СССР Г.С. Альтшуллером [1] была создана теория решения изобретательских задач (ТРИЗ, TRIZ) [2], содержащая как дивергентную, так и конвергентную («сходящуюся» к правильной идее) составляющие. Эта конвергентная составляющая представляет собой продолжение науки о развитии диалектики, рассматривает всякое структурное усовершенствование любой тех-

нической и вообще антропогенной системы как преодоление накопившихся в ней противоречий развития и, в дополнение к классической диалектике, содержит инструментальные методы преодоления противоречий. С 1990-х гг. ТРИЗ стала распространяться в ведущих инновационных транснациональных корпорациях, преподаваться в ведущих мировых университетах.

Задачи инновационного развития России, достижения темпов экономического роста выше мировых требуют активного внедрения ТРИЗ в отечественной науке, промышленности, образовании. Практика немногочисленных пока педагогов, применяющих ТРИЗ, показывает, что её понятия и методы способны хорошо усваивать школьники, и не только старших классов. Поэтому начинать формировать у обучаемых ТРИЗовское мышление целесообразно со школьного возраста. Это позволяет обучаемым стать успешными в проектной деятельности и таким образом сформировать мотивацию к последующему продолжению инновационной деятельности в сфере, к которой относится созданный им в школе проект, к поступлению на соответствующие направления и специальности университетов.

Далеко не во всякой школе возможно ввести уроки или дополнительные занятия по ТРИЗ в силу перегруженности учебных планов и программ. Эта проблема стала стимулом для разработки инновационной образовательной технологии ТРИЗ-педагогика, интегрирующей изучение ТРИЗ с изучением других предметов и дисциплин [3]. В середине 80-х гг. XX в. был создан первый метод ТРИЗ-педагогика – метод творческих задач [4], состоящий в постановке учащимся таких задач, для решения которых требовалось одновременное знание соответствующих разделов предметов и ТРИЗ. Творческие задачи составлялись и по таким предметам или их темам, по которым обычных задач не было (например, по биологии задачи были только по разделу «генетика»). Для распространения ТРИЗ-педагогика на другие этапы учебного процесса авторами были разработаны метод изобретения знаний и метод инновационных проектов [5, 6].

Метод изобретения знаний [7] состоит в «переизобретении» приёмами ТРИЗ различных систем, изучаемых по программам различных предметов. Изучение нового материала начинается с постановки задачи по совершенствованию некоторой системы – предшественницы изучаемой системы, которая уже исчерпала ресурсы своего развития в рамках прежней структуры. При изучении технических систем учащиеся при помощи учителя ускоренно повторяют «интеллектуальный путь» изобретателей, впервые придумавших эти системы (например, самолёт, электродвигатель и др.), и понимают преимущества ТРИЗ по сравнению с предшествующими методами. Для применения метода изобретения знаний в естественно-научных предметах, где изучаются неантропогенные (природные: живые и неживые) системы, авторами проведена систематизация ранее высказываемых ТРИЗовцами мыслей (в том числе и в некоторых творческих задачах) о том, что законы, принципы, приёмы, стандарты ТРИЗ «работают» и в неантропогенном мире [7, 8], но реализуются не мышлением человека, а стихийно (поэтому и эволюция неживой и живой материи происходит многократно медленнее – миллионы и миллиарды лет). В результате этой систематизации разработан ряд примеров «переизобретения» различных биологических объектов: организмов, органов, популяций.

Рассмотрим пример: «Переизобретение» жабр у полухордовых и хордовых водных организмов:

Система-предшественница: поверхность тела у кишечнополостных (например, губок) выполняет в том числе функцию дыхания.

Противоречие развития: для повышения выживаемости необходимо быстро двигаться, перемещаться туда, где есть добыча. Губки же перемещаются медленно. Для повышения скорости необходимо потреблять, т. е. получать из воды больше кислорода, а поверхность их тела на это не способна.

Решение: Принцип ТРИЗ № 31 «Применение пористых материалов» и стандарт ТРИЗ 2.3.3. «Переход от сплошных веществ к капиллярно-пористым». У хордовых животных специализированные органы дыхания – жабры и легкие – имеют большую внутреннюю поверхность.

Пример: «Переизобретение» глаза с хрусталиком.

Система-предшественница: фасеточные глаза насекомых.

Противоречие развития: для повышения выживаемости необходимо более детально видеть окружающий мир. Но увеличение количества фасеток в глазах уменьшает эффективность каждой фасетки.

Решение: закон перехода на микроуровень. В хрусталике роль фасеток играют отдельные молекулы.

Метод инновационных проектов состоит в одновременном руководстве одним или небольшим количеством педагогов каждому до 10–15 инновационных проектов учащихся на основе ТРИЗ. При этом педагог, владеющий ТРИЗ, ставит учащимся вопросы в соответствии с алгоритмами ТРИЗ, а ответы на эти вопросы учащиеся получают у других учёных и специалистов, из литературы, из интернета. На основе ответов, полученных учащимися, специалист по ТРИЗ ставит следующие вопросы, и так далее до получения решения. Метод особенно эффективно работает на занятиях молодёжных интенсивных школ – «погружениях», куда приезжают учёные, он может применяться в удалённых и периферийных территориях, в том числе в сельских «точках роста», в мобильных кванториумах и др.

Одновременное применение в одной образовательной организации обоих названных методов повышает самостоятельность учащихся при использовании метода инновационных проектов и способствует успешному созданию проектов.

В процессе развития и апробации метода инновационных проектов, в том числе в летних и зимних молодёжных интенсивных школах в Красноярском крае, в ВДЦ «Орлёнок», «Океан» и др., учащимися созданы инновационные проекты, ставшие победителями и призёрами научных конференций и выставок школьников от муниципального до Федерального уровня, получены патенты на изобретения. В их числе проекты, связанные с биотехнологиями и посвящённые решению экологических проблем, соответствующих программам ЮНЕСКО по образованию в интересах устойчивого развития: нейтрализация вредных выбросов с помощью биохимических процессов при их смешении; утилизация «мусорных островов» в океанах (победа в конкурсе «ШУСТРИК» Ассоциации инновационных регионов России – АИРР и диплом второй степени на «Baby Farm» в программе «Startup Village» в Сколково) и др.

Применению метода инновационных проектов в довузовском биотехнологическом образовании может существенно способствовать разработка Фонда биологических эффектов, ведущаяся специалистами по ТРИЗ, дополняющего ранее созданные Фонды физических, химических, геометрических и других эффектов. Некоторые биологические эффекты рассмотрены, например, в книге В.И. Тимохова «Сборник творческих задач по биологии, экологии и ТРИЗ» [8].

Практика авторов и их коллег неоднократно показывала, что успешность в создании проектов по решению различных проблемных задач способствует профессиональной ориентации школьников на получение при приобретении высшего образования тех специальностей, которые соответствуют тематике созданных ими проектов.

Вместе с этим происходящая в сфере технологий NBIC-конвергенция находит своё выражение, в том числе в формировании в мире метапрофессии «Инноватор», который способен на основе ТРИЗ создавать инновационные решения в различных областях [9]. С одной стороны, способствуя ускорению процессов конвергенции, это может дополнить перечень технологических рынков, признанных Национальной технологической инициативой – НТИ: Аэронет, Автонет, Маринет, Нейронет, Хелснет, Фуднет, Энерджинет, Технет, Сэйфнет, Эдунет, Спортнет, Хоумнет рынком Бионет. С другой стороны, это может привести, по мнению авторов, к появлению «метарынка» технологий, подсистемами которого станут все вышеназванные и другие рынки, которые могут сложиться в перспективе. Применение в довузовском образовании системы ТРИЗ-педагогика, включающей вышеназванные методы, может способствовать подготовке будущих специалистов к работе на метарынке.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 16-16-24023/17-ОГОН

Библиографический список

1. Официальный фонд Г.С. Альтшуллера. URL: <http://www.altshuller.ru>.
2. Альтшуллер Г. С. Найти идею. М., 2015. 404 с.
3. Гин А.А. ТРИЗ-педагогика. Учим креативно мыслить. М., 2018. 96 с.
4. Гин А.А., Андржеевская И.Ю. 150 творческих задач о том, что нас окружает. М., 2014. 216 с.
5. Погребная Т.В., Козлов А.В., Сидоркина О.В. Методы изобретения знаний и инновационных проектов на основе ТРИЗ. Красноярск, 2010. 180 с.
6. Pogrebnaya T.V., Kozlov A.V., Kuimov V.V., Sidorkina O.V. Innovative Projects Method Application in Engineering Education // Proceedings of 2017 7th World Engineering Education Forum (WEEF), 13-16 November 2017. Kuala Lumpur. Malaysia. P. 574–579.
7. Pogrebnaya T.V., Kozlov A.V., Sidorkina O.V. Invention of Knowledge in TRIZ-based Education // IEEE conference publications. Global Engineering Education Conference (EDUCON). Berlin. 2013. P. 959–964.
8. Тимохов В.И. Сборник творческих задач по биологии, экологии и ТРИЗ. СПб., 1996.
9. Погребная Т.В., Сидоркина О.В., Козлов А.В. Метапрофессия «Инноватор» и практики мышления // Кружковое движение : онлайн-журнал. URL: <https://journal.kruzhok.org/tpost/73ecaf2jz1-metaprofessiya-innovator-i-praktiki-mish>.

УДК 004.5:663.11

ТЕХНОЛОГИИ VR ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ НОВЫХ КОМПЕТЕНЦИЙ БИОТЕХНОЛОГОВ

И.Ю. Сергеева¹, Р.М. Котов¹, В.И. Игнатенко²

¹ Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

² Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Россия

В основе обучения с применением виртуальной реальности лежат иммерсивные технологии – виртуальное расширение реальности, позволяющее лучше воспринимать и понимать окружающую действительность. Несмотря на все очевидные преимущества технологии виртуальной и дополненной реальности все еще не имеют характера массовости. В настоящем исследовании целью служило изучение качественных результатов влияния VR-технологий на формирование новых компетенций при подготовке биотехнологов. В работе использовался онлайн-опрос, зарегистрированный в веб-панели, методом анкетирования с фиксацией и обработкой результатов серверной программой. В качестве респондентов были приглашены к анкетированию по ссылке на онлайн анкету студенты, обучающиеся по направлению подготовки УГН 19.00.00 уровня бакалавриата и магистратуры. Вопросы концентрировались по трем блокам: общие сведения о респонденте, степень осведомленности респондента в исследуемой области, сбор информации по цели исследования. Третий блок вопросов подразумевал наличие нескольких вариантов ответов или развернутый ответ. Полученные результаты позволили сформулировать новые практико-ориентированные навыки и умения: стрессоустойчивость в производственных условиях, пространственное мышление, моделирование сложных биотехнологических процессов, генерация идей и технических решений без привязки к месту и времени, развитие коллективного мышления и командной работы.

Ключевые слова: образование, компетенции, виртуальная реальность, VR-технологии, цифровизация, биотехнологии.

Еще 30 лет назад все дети играли в металлические модели автомобилей, и на занятиях в университете собирали с преподавателями макеты технологических установок. Позже, уже взрослыми специалистами, они разрабатывали большие макеты технологических установок, макеты автомобилей, самолетов, двигателей. В лабораториях стояли (и стоят еще) учебные двигатели и натурные модели. После этого следующие поколения смотрели, делали и показывали друг другу видео, анимированный контент, инфографику. Будущее поколение, те, кто будет поступать в университет и позже работать на производстве, играют и мыслят в 3D-виртуальной реальности – 3D-игры, игры песочницы, виртуальные игры, 3D-пространства. Появление технологии виртуальной реальности отмечается во второй половине XX в. [2]. По мнению некоторых экспертов [2, 9], отдельные элементы виртуальной реальности описаны учеными и философами задолго до этого. Собственно, термин «виртуальная реальность» получил распространение в середине 1980-х гг. Американский ученый Д. Ланье впервые ввел данный термин в области биометрических технологий [2,9].

Точкой развития VR-технологий можно считать появление и интенсивное развитие рынка мобильных устройств. Рост вычислительной мощности, цифровая модификация способствовали быстрому выведению виртуальной реальности на новый уровень, выходя уже за рамки геймификации. Сегодня VR-технологии открыли новые технологические возможности в профессиональном обучении, существенно расширив спектр внедрения виртуальной и дополненной реальности в программных продуктах для специалистов в инженерных отраслях [1, 2]. Развитие цифровой инфраструктуры образования способствует трансформации

традиционного подхода в ориентированный на результат персонализированной организации образовательного процесса [7].

В основе обучения с применением виртуальной реальности лежат иммерсивные технологии – виртуальное расширение реальности, позволяющее лучше воспринимать и понимать окружающую действительность. Следовательно, они в буквальном смысле погружают человека в заданную событийную среду. Ю.В. Корнилов [4] в своей работе предпринял попытки систематизировать и обобщить исследования в области применения понятия иммерсивного подхода в образовании. Автор утверждает, что принцип наглядности, расширения и дополнения технических возможностей связывает иммерсивный подход в обучении с другими подходами, такими как деятельностный, контекстный, информационный [4]. Так, интерактивное виртуальное прототипирование открывает колоссальные возможности для развития инженерного и архитектурного проектирования [3, 10], креативной индустрии [6] для обеспечения безопасности и исключения рисков в образовании химического профиля [8], даже в звуковой области для усиления ощущения эффекта «присутствия» [5].

Несмотря на все очевидные преимущества технологии виртуальной и дополненной реальности все еще не имеют характера массовости. И это связано с несколькими причинами. Высокая стоимость оборудования и программного обеспечения носит временной характер. Но крупные корпорации заинтересованы в массовизации своих продуктов, что неизбежно повлечет снижение стоимостного уровня.

Помимо материальных препятствий, имеет место еще и физиологическая особенность разной адаптации человека при использовании специфического оборудования. Однако и данную проблему также возможно решить в ближайшем будущем за счет комплексных научных исследований в области индивидуальных особенностей организма и путей нивелирования негативных последствий.

В настоящем исследовании целью служило изучение качественных результатов влияния VR-технологий на формирование новых компетенций при подготовке биотехнологов. В работе использовался онлайн-опрос, зарегистрированного в веб-панели, методом анкетирования с фиксацией и обработкой результатов серверной программой.

В качестве респондентов были приглашены к анкетированию по ссылке на онлайн-анкету студенты, обучающиеся по направлению подготовки УГН 19.00.00 уровня бакалавриата и магистратуры. Вопросы концентрировались по трем блокам: общие сведения о респонденте, степень осведомленности респондента в исследуемой области, сбор информации по цели исследования. Третий блок вопросов подразумевал наличие нескольких вариантов ответов или развернутый ответ. Количество респондентов составило 148 человек, принявших приглашение.

По гендерному различию выборка состояла из 68,7 % женщин, 31,3 % мужчин. Активное участие в опросе приняли студенты первого курса бакалавриата (60,4 % от общего количества респондентов), второго курса магистратуры (25,0 % от общего количества респондентов) и первого курса магистратуры (10,4 % от общего количества респондентов).

Более 85 % опрошенных отметили потенциал в применении технологий виртуальной и дополненной реальности в образовательном процессе в сторону положительного эффекта использования, а 81,3% – важность иммерсивного обучения для профессиональной деятельности. При этом только половина опрошенных (50,0%) имела опыт в использовании виртуальной реальности вне учебной деятельности (более одного раза).

В аспекте описательного контента отношения к технологиям виртуальной и дополненной реальности, наиболее часто встречаемые ответы характеризовали как их «полезный», «необходимый», «меняющий представление», «захватывающий», «эффективный», «результативный», «интересный» и «имеющий потенциал» (рис. 1).

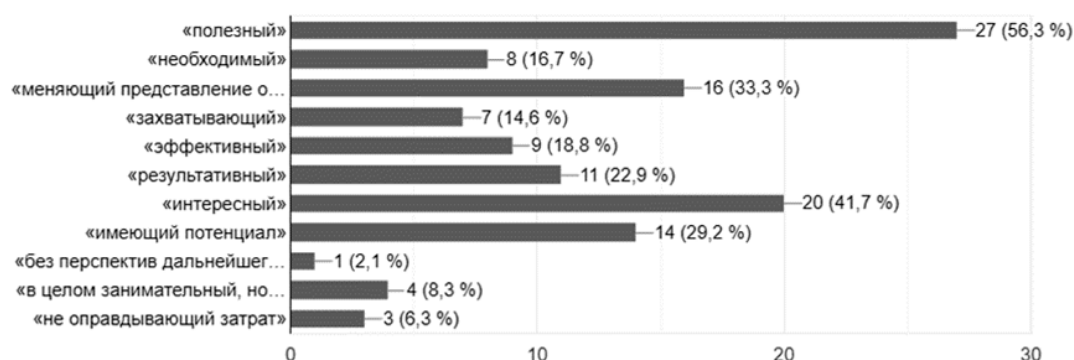


Рис. 1. Описательное отношение респондентов к VR-технологиям

Однако 18,8% респондентов считают, что современное образование готово к внедрению технологий виртуальной и дополненной реальности уже сейчас. Более половины опрошенных студентов (58,3 %) считают, что вузы будут готовы к внедрению иммерсивных технологий в образовательный процесс в ближайшем временном горизонте (ближайшие пять лет). При этом на вопрос «Что ожидает рынок технологий дополненной и виртуальной реальности в образовании в ближайшие 5 лет?» эта же группа студентов ответила с утверждением о росте, бурном развитии, увеличении доли рынка медийных технологий.

Не многим менее четверти студентов (22,9 %) высказали прагматичное мнение о том, что массовое обучение с использованием VR-технологий в высшем образовании возможно только в дальнем временном горизонте (более пяти лет). Наиболее часто при ответе на вопрос «Что ожидает рынок технологий дополненной и виртуальной реальности в образовании в ближайшие 5 лет?» эта группа студентов отметила пассивный рост, «...цены будут расти по мере спроса на продукт, но если он не будет востребован потребителями – спрос уменьшится, а финансовые вложения пропадут».

На сегодняшний момент VR-технологии представляют собой как дополнение к существующему образовательному процессу и полный переход к иммерсивному образованию не нужно форсировать во избежание негативных последствий перехода. Кроме того, стандартизированное методическое обеспечение учебного процесса необходимо согласовать с тенденциями к цифровизации образования. Необходимо учитывать тот факт, что для обеспечения внедрения виртуальных технологий нужны специалисты в этой области, которых еще нужно подготовить.

В ряде факторов, по мнению респондентов, препятствующих в настоящее время распространению VR-технологий в образовании, доминирующим является высокая стоимость внедрения и эксплуатации таких технологий (рис. 2).

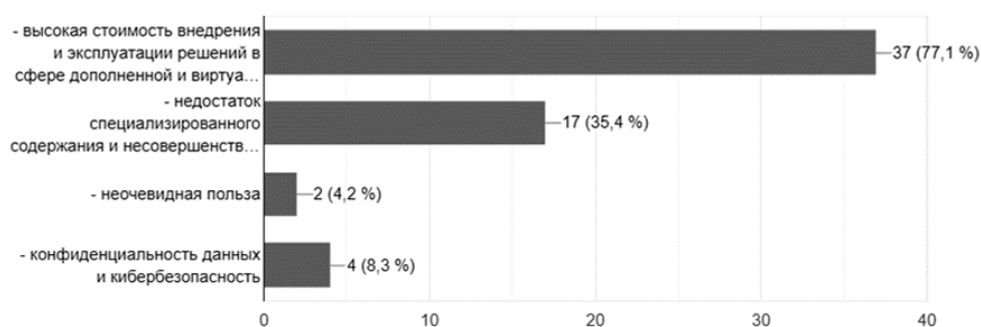


Рис. 2. Факторы, влияющие на распространение технологий виртуальной и дополненной реальности

Эта проблема решается уже сейчас. На рынке появляются более доступные по цене устройства, что позволяет виртуальным технологиям активнее внедряться в нашу привычную жизнь [11].

Наибольший интерес вызвали развернутые ответы респондентов на вопросы последнего блока. Студенты, помимо очевидных преимуществ результатов применения иммерсивного обучения, акцентировали и транслировали свое видение на будущую профессиональную деятельность. Так, например, часто звучали ответы «Повышает стрессоустойчивость в производственных условиях уже на практике», «Способствует развитию навыков решения аварийных ситуаций на предприятии», «Наглядно демонстрирует примеры выполнения работ в профессиональной деятельности», «Развивает образное мышление», «Помогает без рисков пройти лабораторное обучение», «Лучшее формирование образа сложного промышленного оборудования», «Новый уровень коммуникации с одноклассниками и преподавателем», «Лучшее понимание сложных биотехнологических процессов».

Формирование новых компетенций студентов будет способствовать и прогрессу в развитии самого вуза, повышению научно-образовательного потенциала и его аппликации на новый уровень взаимодействия с бизнес-партнерами. Например, бизнес-партнерам в качестве результатов НИОКР отдаем VR модель (цифрового двойника) технологического процесса, цеха, оборудования, готового продукта. Важная часть решения проблемы – это формирование VR продуктов в коммуникации коллективов студентов и преподавателей, а также экспертов из отрасли.

Меняется концепция образования: сегодня образованием станет выполнение все более усложняющихся и все более реальных проектов по организации биотехнологий. С точки зрения организации образовательного процесса. Собственно, биотехнологическое производство все же находится на удалении от университета и жилого сектора. Чтобы показать студентам применение теории на практике, надо поехать в цех. Доступ в цех получить также сложно. А для цехов, связанных со сложными биотехнологическими процессами (микроорганизмами и ферментами) современного производства, вообще невозможно получить разрешение на доступ, невозможно показать студентам, и соответственно, работать над проектом совместно со студентами. Цифровой двойник VR не просто позволит изучить функционал технологического оборудования, но и экспериментировать, менять характеристики в реальном времени. Процессы биоконверсии пищевого сырья подвергаются моделированию – и виртуальному, и математическому. Инженерам нужно тренироваться на моделях – для проведения численных экспериментов, поиска альтернатив и причин поломки или сбоя течения процесса, отработки технологических цепочек, обучения операторов полученной технологической цепочки.

Использование виртуальных моделей производства, постепенно формируемых и шаг за шагом все более детализированных командами преподавателей, научных работников, студентов и работников отрасли позволят:

- 1) использовать коллективный мыслительный процесс;
- 2) генерировать идеи без привязки к месту и ко времени;
- 3) загруженным научным работникам не выезжать на предприятия для разбора ситуации;
- 4) взаимодействовать с коллегами для достижения максимально эффективного процесса;
- 5) применять модели для образовательного процесса без физического доступа на производство и выезда за пределы города;
- 6) предлагать решения и проекты реальному бизнесу.

Именно для биотехнологической отрасли это крайне эффективный и перспективный процесс:

- а) цифровой двойник VR дешевле, чем реальное производственное оборудование, но достаточно точно моделирует технологический процесс;
- б) работа с технологическим оборудованием требует постоянных тренировок для решения нестандартных ситуаций (например, аналогия с пилотами истребителей, которые занимаются на виртуальных тренажерах, так как реальное оборудование гораздо дороже);
- с) использование цифрового двойника позволяет моделировать процессы и использование нового сырья, а значит, повышать надежность процесса и увеличивать ресурсосбережение, ведь необратимая порча сырья при нарушении технологического процесса – это серьезный удар по экономике предприятия.

Таким образом, применение технологий виртуальной и дополненной реальности позволяет осуществить эффективный трансфер образовательного контента в новые практико-ориентированные навыки и умения: стрессоустойчивость в производственных условиях, пространственное мышление, моделирование сложных биотехнологических процессов, генерация идей и технических решений без привязки к месту и времени, развитие коллективного мышления и командной работы.

Библиографический список

1. Дресвянников В.А. Виртуальная реальность как средство проникновения идеальной природы в материальную и социальную // Вопросы инновационной экономики. 2015. Т. 5, № 3. С. 127–140.
2. Иванова А.В. Технологии виртуальной и дополненной реальности: возможности и препятствия применения // Стратегические решения и риск-менеджмент. 2018. № 3. С. 88–107.
3. Колесников А.А., Кикин П.М., Комиссарова Е.В. Создание виртуальных моделей местности и зданий // Интерэкспо Гео-Сибирь. 2016. № 7. С. 45–49.
4. Корнилов Ю. В. Иммерсивный подход в образовании // Азимут научных исследований: педагогика и психология. 2019. Т. 8, № 1. С. 174–178.
5. Краснокулов А.В. Музыка и дополненная реальность: на пути к будущему // Южно-Российский музыкальный альманах. 2018. № 4. С. 80–86.
6. Маслов Е. А., Хаминова А. А. Внедрение современных технологий виртуальной и дополненной реальности в креативные индустрии: тенденции и проблемы // Гуманитарная информатика. 2016. № 10. С. 35–46.
7. Уваров А.Ю. Технологии виртуальной реальности в образовании // Наука и школа. 2018. № 4. С. 108–117.
8. Хасанова Г.Ф. Виртуальная реальность в инженерном образовании химического профиля // Казанский педагогический журнал. 2019. № 1. С. 43–49.
9. Черный Ю.Ю. Философские основания технологий виртуальной и дополненной реальности // Системный анализ в проектировании и управлении. 2019. Т. XXIII, № 1. С. 219–229.
10. Чистяков А.В. Интерактивное виртуальное прототипирование в архитектурном проектировании // Вестник ЮУрГУ. 2017. Т. 17, № 4. С. 74–78.
11. Шевченко Г.И., Кочкин Д.А. Основные характеристики очков виртуальной реальности и перспективы их использования в учебном процессе // Преподаватель XXI века. 2018. № 4. С. 160–168.

УДК 378.14.015.62

ПРОЕКТЫ И СТАРТАПЫ КАК ОСНОВОПОЛАГАЮЩИЕ КОМПОНЕНТЫ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ ПОДГОТОВКИ БИОТЕХНОЛОГОВ

Л.В. Щербакова

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

В статье представлен опыт современной системы подготовки биотехнологических кадров и планируемые пути развития направления подготовки 19.03.01 «Биотехнология» Института химии и химико-фармацевтических технологий АлтГУ. Показана практико-ориентированная направленность подготовки бакалавров биотехнологов через реализацию практических проектов и стартапов как основополагающих компонентов образовательной программы.

Ключевые слова: биотехнология, стартапы, образовательная программа, высшее образование, практико-ориентированная подготовка.

Структура подготовки квалифицированных кадров по биотехнологии (19.00.00 «Промышленная экология и биотехнологии») в Алтайском крае в настоящее время ведется в Алтайском государственном университете (Институт химии и химико-фармацевтических технологий и Институт биологии и биотехнологии); Алтайском государственном техническом университете им. И.И. Ползунова (Институт биотехнологии, пищевой и химической инженерии), Бийском технологическом институте (филиале); Алтайском государственном аграрном университете.

Подготовка специалистов в данной области в Алтайском крае полностью отражает определение понятия «Биотехнология», которые включают три основных направления: биомедицину, промышленные биотехнологии и агробиотехнологии.

В *биомедицинском* направлении можно выделить разработку новых фармацевтических препаратов, вакцин, молекулярную диагностику, клеточные технологии. *Промышленные биотехнологии* включают в себя промышленные процессы с использованием биологических реакторов, микробную переработку отходов, а также производство биотоплива, биodeградируемых полимеров. В сельском хозяйстве применяются технологии ремедиации почв, повышения устойчивости и урожайности растений, геномные технологии в племенном хозяйстве [1].

10 августа 2021 г. утвержден новый ФГОС ВО по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология» [2], реализуемой Институтом химии и химико-фармацевтических технологий. Профиль подготовки – «Продуцирование биологически активных веществ методами биотехнологии» – соответствует ключевым направлениям «Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» [3], которая придала вектор развития науки и образования в области биотехнологий:

- разработка и модификация образовательных стандартов и программ в секторе биотехнологий;
- развитие научно-технологической базы в учреждениях образования;
- создание непрерывной системы повышения квалификации и переподготовки биотехнологических кадров;

- увеличение финансирования исследований в области наук о жизни;
- разработка стратегических программ исследований по предметным областям биотехнологии.

Отличием нового образовательного стандарта является практико-ориентированный подход в подготовке специалистов, востребованных на рынке труда. Полученные знания и навыки в значительной степени позволят выйти молодому специалисту на высокий профессиональный уровень. А может быть, что через пять-шесть лет и компетенции специалистов по биотехнологии могут быть «совсем другими», поэтому очень важно держать связь с работодателями, вовлекать в образовательный процесс бизнес и быть ближе к производству.

Бизнес, со своей стороны, также все больше вовлекается в научно-образовательный процесс. Этому способствует в первую очередь появление биотехнологических кластеров. Так, в Алтайском крае создан Алтайский биофармацевтический кластер, на базе Алтайского госуниверситета – инжиниринговый центр «Промбиотех».

В русле современных требований «практичности» образования в 2014 г. на базе химического факультета АлтГУ было открыто направление подготовки 19.03.01 «Биотехнология» квалификации бакалавр. Образовательная программа направления подготовки сочетает в себе фундаментальную подготовку, ориентированную на осуществление практической научно-исследовательской деятельности, и прикладной технической подготовки, направленной на осуществление пилотных и крупномасштабных биотехнологических процессов. Но без участия в этой работе потенциальных работодателей, представителей академического сообщества и бизнеса она не может быть решена.

В настоящей работе рассмотрены основные этапы формирования современной системы биотехнологического образования Алтайского края на примере опыта Института химии и химико-фармацевтических технологий Алтайского государственного университета.

Результаты и их обсуждение. Перефразируя известное высказывание М.В. Ломоносова о том, что «университет без гимназии – что пашня без семян», можно сказать, что «университет без ШКОЛЫ – что пашня без семян».

Поскольку «семена для пашни» готовятся в школе, университету важно взаимодействовать со школой как можно более широко и активно. Такое взаимодействие должно способствовать формированию системы непрерывного образования по линии – «Школа-вуз», обнаруживать талант, дать ему раскрыться, готовить творческих и целеустремленных, любознательных молодых людей, тем самым совершенствовать методики отбора абитуриентов и формирования контингента студентов Университета.

В институте химии и химико-фармацевтических технологий подготовка специалистов в области биотехнологии начинается со школы, с воспитания «своих» абитуриентов.

С 2020 г. в Алтайском государственном университете реализуется федеральный проект – ключевой центр дополнительного образования «Дом научной коллаборации» (ДНК). Это новая модель партнёрства университета и школ Алтайского края, которая позволит эффективно использовать имеющийся потенциал вуза для развития компетенций у школьников и педагогов [4].

Целью создания центра дополнительного образования является обеспечение доступности и качества дополнительного образования детей, молодежи, педагогов в Алтайском крае, путем реализации востребованных дополнительных образовательных программ и подготовки кадров для развития современных компетенций; использование сетевой формы взаимо-

действия с образовательными организациями региона при создании условий для непрерывного образования.

Центр дополнительного образования детей имеет несколько направлений развития: «Детский университет», «Малая академия», «Урок-химия» и др. Институтом химии и химико-фармацевтических технологий в рамках работы Центра предложен проект «Планета трех наук».

Основное направление его деятельности – поиск, выявление и психолого-педагогическая поддержка интеллектуально одаренных детей, создание благоприятных условий для наиболее раннего профессионального самоопределения учащихся. Структура, основное содержание и цели проекта представлены в таблице 1.

Таблица 1

Структура проекта «Планета трех наук»

Дополнительная об- щеразвивающая про- грамма	«Детский университет» для учащихся 5–9 классов	«Малая академия» для учащихся 10–11 классов и студентов СПО
Название	«Планета трех наук»	
Основная идея	комплексное сочетание каждого занятия на междисциплинарных знаниях – «химия – биология – экология», «химия – биология – физика», «химия – физика – математика» и т.д.	
Название подпроекта	«Химическая и биологиче- ская защита растений»	«Переработка отходов расти- тельного происхождения (сос- на, шишка, лен и др.)»
Проблематика	Технологии биостимуляторов роста растений: применение биопрепаратов и экологически безвредных регулято- ров роста, которые позволяют увеличить урожайность путем сти- мулирования развития и повышения устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессорам, ускоряют прорастание и укоренение.	
Обоснование потреб- ностей	– Ознакомление школьников с проблемой применения росто- регулирующих биопрепаратов, ускоряющих прорастание и укоренение сельскохозяй- ственных растений. – Создание в представлении учащихся общей картины мира с его единством и многообра- зием свойств неживой и живой природы.	– Ознакомление школьников с основными тенденциями полу- чения, разработки и применения росторегулирующих биопрепа- ратов, ускоряющих прорастание и укоренение сельскохозяй- ственных растений. – Установление межпредметных связей между химией, биологи- ей, математикой, экологией, да- ющее больше возможности для дальнейшего самоопределения личности.

Формами подведения итогов реализации проекта «Планета трех наук» являются:

1. Презентации и защиты результатов выполнения кейсов, представленных в программе (дискуссии, выставки творческих работ, участие в конкурсах, открытые занятия для родителей и др.).

2. Итоговым «продуктом» проекта – конкурс «Турнир трех наук», который базируется на преимущественности при переходе от одной ступени образования – «Детский Университет», ко второй – «Малая Академия» и далее на уровень вуза. В течение трех дней конкурсанты решают заявленную практическую проблему (интеллектуальный «мозговой штурм»), финалом которой является публичная защита разработанных проектов.

3. Разработка, реализация и защита научно-исследовательской (проектной) работы на Открытой научно-практической конференции школьников Барнаула, секция «Химия вокруг нас».

Опыт создания и реализации довузовских проектных работ позволяет студентам придя в вуз быстрее адаптироваться к новой системе получения умений и навыков, влиться в команды по созданию и продвижению технологических проектов ранних стадий, в том числе стартапов на базе учреждений высшего образования.

Стартапы для Российской Федерации относительно новая технология проектной работы по внедрению инноваций и развитию студенческого предпринимательства [5], которая в вузе реализуется через программу «Стартап как диплом».

В настоящее время в Алтайском государственном университете разрабатывается «Положение о выпускной квалификационной работе, выполняемой в виде стартапа, по образовательным программам высшего и среднего профессионального образования». Данная программа – новая тема для университета, в котором студенты и многие преподаватели привыкли к защите дипломов в классическом университетском формате. Она находится только на стадии внедрения, но может стать основой для вовлечения талантливых студентов в развитие экосистемы технологического предпринимательства, а также для поддержки бизнеса, находящегося на начальной стадии. Разработка и реализация программы обучения абитуриентов и преподавателей университетов в подготовке стартапов в качестве ВКР позволит перейти от теоретической разработки биологически активных веществ методами биотехнологии к внедрению их в производство и вывод целевого продукта на рынок.

Выпускная квалификационная работа может представлять собой как реально существующий бизнес-проект, созданный одним студентом или командой (с юридическими лицами и сформированной командой), так и быть на стадии идеи. Главное, такая работа должна демонстрировать уровень подготовки выпускника к самостоятельной профессиональной деятельности.

Стать участниками программы «Стартап как диплом» может студент любого направления подготовки, специальности и уровня образования. Главное условие – соответствие роли в команде стартапа и функциональных обязанностей студента, подтверждающих освоение компетенций, установленных ФГОС ВО или ОС ВО.

Программа «Стартап как диплом» может быть интересной и полезной не только для студентов-старшекурсников, но и для студентов 2–3 курсов направления подготовки 19.03.01 «Биотехнология». Пройдя путь разработки и защиты Проекта в ДНК, им легче реализовать студенческие проекты. Если студент выбирает магистратуру – это осознанное решение, связанное с его специальностью. Затем молодой человек получает возможность выбрать наибо-

лее эффективный для себя формат – это шанс создать и развить свою высокотехнологичную компанию. Следующая задача будущего предпринимателя – собрать команду, которая будет увлечена его идеей. Научный руководитель может дать очень ценные советы в научно-технической сфере, например, подсказать, как улучшить технологию.

Схема (рис.) формирования профессиональных компетенции «от школы к созданию собственной высокотехнологичной компании» позволит подготовить высококвалифицированных специалистов-биотехнологов, и при этом развивать новые научные направления в области биотехнологии на мировом уровне.

Это сложная задача! Но для молодых, талантливых и амбициозных студентов, имеющих технические и коммерческие способности, она решаема.



Рис. 1. Схема подготовки специалистов в области биотехнологии

Заключение. Институт химии и химико-фармацевтических стоит на этапе создания новой системы довузовской и вузовской подготовки квалифицированных биотехнологических кадров, имеющей практико-ориентированную направленность подготовки бакалавров биотехнологов через реализацию практических проектов и стартапов, как основополагающих компонентов образовательной программы.

Библиографический список

1. Обзор рынка биотехнологий в России и оценка перспектив его развития. URL: <file:///C:/Users/User/Downloads/20141020-russia-biotechnology-market-fin.pdf>.
2. Портал Федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования. URL: <http://fgosvo.ru/fgosvo/151/150/24/19>.
3. Информационная справочная система КонсультантПлюс. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_130043/.
4. Официальный сайт Алтайского государственного университета: школьникам. URL: <http://school.asu.ru/scholar/obr/dnk/>.
5. Официальный сайт Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. URL: https://minobrnauki.gov.ru/press-center/news/?ELEMENT_ID=25900.

БИОФАРМАЦЕВТИКА И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА: ВЫЗОВЫ СОВРЕМЕННОСТИ И ОСНОВНЫЕ ТРЕНДЫ

УДК 577.1: 547.91: 547.973: 547.94: 615.281

ПОИСК НОВЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ОРИГИНАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

С.М. Адекенов

*Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»,
Караганда, Республика Казахстан*

Применение растительных метаболитов в создании противовирусных препаратов является активно развивающимся научным направлением. В статье анализируются перспективы поиска новых веществ из растительного сырья, обладающих противовирусной активностью.

Ключевые слова: противовирусные препараты, растительное сырье, терпеноиды, алкалоиды, флавоноиды.

Арсенал лекарственных средств, применяемых для лечения вирусной инфекции, охватывает практически все возможные способы влияния на инфекционный процесс и включает в себя средства иммунокорректирующей, патогенетической, симптоматической терапии, вирулицидные препараты. Однако ведущее место принадлежит химиопрепаратам этиотропного действия, оказывающим непосредственное прямое воздействие на репродукцию вируса и направленным на определенную вируспецифическую мишень в ее цикле.

На сегодняшний день существует множество противовирусных препаратов с разным механизмом действия. Основными направлениями поиска противовирусных средств является синтез молекул соединений с антивирусным действием, выделение индивидуальных компонентов или суммы веществ из природного сырья, молекулярный дизайн и анализ взаимосвязи «структура-активность».

Признанными противовирусными препаратами являются Амантадин и его аналог Ремантадин (производные адамантана), ингибиторы вирусной нейраминидазы – Тамифлю (озельтамивир) и Реленза (занамивир), Рапиакта (перамивир) и Инавир (ланинамивир) [1].

Недостатками производных адамантана является узкий спектр действия, поскольку они активны против вирусов гриппа А, но не в отношении гриппа В. Нейраминидазные ингибиторы приводят к многочисленным побочным эффектам, таким как аллергические реакции, осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта, тошнота, а также неврологические расстройства.

Быстрое приобретение лекарственной устойчивости в отношении этиотропных препаратов, имеющих узконаправленное действие на какую-либо конкретную молекулярную мишень в цикле размножения вируса, является основанием для поиска соединений, направленных не на вирус как таковой или его взаимодействие с клеткой, а стимулирующих клеточную резистентность, выработку интерферонов, иммунную защиту. Вследствие этого остается актуальным использование неспецифических средств против вирусных инфекций, включая фитопрепараты.

Применение растительных метаболитов в создании противовирусных препаратов является активно развивающимся научным направлением. Низкая токсичность, высокая биологическая активность природных соединений растительного происхождения дают возможность для создания новых противовирусных средств.

В связи с нынешним широким и быстрым распространением COVID-19 разработка противовирусных препаратов – основная и глобальная задача, особенно на фоне постоянной и быстро формирующей мутации коронавируса (китайский, британский более 192 штаммов, южноафриканский около 21 штамма, индийский).

Эффективные вируспецифические лекарственные средства для терапии и профилактики COVID-19 пока не разработаны. Поэтому для лечения COVID-19 в основном используют симптоматическую лекарственную терапию, направленную на облегчение состояния больного. Также предпринимаются попытки использовать антивирусную терапию лекарственными средствами, ранее разработанными для лечения других инфекций (ремдесивир, фавипиравир, лопинавир, гидроксихлорохин и др.). Но эти препараты оказались малоэффективными или неэффективными для лечения COVID-19, особенно у тяжелых больных. Таким образом, ассортимент имеющихся в настоящее время лекарственных средств для борьбы COVID-19 и гриппом весьма ограничен. Практически все они обладают недостатками, в первую очередь слабой эффективностью в отношении современных штаммов вируса гриппа и коронавирусов. Отсутствие специфических и эффективных антивирусных препаратов для лечения COVID-19 и гриппа снижает шансы на выживание у пациентов, особенно с тяжелой формой заболевания.

Коронавирус проникает в организм человека через ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), который является основным рецептором клеток, связывающийся с шиповидным S-белком вируса. При тяжелом течении COVID-19 высока вероятность образования «цитокинового шторма», сопровождающегося лавинообразным нарастанием маркеров воспаления с повреждением легких и летальным исходом пациентов. Лечение пациентов с COVID-19 должно быть основано на подавлении чрезмерного цитокинового шторма. При комплексной терапии у пациентов с тяжелым течением COVID-19 в настоящее время исследуется полипептидный препарат Лаеннек, в составе которого содержится гидролизат плаценты человека [2]. В клинике проходит внедрение новое противовоспалительное средство Лейтрагин, разработанный на основе аминокислот, который используется для ингибирования «цитокинового шторма» [3].

Активация оксида азота в организме считается одним из способов профилактики коронавирусной инфекции, поэтому разработка спреев и аэрозолей на основе горьких растительных веществ, которые генерируют оксид азота, считается одним из перспективных направлений [4].

Особый интерес представляют противовирусные препараты, атакующие папаин-подобную протеазу MERS-CoV, ингибирующие репликасу, синтез вирусной РНК.

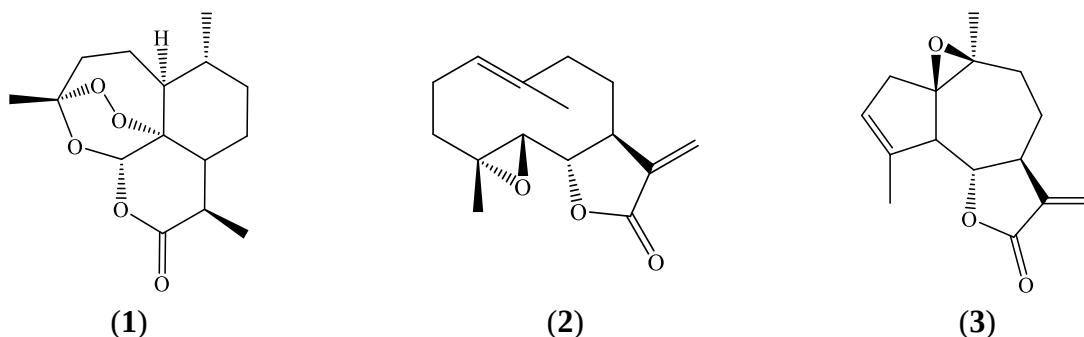
Перспективным направлением для разработки новых противовирусных препаратов является поиск и изучение биологически активных соединений растительного происхождения, обладающих способностью блокировать различные стадии репродукции вируса, так как по отношению к биологически активным природным соединениям реже наблюдается возникновение лекарственной устойчивости.

Одной из мишеней воздействия на репродукцию вирусов гриппа и коронавирусов является стадия прикрепления вируса к клетке. Интересной группой природных соединений, способных блокировать адсорбцию вирусов, являются терпеноиды, которые в силу своих структурных особенностей, связываясь с холестерином мембраны, способны изменять пространственную структуру мембраны клетки и вируса [5].

Природные сесквитерпеновые γ -лактоны обладают ингибирующей активностью в отношении вирусов гриппа H3N2, H5N3 и H1N1, что связано с наличием α -метилен- γ -лактонного цикла. Сесквитерпеновые лактоны с α -метилен- γ -лактонной функцией проявляют цитотоксическую, противовирусную, антимикробную и противоопухолевую активность. Экзометиленовая группа, конъюгированная с карбонильной группой, в лактонном цикле взаимодействует с активными центрами ферментов, ингибируя деление клеток.

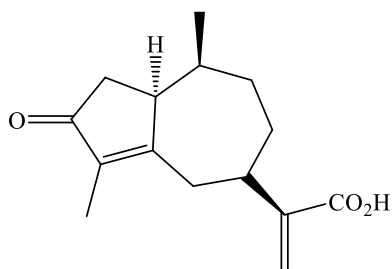
Одним из перспективных сесквитерпеновых лактонов является артемизинин (1), выделенный из *Artemisia annua* L, обладающий противоопухолевым, противомаларийным и противовирусным действием [6, 7]. Артемизинин (1) в эксперименте *in silico* ингибирует S-белок и протеазы коронавируса [8].

Партенолид (2) обладает провоспалительным действием при цитокиновом шторме, вызванном коронавирусной инфекцией, за счет ингибирования сигнальных путей TNF α и цитокинов [9].

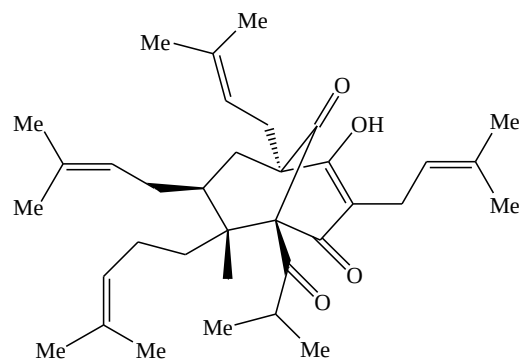


Определено противовирусное действие сесквитерпенового лактона арглабина (3) в отношении вируса гриппа типа А на культуре клеток фибробласты легких эмбриона человека и установлено наличие антивирусной активности сесквитерпенового лактона в отношении вируса гриппа типа А [10].

Одним из перспективных соединений, обладающих противовирусной активностью, является рупестроновая кислота (4), выделенная из *Artemisia rupestris* L., обладающая выраженной активностью в отношении вирусов гриппа Аи В [11]. В настоящее время рупестроновая кислота входит в состав китайского антивирусного препарата Lianhua.



(4)



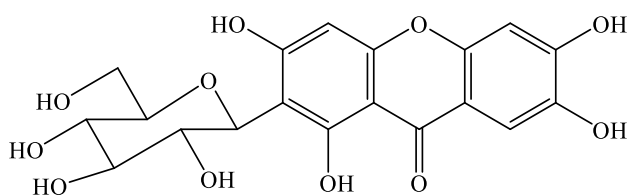
(5)

Другой группой препаратов, способных блокировать репликацию вирусов гриппа и коронавируса, являются полифенольные соединения, не только изменяющие заряд поверхности клетки, но и препятствующие специфической сорбции вируса на рецепторы, а также разрушающие оболочку вируса, что ведет к неспособности связывания с рецепторами клетки и повышает чувствительность вирусного нуклеокапсида к протеазам и эндонуклеазам [12]. Транскрипция вирусного генома и сборка вирионов являются самыми сложными этапами репродукции вируса. Этот этап успешно блокируется ингибиторами пост-трансляционных модификаций вирусных белков, связанных с протеазными превращениями полипептидных цепей [13].

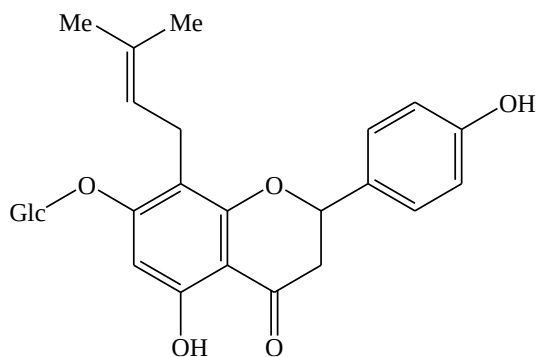
Так, при исследований *in vitro* выявлено, что экстракт *Hypericum perforatum* L., содержащий гиперфорин (5) и флавоноиды (рутин, кверцетин, мирицетин), подавляет цитокиновый шторм, ингибируя пути передачи сигналов NF-κB, участвующих в индуцированных цитокинами воспалительных изменениях [14].

На основе растительных полифенольных соединений разработаны противовирусные средства Алпизарин, Флакозид, Хелепин, Гипорамин, которые эффективны против ВИЧ, вируса гриппа, герпеса, обладают высоким индексом селективности, имеют многоцелевой механизм действия, нетоксичны [15].

Алпизарин (6) представляет собой гликозид, выделяемый из травы копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.), обладает противовирусной активностью в отношении вирусов герпеса, цитомегаловирусов, вируса иммунодефицита человека, опоясывающего лишая.



(6)



(7)

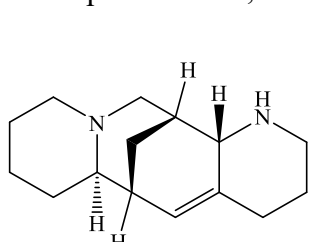
Флакозид (7) – флавоноидный гликозид из листьев бархата амурского, обладает противовирусным действием в отношении первичных и рецидивирующих форм герпеса.

Хелепин представляет собой очищенную сумму флавоноидов кверцетина, кемпферола, леспедина, ориентина из надземной части леспедецы копеечниковой (*Lespedeza hedisaroides* Pall. Kitag.), является эффективным при опоясывающем лишае, стоматитах вирусной этиологии, отитах, ринитах.

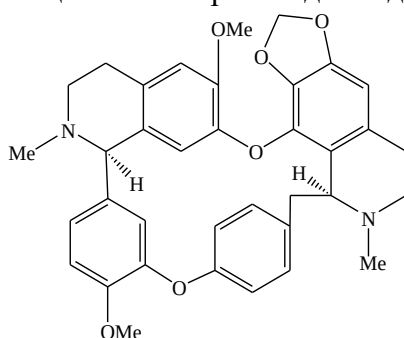
Противовирусный препарат Гипорамин на основе очищенного экстракта из листьев облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.), действующим веществом которого является полифенольный комплекс. Противовирусное действие оказывается за счет подавления активности вирусной нейраминидазы, а также индуцирования продукции эндогенного интерферона. Активен в отношении различных штаммов вирусов гриппа А и В, аденовирусов, парамиксовирусов, вирусов простого герпеса и опоясывающего лишая, цитомегаловируса.

Экстракты растений родов *Sophora* L., *Thermopsis* R.Br. – основные продуценты хиноли-зидиновых алкалоидов – активны в отношении вирусов простого герпеса I (HSV-I), вируса гриппа А (H1N1). Кроме того, алкалоид алоперин (**8**) проявляет высокие противогриппозные свойства, а его производные рассматриваются в качестве перспективных агентов для терапии приобретенного иммунодефицита, вызываемого вирусом HSV-I [16].

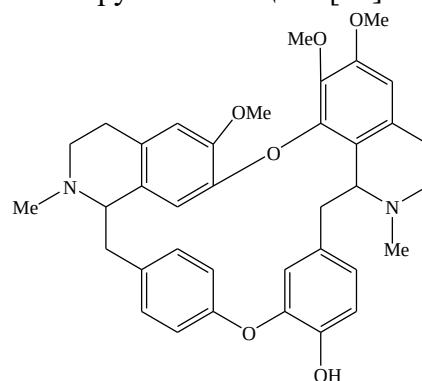
Бис-бензилизохинолиновые алкалоиды *Stephania cepharantha* Hayata цефарансин (**9**), бербамин (**10**), изотетрандрин (**11**) обладают противовирусной активностью. Цефарансин эффективно подавляет репликацию некоторых ретровирусов, в том числе ВИЧ-1, активированную фактором некроза опухолей-альфа и форболовыми эфирами вследствие ингибирования экспрессии гена, отвечающего за воспроизводство данного вируса в моноците [17].



(8)

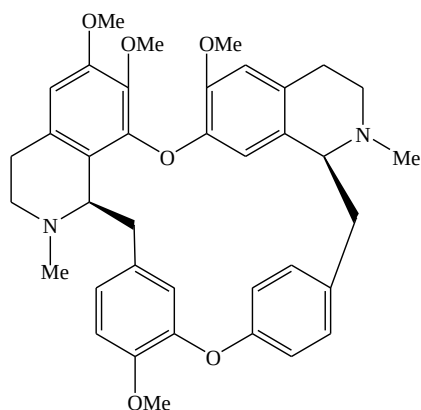


(9)

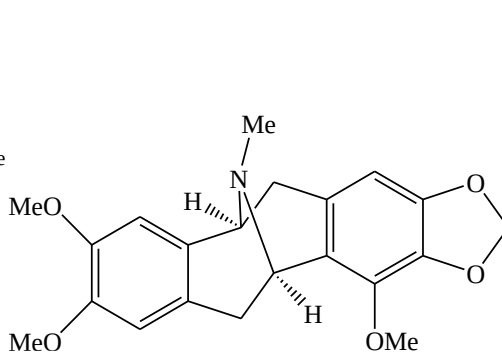


(10)

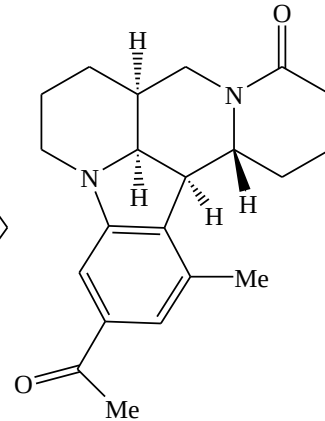
Алкалоиды талимонин (**12**), софалин D (**13**) ингибируют основную протеазу COVID-19 [18].



(11)



(12)



(13)

Кетоамидсодержащие молекулы считаются потенциальными источниками антивирусных средств. Установлено, что основная протеаза Nsp5 коронавирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 ингибируется соединениями, содержащими в своей структуре альфа-кетоамидную функцию [19]. Так, противовирусный препарат Нарлапревир является ингибитором NS3-сериновой протеазы HCV. Механизм ингибирования предполагает обратимое ковалентное связывание нарлапревира активным участком NS3 протеазы через кетоамидную функциональную группу [20].

Растительные терпеноиды, флавоноиды, алкалоиды ингибируют основную папаин-подобную протеазу, репликацию коронавируса, рецептор ACE2, что позволит создать на их основе новые эффективные лекарственные субстанции.

В АО Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» в течение ряда лет проводится химическое изучение 527 видов растений, из которых выделены более 1000 природных соединений, на их основе синтезированы 2000 новых производных. Определена противоопухолевая, антиоксидантная, нейротропная, гепатопротекторная, противопаразитарная активность выделенных и синтезированных соединений. Скрининг образцов растительных веществ на антивирусную активность показал выраженный ингибирующий эффект сесквитерпеновых γ -лактонов в отношении репродукции вирусов ВИЧ, геморрагической лихорадки, полиэнцефалита, а также вируса гриппа А. Выявлена высокая антивирусная активность ряда полифенольных соединений, кумаринов, выделенных из растений флоры Казахстана [10, 21–24].

Результаты наших исследований свидетельствуют, что терпеноиды, алкалоиды и флавоноиды являются возобновляемыми материалами для синтеза новых соединений с заданными свойствами, в том числе противовирусного действия. При исследовании взаимосвязи строения молекул флавоноидных и терпеновых соединений с их антивирусными свойствами определено, что введение в структуру молекул сопряженной двойной связи, атома хлора, ароматического заместителя, гидроксильной группы приводит к повышению противовирусной активности изучаемых соединений. Химическая модификация молекул растительных терпеноидов, флавоноидов, алкалоидов, в частности синтез новых соединений с кетоамидной функцией в их структуре, будет перспективным направлением для разработки новых субстанций, которые будут ингибировать основную протеазу COVID-19, рецептор ACE2, цитокиновый шторм, а также способствовать генерации оксида азота.

Начаты работы по поиску новых антивирусных растительных веществ для разработки эффективных против коронавируса препаратов, включающие изучение ингибирования алкалоидами, терпеноидами и флавоноидами синцитиеобразования клеток Vero E6 с клетками 293T трансфицированными плазмидой, содержащей полноразмерный S-гликопротеин SARS-CoV-2, стимуляцию выработки эндогенных интерферонов.

Анализируя растительные вещества, способные подавлять протеазную активность белков вирусов гриппа и коронавирусов, можно сделать вывод о широком разнообразии природных соединений, механизм действия которых основан на блокировании областей, критичных для активности аспарагиновой протеазы вируса.

Большое разнообразие биологически активных соединений, содержащихся в растениях, позволяет рассчитывать на возможность получения новых высокоактивных препаратов, обладающих способностью блокировать различные вирусы, в том числе резистентные к существующим коммерческим химиопрепаратам.

Библиографический список

1. Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Штро А.А. и др. Разработка новых препаратов против вируса гриппа на основе синтетических и природных соединений // Вопросы вирусологии. 2012. Т. 57. № 3. С. 30–36.
2. Максимов В.А., Торшин И.Ю., Чучалин А.Г. и др. Опыт применения препарата Лаеннек у пациентов с высоким риском развития «цитокинового шторма» на фоне COVID-19 и гиперферритинемии // Пульмонология. 2020. Т. 30. № 5. Р. 587–598.
3. Лейтрагин – лекарственный препарат для лечения и профилактики поражения легких вирусной инфекцией // Биомедицина. 2021. Т. 17. № 2. С. 2.
4. Martel J., Ko Y.-F., Young J.D., Ojcius D. M. Could nasal nitric oxide help to mitigate the severity of COVID-19? // Microbes and Infection. 2020. Vol. 22. № 4-5. P. 168–171.
5. Li Y., Jiang R., Ooi L.S. et al. Antiviral triterpenoids from the medicinal plant *Schefflera heptaphylla* // Phytotherapy Research. 2007. Vol. 5. P.466–470.
6. Youyou Tu. From *Artemisia annua* L. to artemisinins. The discovery and development of artemisinins and antimalarial agents. London: Academic Press. 2017. 427 p.
7. Ivanescu B., Miron A., Corciova A. Sesquiterpene lactones from *Artemisia* genus: Biological activities and methods of analysis // Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2015. P. 1-21. DOI:10.1155/2015/247685.
8. Tomic N., Pojskic L., Kalajdzic A., et al. Screening of preferential binding affinity of selected natural compounds to SARS-CoV-2 proteins using in silico methods // Eurasian journal of medicine and oncology. 2020. Vol. 4. №4. P. 319–323.
9. Nemati M., Danesh Pouya F., Roshani Asl E. et al. Parthenolide: suggested drug for COVID-19 // Russian Journal of Infection and Immunity. 2020. Vol. 10. №4. P. 789–791.
10. Невинский Г.А., Ахметова С.Б., Адекенов С.М. К вопросу изучения антивирусной активности сесквитерпенового лактона арглабин // Российский биотерапевтический журнал. 2005. Т. 4, №2. С. 45–46.
11. Aisa H.A., Yong J.P., Lv Q.Y. et al. (5R,8R)-2-(3,8-dimethyl-2-oxo-1,2,4,5,6,7,8,8a-octa-hydro-azulen-5-yl)acrylic acid (rupestonic acid) // Acta Crystallogr. Sect. 2008. Vol. 64. P. 479–488.
12. Musarra-Pizzo M., Ginestra G., Smeriglio A. et al. The Antimicrobial and Antiviral Activity of Polyphenols from Almond (*Prunus dulcis* L.) Skin // Nutrients. 2019. Vol.11(10). P. 2355. DOI: 10.3390/nu11102355.
13. Chang K.O., Kim Y., Lovell S. et al. Antiviral Drug Discovery: Norovirus Proteases and Development of Inhibitors // Viruses. 2019. Vol. 11(2). P. 197. DOI: 10.3390/v11020197.
14. Masiello P., Novelli M., Beffy P. et al. Can *Hypericum perforatum* (SJW) prevent cytokine storm in COVID-19 patients? // Phytotherapy Research. 2020-34. P. 1471–1473.
15. Фитопрепараты ВИЛАР / под ред. Т.А. Сокольской М., 2009. 256 с.
16. Dang Z., Zhu L., Lai W. et al. Aloperine and its derivatives as a new class of HIV-1 entry inhibitors // ACS Med. Chem. Lett. 2016. Vol. 7. P. 240–242.
17. Huang H., Hu G., Wang Ch. et al. Cepharanthine, an alkaloid from *Stephania cepharantha* hayata, inhibits the inflammatory response in the RAW264.7 Cell and Mouse Models // Inflammation. 2014. Vol. 37(1). P. 235–246.
18. Garg S., Roy A. In silico analysis of selected alkaloids against main protease (Mpro) of SARS-CoV-2 // Chemico-Biological Interactions. 2020. Vol. 332. P. 1–12.
19. Zhang L., Lin D., Sun X. et al. Crystal structure of SARS CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors // Science. 2020. Vol. 368. Iss. 6489. P. 409–412.
20. Лагодич А.С., Жерносок А.К. Противовирусные лекарственные средства // Вестник фармации. 2019. №2. С. 84–98.
21. Березин В.Э., Богоявленский А.П., Толмачева В.П. и др. Антивирусная активность флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов // Поиск и создание методов получения фитопрепаратов. Алматы, 1997. С. 335–340.

22. Турмагамбетова А.С., Зайцева И.А., Омиртаева Э.С. и др. Растительные терпеноиды, как основа создания новых противовирусных препаратов // Новости науки Казахстана. 2018. № 137. С. 57–65.

23. Богоявленский А.П., Адекенов С.М., Березин В.Э. Сравнительное изучение вирусингибирующей активности некоторых кумаринов на модели вируса гриппа // Доклады НАН РК. 2014. №2. С. 57–62.

24. Жанымханова П.Ж., Тойгамбекова Н.Н., Есмаганбетова А.М. и др. Изучение противовирусной активности некоторых флавоноидов и их производных // Доклады НАН РК. 2015. № 3. С. 179-184.

УДК 619.615.383: 591.339: 615.375

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА SARS-COV-2

О.Е. Викторина¹, Д.Н. Щербаков^{1,2}, Е.А. Колосова^{1,2}

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

²Институт медицинской биотехнологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, НСО, Кольцово, Новосибирская область, Россия

В работе разработана схема иммунизации кур рекомбинантным N-белком SARS-CoV-2. Титр препаратов антител после третьей иммунизации составил 1:1600. Предложенная схема иммунизации может быть использована для получения препаратов поликлональных антител, реактивных в отношении нуклеокапсидного белка, востребованных при создании иммунохимических тест-систем против новой коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: новая коронавирусная инфекция, COVID-19, IgY-антитела, рекомбинантный N-белок, SARS-CoV-2

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), на 13 июля 2021 г. количество смертей от коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2, превышает 4 миллиона.

Вирус SARS-CoV-2 представляет собой РНК, содержащий вирус с геномом положительной полярности [5]. Геном SARS-CoV-2 кодирует 4 основных белка: мембранный гликопротеин М, малый белок оболочки Е, S-белок (белок-шип) и нуклеокапсидный белок N и ряд неструктурных белков [1]. Несмотря на то, что наиболее очевидной мишенью для создания методов диагностики является поверхностный белок S, его низкая представленность (10–15 штук на вирион) может снижать чувствительность тест-систем. В то же время N белок представлен в большом количестве и его выявление выглядит обоснованным.

В иммунохимических тестах для обнаружения SARS-CoV-2 используются моноклональные и поликлональные антитела [4]. Последние имеют более низкую стоимость и за счет взаимодействия с набором эпитопов более высокую эффективность. Одним из способов получения препаратов поликлональных антител является выделение антител класса Y из желтков иммунизированных кур.

Таким образом, целью работы было получение IgY антител против белка N SARS-CoV-2.

Материалы и методы

1. Подготовка к эксперименту. Уход за лабораторными животными осуществлялся согласно ГОСТу [7].

2. Иммунизация кур и сбор яиц. Куриц иммунизировали рекомбинантным N-белком в концентрации 50 мкг/животное. Предварительно 50 мкл антигена (N-белка) в концентрации 1 мг/мл смешивали с 50 мкл адьюванта «ALHYDROGEL “85” 2.0%» (BRENNTAG, Рос-

сия), содержащего гидроксид алюминия в концентрации 10 мг/мл, и 400 мкл физраствора (ФКП «Армавирская биофабрика», Россия). Смесь инкубировали 30 мин, регулярно перемешивая. Препарат вводили в грудные мышцы птицы по 250 мкл в каждую. Иммунизацию повторяли на 21, 42, 63, 91 сутки. Собранные яйца хранились при 4 °С. После сбора яиц от иммунизированных птиц проводили выделение препаратов антител.

3. Выделение куриных антител класса Y. Выделение антител проводили согласно методу, предложенным А. Полсоном [2, 3]. Оценку концентрации препаратов антител проводили на спектрофотометре Implen (Германия). Оценку чистоты полученных препаратов проводили электрофоретическим разделением препаратов куриных антител, в 15% полиакриламидном геле в вертикальной камере фирмы BIO-RAD.

4. Исследование препаратов антител против N-белка с помощью иммуноферментного анализа. В высокосорбционном 96-луночном планшете сорбировали по 200 нг/лунку рекомбинантный N-белок в растворе, содержащем 2М мочевины ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) в натрий-фосфатном буфере (НФБ) при 4 °С в течение ночи. После трехкратной промывки на планшетном вошере ELx50 (BioTek, США) промывочным раствором, содержащим 0,5% полисорбат 20 в НФБ, наносили по 150 мкл/лунку блокирующего раствора, содержащего 1% сухое молоко (Sigma-Aldrich, США) в НФБ и инкубировали в течение часа при 37 °С в планшетном термошейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) при 200 об/мин. Далее наносили препараты куриных антител в объеме 100 мкл в диапазоне разведений от 1:50 до 1:1600 в блокирующем буферном растворе и инкубировали в течение часа при 37 °С в планшетном термошейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) при 200 об/мин. После трехкратной промывки наносили по 100 мкл конъюгата мышинных антител против куриных антител класса Y, меченных пероксидазой хрена (ProSci, США) в рабочем разведении 1:10000 и инкубировали в течение часа при 37 °С в планшетном термошейкере при 200 об/мин. После шестикратной промывки наносили по 50 мкл субстрата на основе тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М серной кислоты. Регистрацию сигнала проводили при длине волны 450 нм на планшетном фотометре iMark (BioRad, США). Данные обрабатывали в MS Excel, где значения образцов больше фонового значения (0,04) считались положительными.

Результаты. Выход антител составил в среднем $11,7 \pm 3,2$ мг с одного яйца.

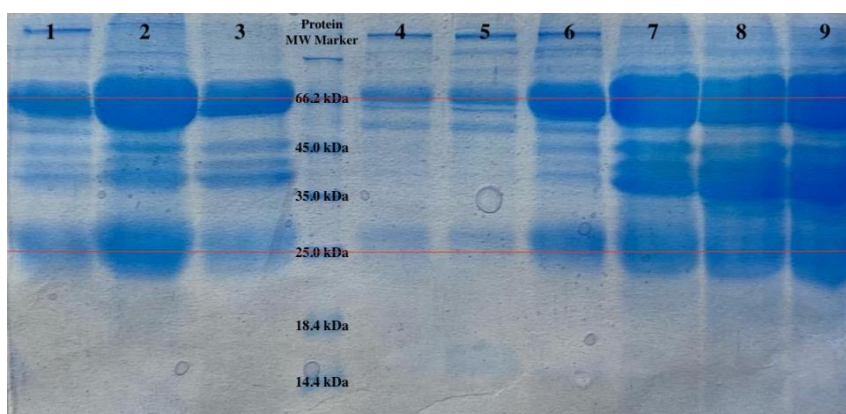


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле препаратов куриных антител, выделенных после иммунизации (1-9) и маркера (Thermo scientific, Литва)

Электрофоретическое разделение препаратов антител в денатурирующих условиях показал наличие белков с молекулярной массой 25 кДа, 45 кДа, 66 кДа. Молекулярные массы тяжелой и легкой цепи куриных антител класса Y соответствуют 25 кДа и 66 кДа. В препаратах антител присутствует примесь желточного белка – овальбумина с молекулярной массой около 45 кДа.

Оценку иммунного ответа проводили посредством иммуноферментного анализа (рис. 2).

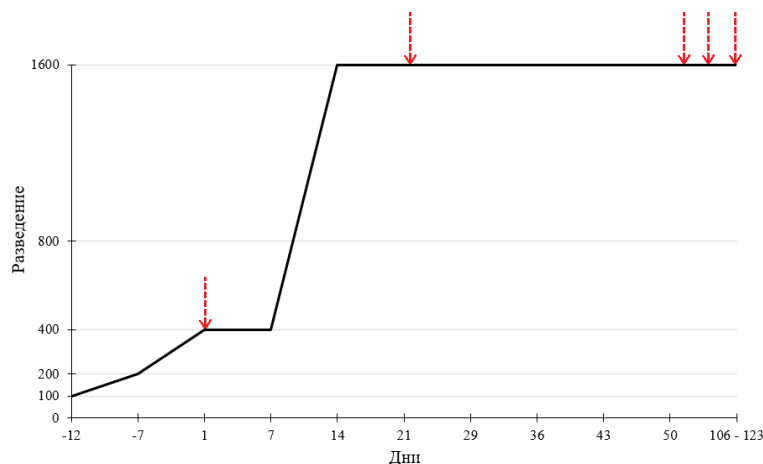


Рис. 2. Динамика накопления антител в выделенных препаратах куриных против N-белка. Стрелочками указаны даты иммунизации

В качестве отрицательного контроля наличия специфических антител использовали препараты антител, выделенные из яиц, собранных до иммунизации животного. Титры 1:200 и 1:400 следует считать фоновыми, так как на основании таких низких титров невозможно подтвердить или опровергнуть наличие специфических антител [6]. Титр антител после первой иммунизации составил 1:400. Нарастание титра происходило после 7 суток после первой иммунизации. Максимум титр 1:1600 достиг на 14 сутки и не снижался на протяжении 109 дней.

Заключение. Предложенный метод иммунизации кур позволил успешно получить антитела класса Y к рекомбинантному нуклеокапсидному белку SARS-CoV-2. Выход полученных антител составил $11,7 \pm 3,2$ мг/яйцо. Иммуноферментный анализ показал, что на 14 сутки после иммунизации титр специфических антител против рекомбинантного N-белка достиг 1:1600 разведения.

Получение поликлональных антител является более дешевой альтернативой моноклональным антителам и востребован в разработке диагностических тестов для обнаружения SARS-CoV-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№19-44-220008), государственного задания Минобрнауки Российской Федерации (№ FZMW-2020-0007) и Стипендии Президента (СП-5107.2021.4).

Библиографический список

1. Cubuk J., Alston J.J., Incicco J.J., Singh S., Stuchell-Brereton M.D., Ward M.D., Zimmerman M.I., Vithani N., Griffith D., Wagoner J.A., Bowman G. R., Hall K.B., Soranno A., Holehouse A. S. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA // Nature communications. 2021. № 12(1936). P. 1–17.
2. Polson A., von Wechmar M.B., van Regenmortel M.H. Isolation of Viral IgY Antibodies from Yolks of Immunized Hens // Immunological Communications, 1980. № 9(5). P. 475–93.
3. Polson A., Coetzer T., Kruger J., von Maltzahn E., van der Merwe K.J. Improvements in the isolation of IgY from the eggs laid by immunized hens // Immunological Investigations, 1985. № 14. P. 323–327.
4. Shapouri M.R., Rashno M., Mahmoodi P., Aria M. Production of a monoclonal antibody against chicken immunoglobulin G: A valuable molecule with research and diagnostic applications // Vet Res Forum. 2018. № 9(1). P. 67–72.
5. Sisi K., Mei Y., Zhongsi H., Liping Z., Zhaoxia H., Xiaoxue C., Suhua H., Ziliang Z., Zhechong Z., Qiuyue C., Yan Y., Changsheng Z., Hong S., Shoudeng C. Crystal structure of

SARS-CoV-2 nucleocapsidprotein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites // Acta Pharmaceutica Sinica. 2020. №10 (7). P. 1228–1238.

6. Yian X., Liu L., Jiang W., Zhang H., Liu W., Li J. Potent and Persistent Antibody Response in COVID-19 Recovered Patients // Front Immunol. 2020. №12. P. 1–7.

7. ГОСТ 34088-2017 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными.

УДК 577.29:615

РЕКОМБИНАНТНЫЕ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЕ ФАКТОРЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Е.Д. Даниленко, Г.М. Левагина, Е.А. Волосникова, Г.Г. Шимица, С.Г. Гамалей

Институт медицинской биотехнологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

В статье приведены результаты исследований, касающихся разработки технологий получения рекомбинантных колониестимулирующих факторов человека: гранулоцитарного (Г-КСФ) и гранулоцитарно-макрофагального (ГМ-КСФ). Показано, что разработанные технологии позволяют получать гомогенные белки с чистотой более 95%, отличающиеся высоким уровнем гемостимулирующей активности. Описан способ адресной доставки ГМ-КСФ к клеткам костного мозга с помощью его конъюгирования с бисфосфонатом алендроновой кислотой. Сделан вывод о перспективности использования данного подхода для улучшения терапевтических свойств ГМ-КСФ.

Ключевые слова: колониестимулирующие факторы человека, Г-КСФ, ГМ-КСФ, гемостимулирующая активность, тропность к клеткам костного мозга.

Среди белков-цитокинов, которые представляют интерес с точки зрения их многообразного терапевтического потенциала, особое внимание привлекают колониестимулирующие факторы (КСФ). КСФ – природные цитокины, активирующие размножение и дифференцировку клеток-предшественников разных ростков кроветворения. Гематологические эффекты КСФ обусловлены мобилизацией нейтрофилов и/или моноцитов из тканевых депо в системный кровоток, усилением пролиферации и созревания этих клеток в костном мозге. КСФ используют для лечения некоторых первичных иммунодефицитных состояний, связанных с лейкопенией; в онкологии и трансплантологии – для устранения вторичной опухолевой и медикаментозно индуцированной нейтропении/агранулоцитоза, улучшения приживления трансплантатов костного мозга, а также при апластической анемии для потенцирования гемопоэза [1].

Результаты исследований последних лет дают основания полагать, что область клинического применения этих цитокинов может быть значительно расширена. Новые показания к применению КСФ в клинической практике описаны в недавнем обзоре Д.В. Мальцева [4], где упоминаются возможности применения КСФ при травматических поражениях, повреждениях позвоночника; ишемической патологии и инфарктах; глубоких долго незаживающих ранах; при репродуктивной дисфункции; у иммунокомпрометированных лиц, подвергшихся трансплантации органов и тканей.

Показано, что КСФ способны не только увеличивать количество лейкоцитов и их различных морфологических форм в периферической крови, но и усиливать их противомикробные свойства. В связи с этим они могут быть использованы при лечении инфекций, в том числе вяло текущих и хронических [9, 11].

Поскольку цитокины являются препаратами прежде всего иммунозаместительной терапии, их использование целесообразно при вакцинации лиц, страдающих иммунологиче-

ской недостаточностью. Поэтому особый интерес вызывают стратегии, связанные с использованием КСФ в качестве адъювантов противoinфекционных вакцин [8]. В связи с этим разработка технологий масштабного получения колониестимулирующих факторов человека, создание их новых лекарственных форм чрезвычайно актуальны.

В Институте медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора совместно с сотрудниками Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН впервые в России был создан рекомбинантный штамм-продуцент гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (Г-КСФ) на основе плазмиды GGF8, содержащей ген Г-КСФ человека, и *E. coli* SG20050, синтезирующей белок человека конститутивно [7]. Отработан и масштабирован процесс выделения и очистки рекомбинантного Г-КСФ человека высокой степени чистоты (более 95–97%) и гомогенности [5]. На основе этого белка был создан и зарегистрирован в России (РУ ЛСР 005186/07 от 24.12.2007) лекарственный препарат Нейтростим, по показателям качества, физико-химическим характеристикам и биологической активности не уступающий зарубежным аналогам.

В биологических исследованиях было показано, что введение как субстанции, так и лекарственной формы препарата Г-КСФ мышам с миелосупрессией, вызванной введением циклофосфана, приводило к повышению общего числа лейкоцитов периферической крови, а также числа незрелых и зрелых нейтрофилов костного мозга [2]. Уровень гемостимулирующей активности Нейтростима превышал 1000%, что позволяет говорить о том, что препарат является высокоактивным гемостимулятором.

Другим КСФ, представляющим интерес с точки зрения многообразия его биологических свойств, является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ). Надо сказать, что масштабное получение данного цитокина ограничено низкой продуктивностью рекомбинантных штаммов. Эта проблема была решена сотрудниками «Вектора» в результате конструирования плазмиды p280_2GM, несущей тандем генов ГМ-КСФ [6]. Трансформация плазмидой штамма *E. coli* SG20050 позволила получить продуцент, обеспечивающий уровень экспрессии рекомбинантного ГМ-КСФ человека (рчГМ-КСФ) на уровне 25–30% от количества суммарного клеточного белка, что в 1,5–2 раза выше, чем при использовании ранее созданных продуцентов. Разработанная технология позволяет получать из 1 г влажных клеток до 10 мг белка с чистотой 98%, соответствующего требованиям качества, предъявляемым к рекомбинантным белкам [3, 6].

Гемостимулирующие свойства рекомбинантного ГМ-КСФ продемонстрированы на мышинной модели цитостатической миелосупрессии, вызванной введением циклофосфана. Было показано, что введение рчГМ-КСФ в дозах от 10 до 90 мкг/кг приводило к дозозависимому повышению общего числа лейкоцитов и нейтрофилов. Причем более выраженной была реакция нейтрофилов: если число лейкоцитов крови на 6-е сутки после введения ЦФ составляло 62–67% от интактного уровня, то содержание нейтрофилов на 50–65% его превышало. Наиболее интенсивный гемостимулирующий эффект препарат проявлял в дозе 90 мкг/кг. Число лейкоцитов и нейтрофилов на 5-е сутки после введения ЦФ в крови мышей этой группы возрастало по сравнению с контролем, соответственно, в 2,8 и 6 раз, на 6-е сутки – в 1,6 и 1,9 раза.

В мировых исследованиях последних лет наблюдается тенденция к увеличению числа исследований, направленных на совершенствование препаратов КСФ в части улучшения их фармакокинетического профиля и снижения побочных эффектов. Одним из методических приемов, который используется для этих целей, является создание гибридных конструкций, в которых белок соединен с молекулой, обеспечивающей его адресную доставку.

Примером реализации такого подхода в наших исследованиях является получение конъюгата ГМ-КСФ с бифосфонатом алендроновой кислотой (АЛН) в качестве векторной молекулы. Бисфосфонаты – производные фосфоновых кислот, синтетические аналоги эндогенных пирофосфатов, обладающие высоким сродством к гидроксипатиту кости и как следствие, интенсивно накапливающиеся в костном матриксе. Конъюгирование бифосфонатов с биологически активными соединениями используется для адресной доставки лекарств к клеткам-мишеням костной ткани.

Для получения конъюгата ГМ-КСФ с АЛН был использован водорастворимый карбодиимид, позволяющий обеспечить сшивку белка через его карбоксигруппу с аминогруппой бифосфоната при прямой и обратной последовательности внесения компонентов (конъюгаты GEA, AEG); второй вариант конъюгирования заключался в использовании реакции Малапрада и молекулы декстрана в качестве сшивающего агента. Реакцию связывания проводили с помощью оригинальной технологии на твердой фазе, колонке с гидроксипатитом [10].

В биологических экспериментах было показано, что введение животным как препарата рчГМ-КСФ, так и его конъюгатов с АЛН приводило к более быстрому увеличению числа лейкоцитов крови по сравнению с контрольными показателями. В группах мышей, которым вводили конъюгаты GEA и DGA, на 5-е сутки после введения ЦФ отмечено статистически значимое увеличение числа сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с контролем (на 414 и 200%, соответственно, $p \leq 0,05$), на 6-е сутки повышенные (на 77–169%) значения показателя зарегистрированы во всех трех группах с введением конъюгатов. При этом достоверный стимулирующий эффект исходного рчГМ-КСФ был отмечен лишь на 6-е сутки: число сегментоядерных нейтрофилов крови в этот период повышалось на 218%.

Введение как рчГМ-КСФ, так и его конъюгатов приводило к увеличению общего числа кариоцитов через 5 суток после введения ЦФ, при этом максимальным был эффект конъюгата AEG. Через 6 суток число кариоцитов в костном мозге мышей, которым вводили конъюгаты, на 58–63% превышало уровень контроля и на 30–32% уровень показателя, зарегистрированный после введения рчГМ-КСФ.

Анализ динамики распределения ГМ-КСФ после однократного внутривенного введения мышам рчГМ-КСФ и его конъюгата с алендроновой кислотой AEG показал, что оба исследуемых препарата способны проникать в костную ткань и костный мозг. При этом более высоким было содержание белка в бедренных костях и костном мозге мышей, получавших инъекции конъюгата (табл.).

Динамика изменения уровня ГМ-КСФ в крови, костной ткани и костном мозге мышей после однократного внутривенного введения препаратов рчГМ-КСФ

Препарат	Концентрация ГМ-КСФ в образцах			
	3 мин	1 час	4 часа	24 часа
	Бедренная кость, пг/г			
Контроль	184±139			
рчГМ-КСФ	3869±458*	322±151	436±52	137±105
Конъюгат AEG	11154±1613*,**	1108±387	1706±374*,**	1652±449
	Костный мозг, пг/бедро			
Контроль	3,52±2,03			
рчГМ-КСФ	237±36*	9,84±7,47	0±0	1,20±1,20
Конъюгат AEG	567±127*	20,3±12,8	5,64±5,64	15,7±9,7

Примечание. Экспериментальные данные представлены в виде средней арифметической величины и стандартной ошибки ($M \pm m$); * – отличия статистически значимы, по сравнению с контролем; ** – отличия статистически значимы, по сравнению с показателем мышей, которым вводили рчГМ-КСФ ($p < 0,017$).

Иными словами, введение в состав рчГМ-КСФ алендроновой кислоты способствовало повышению накопления ГМ-КСФ в костной ткани и костном мозге мышей. Апробированный методический подход может быть полезен для улучшения терапевтических свойств препаратов данного цитокина в части повышения его накопления в костном мозге и как следствие – снижения величины терапевтической дозы.

Таким образом, в ходе работ по созданию лекарственных препаратов на основе колониестимулирующих факторов человека разработаны технологии получения рекомбинантных белков (рчГ-КСФ, рчГМ-КСФ), позволяющие стабильно получать препараты высокой степени чистоты и активности. Введение в структуру рчГМ-КСФ векторной молекулы позволило решить вопрос адресной доставки цитокина к клеткам-мишеням, что является перспективным подходом для улучшения терапевтических свойств данного цитокина.

Работы по отработке и оптимизации технологии получения препаратов Г-КСФ и ГМ-КСФ выполнены в рамках Государственного задания, тема ГЗ -39/21

Библиографический список

1. Белогурова М.Б. Клиническое использование гемопоэтических ростовых факторов // Практическая онкология. 2003. Т. 4. № 3. С. 183–190.
2. Дыгай А.М., Жданов В.В. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические аспекты. М., 2010. 138 с
3. Есина Т.И., Лебедев Л.Р., Волосникова Е.А. и др. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 3. С. 68–73.
4. Мальцев Д. В. Показания к применению колониестимулирующих факторов в клинической практике // Клиническая иммунология, аллергология, инфектология. 2018. Т. 106. № 1. С. 5–12.
5. Патент RU 2201962, С1, заявка №2001107330, дата подачи 19.03.2001, дата публ. 10.04.2003.
6. Патент RU 2708556, С1, заявка №2018140842, дата подачи 19.11.2018, дата публ. 09.12.2019.
7. Шингарова Л.Н., Кашьяп С.К., Петровская Л.Е. и др. Экспрессия гена гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека в *Escherichia coli* // Биотехнология. 1998. №6. С. 24–35.
8. Aktas D., Demirel B., Gursoy T. et al. A randomized case-controlled study of recombinant human granulocyte colony stimulating factor for the treatment of sepsis in preterm neutropenic infants// *Pediatr. Neonatol.* 2015. V. 56. № 3. P. 171–175.
9. Celmeli F., Oztoprak N., Turkkahraman D. et al. Successful Granulocyte Colony-stimulating Factor Treatment of Relapsing *Candida albicans* Meningoencephalitis Caused by CARD9 Deficiency // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016. V. 35, № 4. P. 428–431.
10. Esina T.I., Volosnikova E.A., Lebedev L.R. et al. Study on the Methods for Synthesis of GM-CSF Conjugates with Alendronic Acid. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2020. V. 46, №. 3. P. 342–348.
11. Rothchild A. C., Stowell B., Goyal G. et al. Papavinasundaram K., Sasseti C. M., Dranoff G., Chen X., Lee J., Behar S. M. Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Production by T Cells during *Mycobacterium tuberculosis* Infection // *MBio.* 2017. V. 8, № 5.

УДК 615.322; 615.074; 615.19

КСИЛОТРОФНЫЕ БАЗИДИОМИЦЕТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ РЕСУРСНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИКИ

А.А. Ермошин¹, И.С. Киселёва¹, М.В. Улитко¹, Чаомей Ма²

¹Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия

²Университет Внутренней Монголии, Хух-Хото, Китай

Поиск нового природного сырья для получения биологически активных веществ фармакологического действия остается актуальным, несмотря на многовековую историю использования живых организмов в качестве источников лекарственных средств. Анализ литературы о химическом составе четырех наиболее распространенных трутовых грибов, произрастающих на Урале (*Inonotus obliquus*, *Fomitopsis pinicola*, *Piptoporus betulinus*, *Ganoderma applanatum*), и их применении в народной медицине показал, что общим для них является наличие тритерпенов, фенолов и полисахаридов в плодовых телах. Из этих видов только чага широко применяется в официальной медицине и подробно описана биохимически. Остальные виды изучены и применяются ограничено. Наши исследования показали наличие во всех изучаемых видах таких БАВ как фенолы. Для *P. betulinus* и *F. pinicola* – сапонины и алкалоиды у *F. pinicola*. Экстракты плодовых тел грибов обладали антирадикальной и антиоксидантной активностью, наибольшей у вида сравнения – чаги. Экстракты всех видов стимулировали пролиферацию нормальных клеток в культуре, но только два вида – *G. applanatum* и *F. pinicola* подавляли рост опухолевых клеток (HeLa).

Ключевые слова: ксилотрофные базидиомицеты, экстракты плодовых тел, чага, ганодерма, антиоксиданты, фенолы, противораковая активность, HeLa.

Введение. Изменение рациона питания, ухудшение экологической обстановки, стрессовые факторы различной природы неблагоприятно сказываются на здоровье человека. Для его восстановления современная фармацевтика предлагает широкий перечень терапевтических препаратов. Однако оптическая чистота химических компонентов живых систем накладывает ряд ограничений на химические синтезы, поэтому большое количество терапевтических препаратов до настоящего времени получают из растительного сырья. Биологическое разнообразие растений столь велико, что далеко не все из них тщательно исследованы с точки зрения источников биологически активных веществ (БАВ), поэтому популярным направлением является этноботаника и этнофармацевтика, которые занимаются изучением применения растений в народной медицине в прошлом и поиском научных обоснований их использования в современной медицине. Такие исследования широко проводятся в Индии и Китае.

Если растительное сырье традиционно используется в народной и официальной медицине Азии и Европы, то грибам как источникам БАВ уделяют внимание значительно реже. Восточная медицина использует грибы в терапии и является лидером по их научному изучению. В российской медицинской практике широкое применение нашла лишь чага – стерильная форма трутовика скошенного. В странах Восточной Европы биологические свойства грибов начали изучать сравнительно недавно, а в Западной Европе они практически не изучаются. Однако грибы, как и растения, обладают богатым вторичным метаболизмом. Базидиальные грибы широко распространены в лесах, а наша страна имеет огромные площади

лесных массивов. Метаболическое и видовое разнообразие и большие объемы биомассы делают грибы перспективным сырьем для изучения и введения в фармацевтическую практику.

Целью данной работы являлась оценка возможности применения наиболее распространенных на Урале ксилотрофных базидиальных грибов как источников биологически активных веществ для медицинских целей.

Изучение научной литературы, о распространении, биологии и экологии трутовых грибов, их химическом составе и применении в народной и официальной медицине, показало, что среди распространенных на Урале видов чага (*Inonotus obliquus*), трутовик окаймленный (*Fomitopsis pinicola*), березовая губка (*Piptoporus betulinus*), трутовик плоский (*Ganoderma applanatum*) могут быть потенциальными дешевыми и доступными источниками лекарственных БАВ.

Начиная с XVI в. гриб *I. obliquus* (чага) использовался для лечения раковых заболеваний, диабета, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, а также в качестве тонизирующего средства [2, 3]. В Российской Федерации производится ряд препаратов на основе чаги, например Бефунгин, который используется для профилактики заболеваний ЖКТ и различных злокачественных новообразований, а также биологически активные добавки Чаговит, Литовит-Ч, которые применяются в качестве антиоксидантов и иммуномодуляторов [16]. Экстракты *I. obliquus* содержат в своем составе большое разнообразие веществ: фенольные соединения, тритерпеноиды, эргостерол и его пероксид, сесквитерпены, полисахариды, а также меланиновые комплексы [1].

На протяжении более 2000 лет грибы рода *Ganoderma* использовались в традиционной медицине стран Азии [2, 15]. Наиболее изученным и широко используемым является трутовик лакированный – *Ganoderma lucidum*, также известный как рейши или линчжи. Однако и другие виды данного рода, например, *G. applanatum*, *G. tsugae*, *G. capense* использовались в лечебной практике, хотя и изучены в значительно меньшей степени [5]. Экстракты мицелия, спор и плодовых тел различных представителей рода *Ganoderma* содержат большое количество БАВ, среди которых обнаружены терпеноиды, полисахариды, протеины, аминокислоты, нуклеозиды, стероиды, лактоны, жирные кислоты [15].

Piptoporus betulinus – широко распространенный в лесной зоне вид, используемый в традиционной медицине стран центральной Европы. Он применялся в качестве противовоспалительного, противоопухолевого, антимикробного, иммуностимулирующего и общетонизирующего средства [7, 12]. Тритерпены, выделенные из *P. Betulinus*, обнаруживали ряд биологических эффектов: полипореновые кислоты и их производные оказывали противовоспалительный эффект [12], тритерпеноиды проявляли противовоспалительную и антибактериальную активность [4, 9].

Плодовые тела *Fomitopsis pinicola* применялись в народной медицине разных стран как кровоостанавливающее и противоопухолевое средство [6, 13]. Однако этот гриб использовался значительно реже, чем упомянутые выше. Показано, что он обладает противоопухолевыми, антиоксидантными, противовоспалительными, противомикробными эффектами. Одними из главных действующих веществ в составе *F. pinicola* являются ланостановые тритерпены и их гликозиды [14].

Материалы и методы. Биологический материал собирали в смешанном лесу в окрестностях биологической станции Уральского федерального университета, Свердловская область, Сысертский район, д. Ключи. Образцы высушивали при 60°C, после чего измельчали и проводили исчерпывающую экстракцию, для этого 20 г сырья обрабатывали двукратно 200 мл 95; 80; 60 и 40% этанола, экстракты объединяли, упаривали на ротаторном испарителе,

после чего растворяли остаток в 70% этаноле. Проводили качественный и количественный анализ БАВ изучаемых видов, определяли антиоксидантную и антирадикальную активность экстрактов [8, 11], оценку его влияния на рост нормальной клеточной линии (Vero) и раковых клеток (HeLa) в МТТ тесте [10].

Результаты и обсуждение. Качественный анализ показал, что все изучаемые виды содержат фенольные соединения, преимущественно простые фенолы. У двух видов (чага и *G. applanatum*) обнаружены полифенолы и антроцен-производные, что согласуется с литературными данными. У двух других видов найдены сапонины, а у *F. pinicola* еще и алкалоиды (таблица 1). Флавоноиды не были обнаружены ни в одном из образцов. Ранее для этих видов было показано наличие свободных углеводов и аминокислот, в том числе незаменимых [17].

Наличие фенолов в экстрактах может определять их высокую антиоксидантную активность. Наибольшее содержание фенолов показано для березовой губки (*P. betulinus*). Другие три вида содержали примерно одинаковое количество фенолов, уступающее *P. betulinus* в 1,5 раза.

В тесте на ингибирование образования ABTS-радикала наибольший эффект по тушению радикалов был обнаружен у чаги, несмотря на достаточно низкое содержание фенолов в её экстракте. Чуть меньшей антирадикальной активностью обладал экстракт березовой губки, а самой низкой – трутовик плоский.

Способность ингибировать образование оксида азота (активная форма азота) была примерно одинаковой у трех видов, за исключением березовой губки, у которой этот показатель был в полтора раза ниже (табл. 1).

Таким образом, все виды показали способность к гашению радикалов, однако наибольшей активностью обладали экстракты чаги. При этом прямой связи между содержанием фенолов в экстрактах и их антирадикальной или антиоксидантной активностью не найдено. Вероятно, эти свойства обусловлены наличием и других БАВ в экстрактах грибов.

Таблица 1

Химический состав и антирадикальная активность исследуемых видов

Вид гриба	Обнаруженные группы БАВ	Содержание фенолов, мг/г	Антирадикальная активность в ABTS – тесте, %	Ингибирование продукции NO, %
<i>Inonotus obliquus</i>	простые фенолы, таннины, антрацены	4,9±0,1	93,0±0,2	66,4±1,2
<i>Ganoderma applanatum</i>	простые фенолы, танины	4,8±0,2	18,7±1,2	62,4±0,6
<i>Fomitopsis pinicola</i>	простые фенолы, сапонины, алкалоиды	4,2±0,3	57,4±4,9	68,0±0,2
<i>Piptoporus betulinus</i>	простые фенолы, сапонины	7,1±0,3	75,3±4,0	44,5±1,3

Поскольку изученные виды грибов показали выраженную антиоксидантную активность, было проведено изучение цитотоксического действия экстрактов на нормальные и опухолевые клетки в культуре (табл. 2).

Таблица 2

Влияние экстрактов на животные клетки

Вид гриба	Цитотоксическая активность (IC), %		Пролиферативная активность, %	
	Vero	HeLa	Vero	HeLa
<i>Inonotus obliquus</i>	-	-	37,7±1,2	-
<i>Ganoderma applanatum</i>	-	48,8±2,6	330,8±20,1	-
<i>Fomitopsis pinicola</i>	-	33,3±2,7	12,2±0,9	-
<i>Piptoporus betulinus</i>	-	-	81,2±7,2	-

Водно-спиртовые экстракты всех изученных видов не оказывали цитотоксического действия на линии нормальных клеток, при этом даже стимулировали их рост. Наибольший пролиферирующий эффект обнаружен при использовании экстракта ганодермы (трутовика плоского), что в 8,7 раза больше, чем у чаги. Развитие опухолевых клеток подавляли только трутовик плоский (ганодерма) и трутовик окаймленный. Чага и березовая губка не показали эффекта в данном тесте.

Отсутствие противоракового эффекта у экстракта чаги может быть обусловлено тем, что действующие вещества в ней – меланины, которые не растворимы в этаноле, а экстрагируются водой. При способе выделения веществ, примененном нами экстракции меланинов не происходило.

Выраженный противораковый эффект, наряду с наиболее высокой стимуляцией пролиферации нормальных клеток у ганодермы плоской делает её перспективной для использования вместо ганодермы лакированной (рейши), широко применяемой в азиатской медицине и внесенной в красные книги РФ.

Заключение Изучение химического состава, антиоксидантной и ингибирующей рост опухолевых клеток активности экстрактов чаги и трех других широко распространённых трутовых грибов (*Fomitopsis pinicola*, *Piptoporus betulinus*, *Ganoderma applanatum*) показало, что водно-спиртовые экстракты, полученные из плодовых тел этих видов, содержали широкий спектр биологически активных веществ, в том числе фенолов, и активно подавляли свободнорадикальные процессы *in vitro*. В тестах на культурах клеток было обнаружено, что экстракты всех изученных видов стимулировали рост нормальных клеток. Экстракты трутовика окаймленного и плоского подавляли развитие раковых. При этом чага как вид сравнения уступал ганодерме плоской. Результаты нашего исследования свидетельствуют об актуальности дальнейших исследований состава и биологической активности видов трутовых грибов Урала. В настоящее время в нашей лаборатории проводится фракционирование тотального экстракта, с целью изоляции группы действующих веществ и изучение фракций методом ВЭЖХ-МС.

Библиографический список

1. Иванова Г.А., Сысоева М.А., Зобов В.В. Гепатопротекторные свойства меланинов чаги // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 35. № 9. С. 84–89.
2. Кочунова Н.А. Использование дереворазрушающих грибов класса basidiomycetes в нетрадиционной медицине (Амурская область) // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2014. Т. 51. № 19. С. 112–117.

3. Шашкина М.Я., Шашкин А.В., Сергеев А.В. Чага в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. 2005. Т. 4. № 4. С. 59–72.
4. Alresly Z. et al. Bioactive triterpenes from the fungus *Piptoporus betulinus* // Rec. Nat. Prod. 2015. V. 10. № 1. P. 103–108.
5. Chen L. et al. Analysis of triterpenoids in *Ganoderma resinaceum* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole – time – of – flight mass spectrometry // Int. J. Mass Spectrom. 2019. V. 436. P. 42–51.
6. Hao L. et al. Characterization and antioxidant activities of extracellular and intracellular polysaccharides from *Fomitopsis pinicola* // Carbohydr. Polym. 2016. V. 141. P. 54–59.
7. Jesus L.I. et al. Chemical characterization and wound healing property of a β -D-glucan from edible mushroom *Piptoporus betulinus* // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 117. P. 1361–1366.
8. Ermoshin A.A., Kiseleva I.S., Nikkonen I.V. et al. Antioxidant Activity and Chemical Composition of Extracts from Fruiting Bodies of Xylotrophic Fungi Growing on Birch // Journal of Siberian Federal University. Biology. 2021. V. 14. Iss. 3 (in press).
9. Kamo T. et al. Anti-inflammatory lanostane-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus* // J. Nat. Prod. 2003. V. 66, № 8. P. 1104–1106.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // Journal of immunological methods, 1986. V. 65. P. 55–63.
11. Saltarelli R. et al. Phytochemical composition, antioxidant and antiproliferative activities and effects on nuclear DNA of ethanolic extract from an Italian mycelial isolate of *Ganoderma lucidum* // J. Ethnopharmacol. 2019. V. 231 – 2018. P. 464–473.
12. Sorescu A., Nuta A., Ion R-M., Iancu L. Qualitative analysis of phytochemicals from sea buckthorn and gooseberry. Phytochemicals – Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention. 2018. P. 161–177.
13. Wangun H.V.K. et al. Anti-inflammatory and anti-hyaluronate lyase activities of lanostanoids from *Piptoporus betulinus* // J. Antibiot. 2004. V. 57. № 11. P. 755–758.
14. Zahid M.T. Review of chemical constituents and pharmacology of brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola* // J. Nat. Sci. Res. 2020. V. 10. № 2. P. 58–68.
15. Yoshikawa K. et al. Lanostane triterpenoids and triterpene glycosides from the fruit body of *Fomitopsis pinicola* and their inhibitory activity against COX-1 and COX-2 // J. Nat. Prod. 2005. V. 68. № 1. P. 69–73.
16. Zhang L. et al. Immunopotentiating effect of *Inonotus obliquus* fermentation products administered at vaccination in chickens // Mol. Cell. Probes. 2018. V. 41. P. 43–51.
17. Zhao C. et al. Pharmacological effects of natural *Ganoderma* and its extracts on neurological diseases: A comprehensive review // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 121. P. 1160–1178.
18. Zheng W. et al. 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. V. 87. № 4. P. 1237–1254.
19. Zeyad Alresly. Chemical and pharmacological investigations of *Fomitopsis betulina* (formerly: *Piptoporus betulinus*) and *Calvatia gigantea*: doc. nat. sci. diss. Souieda. 2019. 220 p.

УДК 602.66:612.017.12

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ SARS-COV-2: ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ

А.А. Ильичёв, А.П. Рудомётов, Л.И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия

COVID-19 – пандемия беспрецедентных масштабов в новейшей истории человечества. Менее чем через 18 месяцев с начала пандемии во всем мире зарегистрировано около двухсот миллионов подтвержденных случаев заболевания и четыре миллиона случаев смертей, связанных с COVID-19. Также беспрецедентными являются и усилия по созданию безопасных и эффективных вакцин против SARS-CoV-2. К июлю 2021 г. 184 вакцины-кандидата от COVID-19 находились на стадии доклинических испытаний, 105 – на стадии клинических исследований, а 18 вакцин одобрены для экстренного использования, по крайней мере одним регулирующим органом. Среди них – инактивированные, субъединичные вакцины, а также вакцины на основе вирусных векторов и нуклеиновых кислот. Это первый случай в истории вакцинологии, когда вакцины на основе нуклеиновых кислот были одобрены для использования в программах общественного здравоохранения. К середине 2021 г. по всему миру было использовано для вакцинации три миллиарда доз вакцины против COVID-19, в основном в странах с высоким уровнем доходов.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вакцины, мРНК-вакцины.

Коронавирусы – это большое семейство вирусов, одни из них вызывают заболевания легкой и средней степени тяжести, другие – более серьезные заболевания, среди них ближневосточный респираторный синдром (MERS-CoV) и тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV). В конце 2019 г. в Ухане (Китай) было зарегистрировано заболевание, получившее название COVID-19, вызванная новым коронавирусом – SARS-CoV-2.

Эпидемия SARS-CoV-2 оказала катастрофические последствия на мировую экономику и развитие общества, поэтому исследования по разработке вакцины против SARS-CoV-2 были ускорены для достижения популяционного иммунитета к вирусу и прекращению его передачи [12, 17]. Вакцины – это биологические препараты, обеспечивающие активный приобретенный иммунитет к определенному инфекционному агенту [15]. Считается, что первая вакцина была разработана Эдвардом Дженнером против натуральной оспы в 1796 г. [3], а уже в 1970-х гг. в результате программ вакцинации вирус натуральной оспы был элиминирован из человеческой популяции.

История создания вакцины против SARS-CoV-2 развивалась с невообразимой скоростью. В настоящее время 184 вакцины-кандидата находятся на стадии доклинических исследований, и 104 – на стадии клинических испытаний [18]. Согласно последним данным, зарегистрировано 18 вакцин против SARS-CoV-2, которые в настоящее время используются во всем мире [19]. Разработка вакцины – это обычно длительный процесс, занимающий около 10 лет. Однако недавние успехи в разработке вакцины против COVID-19 показали, что научные инновации, накопившиеся за последние годы, позволили в очень короткие сроки создать вакцины против SARS-CoV-2. Вакцины против SARS-CoV-2 можно разделить на четыре основных типа: 1) цельновирионные вакцины; 2) вакцины на основе белков; 3) векторные вакцины; 4) вакцины на основе нуклеиновых кислот [11].

Цельновирионные вакцины. Цельновирионные вакцины представляют собой ослабленную (аттенуированную) или инактивированную форму вируса. В живых аттенуированных вакцинах используется ослабленная форма вируса, которая может размножаться, но не вызывает инфекционного процесса [11]. Инактивированные вакцины содержат вирусы, убитые под воздействием температуры, химикатов или радиации, поэтому они не могут инфицировать клетки и размножаться, но могут вызывать желаемый иммунный ответ [5]. Оба типа цельновирионных вакцин представляют собой проверенные временем препараты, которые составляют основу многих существующих вакцин, например, против кори, полиовируса, желтой лихорадки, сезонного гриппа и ряда других [14]. В настоящее время в клинической разработке находятся 16 инактивированных и две аттенуированные вакцины против SARS-CoV-2 [18]. Важным преимуществом живых аттенуированных вакцин против SARS-CoV-2 является стимуляция устойчивого мукозального и клеточного иммунного ответа [4]. Однако у этого типа препаратов есть определённые недостатки, одним из них является тот факт, что вирус SARS-CoV-2 выделяется с фекалиями инфицированных пациентов [2, 20]. Это дает основания к тому, что живые ослабленные вакцины SARS-CoV-2 могут также выделяться с фекалиями и приводить к заражению вирусом. Использование аттенуированной вакцины против SARS-CoV-2 может также увеличить риск рекомбинации между вакцинным штаммом и циркулирующим вирусом дикого типа, приводя к образованию новых вирусных вариантов. Кроме того, производство аттенуированной вакцины является весьма трудоемким процессом и требует строгого контроля качества, что замедляет крупномасштабное производство.

На данный момент по крайней мере две инактивированные вакцины-кандидата против SARS-CoV-2 были одобрены для использования в экстренных случаях [18, 19].

Вакцины на основе рекомбинантных белков. Существует два типа вакцин на основе белков: субъединичные вакцины и вакцины на основе вирусоподобных частиц [1]. Вакцины на основе белковых субъединиц состоят из рекомбинантных вирусных антигенных фрагментов, полученных с помощью методов генетической инженерии [6]. Их легко производить, они относительно безопасны и менее реактогенны по сравнению с цельновирионными вакцинами. Ограничением белковых субъединичных вакцин является их низкая иммуногенность, поэтому для повышения их иммуногенности обычно используются адъюванты [8, 11]. В настоящее время на стадии клинических исследований находятся 33 вакцины на основе белковых субъединиц SARS-CoV-2 [18], причем одна из них, как было показано в клинических испытаниях фазы III, индуцирует высокие титры нейтрализующих антител [7].

Помимо вакцин на основе белковых субъединиц, разрабатываются, другие вакцины, называемые «вирусоподобными частицами», представляющие собой пустые вирусные оболочки, которые имитируют структуру вируса, но не являются инфекционными, поскольку в них отсутствует генетический материал патогена [1, 10]. В настоящее время на стадии клинических исследований находятся пять вакцин такого типа [18].

Вакцины на основе вирусных векторов. Векторные вакцины создаются на базе уже изученных вирусов, в геном которых встраивают ген, который несет в себе небольшую часть генома целевого патогена, например, SARS-CoV-2 [2]. Попадая в клетки макроорганизма (может быть в антиген презентующие клетки) вирус-носитель приводит к синтезу белков целевого патогена. Таким образом запускается специфический иммунный ответ. Вирусный вектор действует как система доставки, предоставляя средства для проникновения в клетку и синтеза антигенов SARS-CoV-2. Вирус, используемый в качестве переносчика, ослаблен, поэтому он не может вызывать заболевание [8, 13]. В качестве векторов использовались ви-

русы везикулярного стоматита, кори, коровьей оспы и аденовирусы. Вирусные векторы можно разделить на те, которые способны реплицироваться в клетках, и те, в которых гены для репликации выключены [11, 13, 14]. До появления SARS-CoV-2 только одна вирусная векторная вакцина была одобрена для вакцинации человека — это вакцина против вируса Эбола [16]. В качестве вектора для этой вакцины использовался вирус везикулярного стоматита. Одним из недостатков векторных вакцин является то, что у людей, ранее инфицированных вирусом, на основе которого был сделан препарат вакцины, развивается иммунный ответ на вектор, что может существенно снизить эффективность вакцинации [1].

В настоящее время на стадии клинических исследований находятся 16 кандидатных вакцин против SARS-CoV-2, полученные на основе нереплицирующихся векторов, и два — на основе реплицирующихся векторов [18]. Ряд векторных вакцин против SARS-CoV-2 были одобрены регулирующими органами по всему миру для использования в экстренных случаях [19].

Вакцины на основе нуклеиновых кислот. Вакцины на основе нуклеиновых кислот используют генетические инструкции в форме дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК), кодирующие белковые антигены SARS-CoV-2, которые вызывают иммунный ответ. До COVID-19 эта платформа не была апробирована, поскольку ни одна из существующих лицензированных вакцин не использовала эту технологию. ДНК-вакцина представляет собой плазмиду, несущую нуклеотидную последовательность, кодирующую определённый антиген или антигены [4, 13]. Основным компонентом РНК-вакцин является матричная РНК (мРНК), кодирующая интересующий антиген [4, 13]. ДНК- или РНК-вакцины могут быть инкапсулированы в наночастицы или введены в клетки, с использованием, например, методов электропорации. Попадая внутрь клетки ДНК- и РНК-вакцины обеспечивают синтез целевых антигенов, которые могут презентироваться на поверхности клетки или секретироваться из клетки. Эти антигены могут быть обнаружены иммунной системой и вызвать ответную реакцию, включая активацию цитотоксических Т-лимфоцитов (которые ищут и убивают инфицированные клетки), а также активацию В-лимфоцитов и Т-хелперов, которые обеспечивают выработку специфических антител [8, 14].

В настоящее время в стадии клинических исследований находится не менее 10 вакцин-кандидатов на основе ДНК и 18 вакцин-кандидатов на основе РНК [18]. Несколько мРНК-вакцин против SARS-CoV-2 были одобрены для использования в экстренных случаях [19]. Это первый случай в истории вакцинологии, когда вакцина на основе нуклеиновой кислоты была одобрена для использования в общественном здравоохранении.

Внедрение вакцины против COVID-19. К середине 2021 г. во всем мире было произведено более трех миллиардов доз вакцины против COVID-19, и 24% населения мира получили хотя бы одну дозу вакцины от COVID-19 [9]. Среди стран, которые к середине 2021 г. вакцинировали не менее 50% своих граждан от COVID-19, следует отметить Великобританию, Чили, Уругвай, Израиль, Бахрейн, Венгрию, Италию, Испанию, Германию, Соединенные Штаты Америки и Францию. При этом в странах с низким уровнем дохода к концу июня 2021 г. только 1% людей получили дозу вакцины против COVID-19. В Африке было введено только 53 миллиона доз вакцины [9].

Тем не менее достижения в области вакцинологии против COVID-19 обнадеживают, потому что это первый случай, когда разработка вакцины заняла так мало времени. Среди вопросов, которые следует учитывать для будущих вакцин против COVID-19, следует отметить разработку термостабильных вакцин, которые можно легко распространять в тропических условиях, прежде всего для стран с ограниченными ресурсами. Страны во всем мире,

независимо от политических идеологий, могут объединиться и работать вместе, чтобы добиться быстрого и успешного внедрения вакцины против COVID-19 во всем мире.

Работа выполнена в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

Библиографический список

1. Callaway E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide // Nature. 2020. P. 576–577.
2. Chen Y., Li L. SARS-CoV-2: virus dynamics and host response // The Lancet Infectious Diseases. 2020. V. 20. № 5. P. 515–516.
3. Ellis H. James Phipps, first to be vaccinated against smallpox by Edward Jenner // Journal of Perioperative Practice. 2021. V. 31. № 1–2. P. 51–52.
4. Frederiksen L.S.F., Zhang Y., Foged C., Thakur A. The long road toward COVID-19 herd immunity: vaccine platform technologies and mass immunization strategies // Frontiers in immunology. 2020. V. 11. P. 1817.
5. Gao Q., Bao L., Mao H. et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 // Science. 2020. V. 369. P. 77–81.
6. Hsieh C.L., Goldsmith J.A., Schaub J.M. et al. Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes // Science. 2020. V. 369. №. 6510. P. 1501–1505.
7. Keech C., Albert G., Cho I. et al. Phase 1–2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine // New England Journal of Medicine. 2020. V. 383. № 24. P. 2320–2332.
8. Lemaire D., Barbosa T., Rihet P. Coping with genetic diversity: the contribution of pathogen and human genomics to modern vaccinology // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2012. V. 45. P. 376–385.
9. Mathieu E., Ritchie H., Ortiz-Ospina E. et al. A global database of COVID-19 vaccinations // Nature human behavior. 2021. P. 1–7.
10. Mavundza E.J., Wiyeh A.B., Mahasha P.W. et al. A systematic review of immunogenicity, clinical efficacy and safety of human papillomavirus vaccines in people living with the human immunodeficiency virus // Human vaccines & immunotherapeutics. 2020. V. 16. № 2. P. 426–435.
11. Nagy A., Alhatlani B. An overview of current COVID-19 vaccine platforms // Computational and structural biotechnology journal. 2021. P. 2508–2517.
12. Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Sah R. et al. SARS-CoV-2/COVID-19 and advances in developing potential therapeutics and vaccines to counter this emerging pandemic // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2020. № 19. V. 1. P. 1–37.
13. Rauch S., Jasny E., Schmidt K. E. et al. New vaccine technologies to combat outbreak situations // Frontiers in immunology. 2018. V. 9. P. 1963.
14. Rodrigues A.F., Soares H.R., Guerreiro M.R. et al. Viral vaccines and their manufacturing cell substrates: new trends and designs in modern vaccinology // Biotechnology journal. 2015. V. 10. № 9. P. 1329–1344.
15. Sell S. How vaccines work: immune effector mechanisms and designer vaccines // Expert review of vaccines. 2019. V. 18. № 10. P. 993–1015.
16. Tomori O., Kolawole M. O. Ebola virus disease: current vaccine solutions // Current Opinion in Immunology. 2021. V. 71. P. 27–33.
17. Uttarilli A., Amalakanti S., Kommoju P.R. et al. Super-rapid race for saving lives by developing COVID-19 vaccines // Journal of Integrative Bioinformatics. 2021. V. 18. № 1. P. 27–43.

18. WHO COVID-19 Vaccine Tracker and Landscape. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (дата обращения: 11.09.2021).
19. WHO Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ Evaluation Process. URL: https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_COVID_VAX_29_June2021.pdf (дата обращения: 11.09.2021).
20. Xing Y.H., Ni W., Wu Q. et al. Prolonged viral shedding in feces of pediatric patients with coronavirus disease 2019 // Journal of microbiology, immunology and infection. 2020. V. 53. № 3. P. 473–480.

УДК 571.27

МАТРИЧНАЯ РНК В ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Ильичёв, С.В. Шарабрин, А.П. Рудометов, Л.И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Роспотребнадзор, Кольцово, Новосибирская область, Россия

мРНК-вакцины – одна из новых, но наиболее быстро развивающихся платформ, которая в настоящее время активно внедряется для разработки профилактических и терапевтических вакцин против инфекционных и онкологических заболеваний. В данной работе кратко описано применение мРНК-вакцин для лечения онкологических заболеваний, типы противораковых мРНК-вакцин.

Ключевые слова: мРНК-вакцина, терапия рака, противораковая вакцина.

Основной действующей частью мРНК-вакцины является матричная РНК (мРНК), кодирующая белок-антиген. Помимо РНК, в вакцине присутствует оболочка, защищающая РНК от разрушения и обеспечивающая её проникновение в клетку-мишень. Когда мРНК попадает в клетку, клеточные механизмы синтеза белков обеспечивают синтез закодированного в РНК белка-антигена [16]. Более подробно мы описали технологию создания мРНК в статье [8] и в другой статье в данном сборнике (Карпенко Л.И. и др. Технологии м-РНК для создания вакцин и средств терапии). В данной работе мы остановимся более подробно на применении мРНК в терапии онкологических заболеваний.

Преимущества технологии мРНК-вакцин. Несмотря на разработку различных платформ для создания противораковых вакцин, мРНК-вакцины имеют ряд преимуществ: во-первых, мРНК может одновременно кодировать несколько антигенов или полный белок с эпитопами, узнаваемыми как МНСI, так и МНСII, для индукции как гуморального, так и клеточного противоопухолевого иммунного ответа. Во-вторых, по сравнению с ДНК-вакциной, мРНК-вакцины не могут интегрироваться в геном, быстро элиминируются из организма и не обладают потенциалом инсерционного мутагенеза. В-третьих, по сравнению с белками, производство мРНК не содержит клеточных и патогенных вирусных компонентов, что исключает возможность инфицирования. В-четвёртых, большинство мРНК-вакцин, тестируемых в различных клинических испытаниях, хорошо переносятся и практически не имеют побочных реакций, с редкими случаями эритемы в месте инъекции [3]. В-пятых, это быстрое и масштабируемое производство мРНК. Это позволяет производить вакцины в те-

ние очень короткого периода времени и быстро поменять закодированный антиген в случае его неэффективности.

Способы доставки противораковой мРНК-вакцины. Из-за нестабильности РНК введение мРНК-вакцин требует её упаковки в какой-либо носитель. Разрабатываются различные способы доставки, в том числе на основе липидных наночастиц (LNP), полимеров, пептидов, катионных наноэмульсий и многих других, включая комбинации этих методов [10, 21]. Также можно использовать генную пушку либо электропорацию. Кроме того, можно вводить «голую» мРНК-вакцину непосредственно в дендритные клетки *ex vivo*, либо в орган-мишень. В условиях *ex vivo* незрелые дендритные клетки получают из периферической крови пациентов. После созревания в них загружается мРНК, кодирующая антиген. Затем трансфицированные клетки вводятся обратно пациентам.

Пути введения противораковой мРНК-вакцины. При инфекционных заболеваниях для введения мРНК-вакцины используют один из способов доставки мРНК (липиды, полимеры и тд), и вводят вакцину классическим способом, внутримышечно или подкожно. При лечении рака, в/м и п/к путь введения часто является предпочтительным из-за гибкости объема инъекции, простоты дозирования [15]. Иммуностимулирующую мРНК-вакцину целесообразно вводить непосредственно в опухоль, её окружение либо в региональные лимфоузлы для повышения терапевтического эффекта.

Интранодальная доставка облегчает доставку антигена к антигенпрезентирующим клеткам (АПС). Множество исследований продемонстрировало эффективность данного метода [12, 13, 19]. В частности, в работе [19] было показано, что интранодальное введение мРНК-вакцины против меланомы, совместно с активирующим дендритные клетки Fms-подобным лигандом тирозинкиназы 3 в качестве адъюванта, вызывало улучшенное праймирование и распространение CD8 + Т-клеток в лимфоидных органах, и повышала их противораковую активность [12].

Внутриопухолевое введение целесообразно для применения мРНК, кодирующих иммуномодуляторы. В исследовании внутриопухолевая доставка мРНК показывала терапевтический потенциал, совместно с блокированием взаимодействий PD-1 и PD-L1 [18]. Хороший эффект был продемонстрирован и в других работах [7, 20].

Ряд противораковых вакцин на основе мРНК в настоящее время проходит клинические испытания. Они подразделяются на мРНК, кодирующие иммуностимуляторы, различные ТАА или персонализированные неоантигены. Основными разработчиками данных вакцин являются пионеры в области мРНК, компании CureVac, BioNTech и Moderna [14].

мРНК, кодирующие иммуностимуляторы. Группа иммунотерапевтических средств на основе мРНК, кодирующие иммуностимуляторы, которые представляют собой цитокины или хемокины (например, IL-12, IL32, OX40L, CD40L, CD70 и др.). Они вводятся внутриопухолевым или интранодальным путем для индукции созревания и активации АПС, активируют Т-клеточный иммунитет и регулируют супрессированное микроокружения опухоли. Эти иммуностимуляторы не считаются противораковыми вакцинами, но обычно вводятся совместно с ними или другими иммунотерапевтическими препаратами и действуют как адъюванты для усиления гуморального и клеточного ответа. Большинство исследований в настоящее время находится в фазе I / II для оценки переносимости в качестве монотерапии или комбинированной терапии с другими препаратами, включая либо антитела PD-1 / PD-L1, либо противораковые вакцины.

Одним из пионеров в этой области является компания eTheRNA. Она разработала адъювант на основе мРНК TriMix, который состоит из трех молекул голой мРНК, кодирующих

костимулирующую молекулу CD70 для индукции активации CD8 + Т-клеток, лиганд стимулятора активации CD40 (CD40L) для активации CD4 + Т-клеток и конститутивно активный TLR4 для облегчения презентации антигена DC. Доставка мРНК, кодирующей опухоль-ассоциированные антигены TAA (например, MAGE-A3, тирозиназу, gp-100 и мелано-A / MART-1) и мРНК TriMix в DC, *ex vivo* или *in situ*, может перепрограммировать их в зрелые APC, а затем активировать Т-клетки. В двух исследованиях фазы II (NCT01676779, NCT01302496) по лечению пациентов с меланомой III / IV стадии в виде отдельного препарата либо в сочетании с другими препаратами вакцина вызвала мощный иммунный ответ, что в свою очередь привело к многообещающему клиническому ответу и продлению безрецидивной выживаемости [9]. Другая мРНК компания, Moderna, разработала mRNA-2416 (NCT03323398) и mRNA-2752 (NCT03739931), инкапсулированные в LNP, для внутриопухолевой иммуностимулирующей активности, которые так же показали хорошие результаты против лимфомы [6].

мРНК вакцины, кодирующей опухоль-ассоциированные антигены (TAA). Одним из основных препятствий на пути к разработке эффективной противораковой вакцины является трудность выбора антигена. Раковые вакцины могут быть разработаны для нацеливания на TAA, которые предпочтительно экспрессируются в злокачественных клетках. Например, тирозиназа, gp100, MAGE-A3, MAGE-C2 были идентифицированы как TAA для меланомы. Смесь мРНК-вакцин, кодирующих все TAA, использовалась для лечения метастатической меланомы во многих клинических исследованиях [9].

В одном клиническом исследовании (NCT02410733) мРНК-вакцина (BNT111), кодирующая четыре TAA (NY-ESO-1, MAGE-A3, тирозиназу и TPTE), оценивалась у пациентов с запущенной меланомой. Результаты показали, что три пациента генерировали Т-клеточные ответы против NY-ESO-1, двое из которых также проявляли ответы против MAGE-A3 [11]. Недавно BioNTech объявила о стратегическом сотрудничестве с Regeneron, чтобы начать клиническое испытание фазы II, объединяющее BNT111 с Regeneron Libtayo, полностью гуманизированную терапию анти-PD-1 у пациентов с анти-PD1-резистентной / рецидивирующей, неоперабельной стадией III или IV. кожная меланома [17].

Компания CureVac разработала мРНК вакцину CV9202, содержащую мРНК, кодирующие 6 различных TAA NSCLC (MUC-1, surviving, Trophoblast Glycoprotein, NY-ESO-1, MAGE-C1 и MAGE-C2) для лечения НМРЛ. Вакцины с голой мРНК TAA доставлялись совместно с комплексами протамин / мРНК. Повышенный антиген-специфического иммунного ответа наблюдался у большинства пациентов (84%). Увеличивается количество как антиген-специфических антител, так и Т-клеток [16].

Несколько препятствий ограничивают широкое применение вакцин TAA: во-первых, было идентифицировано ограниченное количество TAA для некоторых типов рака, что приводит к ограничению применения; во-вторых, у некоторых пациентов наблюдается значительная вариабельность TAA, что также приводит к уклонению от иммунного ответа и выработки устойчивости; в-третьих, некоторые TAA присутствуют в нормальных тканях.

мРНК вакцина, кодирующая неоантигены (TSA), персонализированная вакцина. Опухолевые антигены, называемые неоантигенами, в настоящее время являются основными мишенями мРНК-вакцин. Неоантигены происходят из случайных соматических мутаций в опухолевых клетках и не присутствуют в нормальных клетках. Они могут распознаваться иммунной системой хозяина как «чужой» мотив и, таким образом, являются привлекательной мишенью для противораковой вакцины [5].

Первым шагом в разработке персонализированной неоантигенной вакцины является идентификация и подтверждение специфичных для пациента иммуногенных несинонимичных соматических мутаций, экспрессируемых в опухоли. Биопсия опухолевой ткани берется для секвенирования всего экзона, РНК или транскриптома. Несинонимичные соматические мутации при раке, такие как точечные мутации и вставки-делеции, могут быть идентифицированы путем сравнения последовательностей опухоли и соответствующих здоровых тканей. Затем мутации с наивысшей иммуногенностью проверяются, анализируются и идентифицируются с использованием алгоритмов предсказания эпитопа МНС I класса. Ранжированные списки кандидатов на антигены дополнительно подтверждаются на основании результатов анализа связывания *in vitro*. Вакцина на основе неоантигена может служить мишенью для различных типов вариантных мутаций [5].

На данный момент проходят многочисленные клинические испытания, посвященные изучению безопасности и эффективности мРНК-вакцины, кодирующей неоантигены. Например, Moderna и Merck совместно разработали мРНК-5671, персонализированную вакцину Kras (кодирующую неоантигены KRAS), для лечения пациентов с раком поджелудочной железы. Эта вакцина сейчас проходит фазу I клинических испытаний [2]. Результаты свидетельствуют о развитии противоопухолевого иммунного ответа и о хорошей переносимости препарата. Другой продукт – мРНК-4157, персонализированная вакцина, инкапсулированная в LNP, для лечения пациентов с резектированными солидными опухолями, включая меланому, карциному мочевого пузыря и NSCLC, в виде монотерапии или в комбинации с пембролизумабом (NCT03313778). Моно- и комбинированная терапия пембролизумабом на основе мРНК-4157 показала приемлемый профиль безопасности наряду с хорошими неоантиген-специфическими Т-клеточными ответами. Сообщалось, что у двенадцати из тринадцати пациентов, получавших монотерапию, не было побочных реакций [1].

Существует ряд проблем при разработке противораковых вакцин по сравнению с вакцинами против инфекционных болезней: во-первых, большинство вакцин против инфекционных болезней являются профилактическими, тогда как противораковые вакцины являются терапевтическими. Только две профилактических противораковых вакцины одобрены FDA, и они применяются для предотвращения вирус-индуцированных злокачественных новообразований (ВПЧ и ВГВ), т.е. по факту являются противовирусными [4]. Во-вторых, большинство антигенов инфекционных заболеваний представляют собой экзогенные мотивы, обычно представленные молекулой МНСII. Вакцины, нацеленные на эти экзогенные антигены, вызывают гуморальный ответ, опосредованный нейтрализующими антителами. В некоторых случаях частично задействован и необходим опосредованный CD4 + Т-клетками иммунный ответ, тогда как цитотоксические Т-клетки CD8 + играют решающую роль в очищении от злокачественных клеток с соматическими мутациями. Таким образом, противораковая терапевтическая вакцина не только должна усиливать гуморальный ответ, CD4 + Т-клеточный ответ, но также должна активировать ответы CD 8+Т-клеток. Еще одним серьезным препятствием для разработки эффективных противоопухолевых вакцин является выбор опухоле-специфических антигенов. Опухолевые антигены сильно различаются у разных людей, а некоторые из них менее иммуногенны и могут нарушать распознавание иммунной системой хозяина. Даже если антиген является иммуногенным, подавляющее микроокружение может предотвратить эффективную инфильтрацию Т-клеток и вызвать их истощение. Наконец, в качестве терапевтической вакцины для лечения хронического заболевания, такого как рак, требуется многократное / повторяемое дозирование с более высокой дозировкой, чем у профилактических вакцин, что повышает критерии безопасности как для мРНК, так и для носителей.

После одобрения двух вакцин мРНК для предотвращения COVID-19 значительно выросло количество доклинических и клинических исследований мРНК-вакцин в области как рака, так и инфекционных заболеваний. Множественные клинические исследования, проведенные пионерами в создании первых разрешенных к применению мРНК-вакцин – компании BioNTech и Moderna, уже представили многообещающие результаты с использованием персонализированных вакцин по лечению множественных солидных опухолей, включая метастатическую меланому и агрессивный рак поджелудочной железы, открывая новую эру для терапевтической противораковой вакцины.

Библиографический список

1. Burris H.A. A phase I multicenter study to assess the safety, tolerability, and immunogenicity of mRNA-4157 alone in patients with resected solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with unresectable solid tumors. 2019.
2. Cafri G., Gartner J.J., Zaks T. et al. mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer // *J. Clin. Invest.* 2020. № 130(11). P. 976–988.
3. Faghfuri E., Pourfarzi F., Faghfour A.H. et al. Recent developments of RNA-based vaccines in cancer immunotherapy // *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2020. P. 1–8.
4. Guo C., Manjili M.H., Subjeck J.R. et al. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future // *Adv Cancer Res.* 2013. № 119. P. 421–475.
5. Guo Y., Lei K., Tang L. Neoantigen vaccine delivery for personalized anticancer immunotherapy // *Front Immunol.* 2018. № 9. P.1499.
6. Hewitt S.L., Bai A., Bailey D. et al. Durable anticancer immunity from intratumoral administration of IL-23, IL-36gamma, and OX40L mRNAs // *Sci. Transl. Med.* 2019. Vol. 11(477). P. 9143.
7. Hewitt S.L., Bailey D., Zielinski J. et al. Intratumoral interleukin-12 mRNA therapy promotes TH1 transformation of the tumor microenvironment // *Clin. Cancer Res.* 2020. Vol. 26. P. 6284-6298. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0472.
8. Ilyichev A.A., Orlova L.A., Sharabrin S.V. et al. mRNA technology as one of the promising platforms for the SARS-CoV-2 vaccine development // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* 2020. Vol. 24. P. 802–807.
9. Jansen Y., Kruse V., Corthals J. et al. A randomized controlled phase II clinical trial on mRNA electroporated autologous monocyte-derived dendritic cells (TriMixDC-MEL) as adjuvant treatment for stage III/IV melanoma patients who are disease-free following the resection of macrometastases // *Cancer Immunol Immunother.* 2020. Vol. 69(12). P. 2589–2598.
10. Karpenko L.I., Rudometov A.P., Sharabrin S.V. et al. Delivery of mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 Using a Polyglucin: Spermidine Conjugate // *Vaccines.* 2021. Vol. 9. P. 76.
11. Kranz L.M., Diken M., Haas H. et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy // *Nature.* 2016. Vol. 534(7607). P. 396–401.
12. Kreiter S., Diken M., Selmi A. et al. FLT3 ligand enhances the cancer therapeutic potency of naked RNA vaccines // *Cancer Res.* 2011. Vol. 71. P. 6132-6142. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0291.
13. Kreiter S., Selmi A., Diken M. et al. Intranodal vaccination with naked antigen-encoding RNA elicits potent prophylactic and therapeutic antitumoral immunity // *Cancer Res.* 2010. Vol. 15. № 70(22). P. 9031–9040. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0699. Epub 2010 Nov 2. PMID: 21045153.
14. Miao L., Zhang Y., Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy // *Mol Cancer.* 2021. Vol.20(1). P. 41. DOI: 10.1186/s12943-021-01335-5. PMID: 33632261; PMCID: PMC7905014.

15. Ols S., Yang L., Thompson E.A. et al. Route of vaccine administration alters antigen trafficking but not innate or adaptive immunity // Cell Rep. 2020. Vol. 30(12). P. 3964–3971.
16. Papachristofilou A., Hipp M.M., Klinkhardt U. et al. Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BI1361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer // J. Immunother Cancer. 2019. Vol. 7(1). P. 38.
17. Shi Y. Clinical translation of Nanomedicine and biomaterials for Cancer immunotherapy: Progress and perspectives // Adv. Ther. 2020. Vol. 3(9). P. 9.
18. Van der Jeught K., Joe P.T., Bialkowski L. et al. Intratumoral administration of mRNA encoding a fusokine consisting of IFN- β and the ectodomain of the TGF- β receptor II potentiates antitumor immunity // Oncotarget. 2014. Vol. 5. P. 10100–10113. DOI:10.18632/oncotarget.2463.
19. Van Lint S., Goyvaerts C., Maenhout S. et al. Preclinical evaluation of TriMix and antigen mRNA-based antitumor therapy // Cancer Res. 2012. Vol. 72. P. 1661–1671. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2957.
20. Van Lint S., Renmans D., Broos K. et al. Intratumoral delivery of TriMix mRNA results in T-cell activation by cross-presenting dendritic cells // Cancer Immunol. Res. 2016. Vol. 4. P. 146-156. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0163.
21. Wadhwa A., Aljabbari A., Lokras A. et al. Opportunities and challenges in the delivery of mrna-based vaccines // Pharmaceutics. 2020. Vol. 12. P. 102.

УДК 571.27

ТЕХНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ м-РНК ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИН И СРЕДСТВ ТЕРАПИИ

Л.И. Карпенко, С.В. Шарабрин, А.П. Рудометов, А.А. Ильичёв

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Роспотребнадзор, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

мРНК-вакцины – одна из новых, но наиболее быстро развивающихся платформ, которая в настоящее время активно внедряется для разработки профилактических и терапевтических вакцин против инфекционных и онкологических заболеваний. В данной работе кратко рассмотрены особенности технологии мРНК-вакцин, их преимущества, классификация, подходы к повышению стабильности и способы доставки.

Ключевые слова: мРНК-вакцина, мРНК, модификация мРНК, доставка мРНК.

Что же представляет собой мРНК-вакцина? Основной действующей ее частью является матричная РНК (мРНК), кодирующая белок, характерный для патогена. Помимо РНК, в вакцине присутствует оболочка, защищающая РНК от разрушения и обеспечивающая её проникновение в клетку-мишень. Когда мРНК попадает в клетку, клеточные механизмы синтеза белков обеспечивают синтез закодированного в РНК белка-антигена. Иммунная система организма обнаруживает антиген и обеспечивает формирование специфического иммунного ответа. Важно отметить, что мРНК-вакцины способны эффективно активизировать оба звена иммунитета – Т-клеточный и гуморальный ответы [30].

Возможность использования мРНК для индукции клеточного и гуморального иммунного ответа была продемонстрирована ещё в начале 1990-х гг. [8, 9], однако существенного прогресса в технологии получения мРНК-вакцин не было до 2020 г. Основными проблемами использования этой технологии были нестабильность самой молекулы мРНК и неэффективность системы её доставки. Эти проблемы частично были решены в последние годы [18]. Существенный скачок развития технологии мРНК вакцин получила во время пандемии COVID-19 [5, 6, 12]. На данный момент в мире разрабатывается более 10-ти вариантов мРНК-вакцин против SARS-CoV-2 – две из них оказались первыми вакцинами, лицензированными для профилактики COVID-19 [21].

Классификация и структура мРНК вакцин. Вакцины на основе мРНК разделяют на два типа: нереплицирующиеся и самореплицирующиеся [11].

Нереплицирующаяся мРНК-вакцина — это мРНК, кодирующая аминокислотную последовательность целевого белка-иммуногена, со всеми элементами, необходимыми для процесса трансляции на рибосоме. Обычная нереплицирующаяся мРНК состоит из кэпа, 5'-нетранслируемой области (UTR), открытой рамки считывания (ORF), кодирующей вакцинные антигены, 3'-UTR и поли (А) хвоста. Все структурные элементы играют важную роль в стабильности и эффективности трансляции мРНК. Эти элементы позволяют регулировать активность мРНК за счёт привлечения ряда транскрипционных факторов к цис-регуляторным 5'-UTRs / 3'-UTRs, чтобы контролировать скорость трансляции и период полужизни молекулы [4]. Каждый элемент играет важную роль в стабилизации структуры мРНК, контроле взаимодействия с рибосомами и влиянии на эффективность трансляции. Обычно мРНК-вакцины характеризуются небольшим размером, простой структурой и включением только одной ORF, кодирующей вакцинные антигены. Таким образом, для разработки эффективной мРНК вакцины необходимо продлить период и повысить уровни экспрессии мРНК *in vivo*, за счёт поиска и создания новых регуляторных областей.

Самореплицирующиеся мРНК-вакцины – это репликоны, сконструированные на основе положительных одноцепочечных РНК-вирусов, таких как альфа- и флавивирусы. Данные репликоны обычно состоят из двух частей: одна из них кодирует неструктурные белки, обеспечивающие репликацию вирусной РНК, тогда как другая – целевой белок-иммуноген [11]. Для самореплицирующихся РНК-вакцин характерен более высокий и продолжительный уровень экспрессии целевого гена по сравнению с нереплицирующимися аналогами. Однако эти РНК-репликоны очень чувствительны к размеру целевой встройки. Кроме того, большой размер вектора (около 10 кб) может ограничивать эффективность интернализации клеток [24]. В данной статье мы остановимся более детально на рассмотрении нереплицирующихся мРНК-вакцин.

Повышение стабильности мРНК. Серьёзная проблема мРНК-вакцин – их низкая стабильность. Голая РНК быстро разрушается рибонуклеазами. Для стабилизации долгоживущей РНК клеточная система использует модифицированные нуклеотиды, например псевдоуридин, а также метилированные нуклеотиды, которые выполняют регуляторную функцию и играют важную роль в регуляции трансляции [26]. Чтобы синтезировать кодируемые белки, РНК-вакцина должна избегать врожденной иммунной системы организма, которая способна подавлять трансляцию чужеродной мРНК [23]. Включение химически модифицированных нуклеотидов способствует как повышению стабильности мРНК, так и приводит к снижению иммуногенности векторов.

Многие ученые заменили цитидин на 5-метилцитидин (m5C), уридин на псевдоуридин (ψ), N1-метилпсевдоуридин (m1 ψ) и 5-метилуридин (m5U), аденозин на N1-метиладенозин (m1A) и N6-метиладенозин (m6A), [27]. Среди них m5C и ψ предпочтительны в модифика-

циях пар оснований, поскольку они одновременно снижают иммуногенность и повышают эффективность трансляции.

Способы доставки мРНК-вакцин. Важным, но не до конца отработанным элементом технологии мРНК-вакцин, является доставка. Для выполнения своей задачи мРНК должна попасть в цитоплазму клетки, где происходит трансляция закодированного в ней белка. Описан ряд методов доставки мРНК: введение вакцины с помощью электропорации, инъекционно – в мышцы, лимфатические узлы или непосредственно в органы, а также интраназально, ректально или перорально [28]. Кроме того, разработаны новые вакцины с мРНК на основе дендритных клеток для индукции адаптивного иммунитета.

Помимо клеточной мембраны препятствием для мРНК-вакцинации является ее деградация различными внеклеточными рибонуклеазами, которые в избытке присутствуют в тканях и межклеточном пространстве [10]. Из-за нестабильности мРНК-вакцин и их деградации нуклеазами, для доставки и защиты мРНК используют ряд подходов. Липидные наночастицы на сегодняшний день – одни из наиболее часто применяемых средств доставки мРНК. Стандартные липидные наночастицы состоят из четырех компонентов, включая катионный липид, холестерин, а также вспомогательные фосфолипиды и полиэтиленгликоль.

Значительный потенциал для доставки нуклеиновых кислот имеют такие катионные полимерные материалы, как дендримеры, полиэтиленмин, полисахариды [15] и др. Возможна доставка с использованием катионных пептидов, за счёт электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной мРНК [20]. Кроме того, можно использовать генную пушку и электропорацию [3,17].

Преимущества мРНК-вакцин. Вакцины на основе мРНК имеют ряд преимуществ в сравнении с другими типами вакцин, такими как классические (на основе «живого», аттенуированного или инактивированного вирусов), белковые и ДНК-вакцины.

В первую очередь это безопасность. Известно, что мРНК, в отличие от классических вирусных вакцин, неинфекционны и обладают низкой реактогенностью. В сравнении с ДНК-вакциной мРНК не может интегрироваться в геном клеток и вызывать мутации [16]. Таким образом, отсутствует риск инсерции чужеродной генетической информации в геном пациента. Матричная РНК, являясь минимальным генетическим вектором, не приводит к антивекторному иммунному ответу, наблюдаемому при использовании вирусных носителей, а, следовательно, может вводиться повторно. Матричная РНК подвержена физиологическому разрушению в результате процессов, происходящих в клетке. Период ее полувыведения можно регулировать с помощью модификаций последовательности РНК и различных способов доставки [7]. Безопасность мРНК вакцин была подтверждена в клинических испытаниях на людях [1, 2].

Кроме того, важным отличием является отсутствие строгого контроля температуры для хранения препаратов на основе мРНК. В настоящее время большинство используемых вакцин необходимо транспортировать и хранить в непрерывном процессе холодовой цепи, что вызывает серьезные трудности с их доставкой в отдаленные регионы. Лиофилизированная мРНК-вакцина может быть стабильной при 5–25 °С в течение 36 мес.

Существенным преимуществом мРНК-вакцин является быстрое недорогое масштабируемое и однотипное производство, обеспечивающее высокие выходы желаемого продукта в условиях *in vitro*. Масштаб массового производства опирается на науку, которая имеет решающее значение для увеличения скорости производства. Оценка трансляции белка с мРНК *in vitro* позволяет быстро отбирать составы и конструкции в доклинических и клинических исследованиях [13], что позволяет быстро пройти все этапы разработки вакцины. Этот параметр крайне важен для создания вакцин против вирусных патогенов, основной проблемой

борьбы с которыми является временной разрыв между эпидемией и разработкой вакцины. Для предотвращения вспышек вновь возникающих и быстро эволюционирующих патогенов первостепенное значение имеет скорость реагирования на пандемию путем создания профилактической вакцины. Так, американские разработчики мРНК-вакцины против SARS-CoV-2 (компания Moderna Inc. совместно с Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний, NIAID) создали прототип вакцины мРНК-1273 в беспрецедентно короткие сроки. Потребовалось всего 63 дня от выбора вирусной последовательности для создания вакцины до проведения первой фазы клинических испытаний [14].

мРНК-вакцины против инфекционных и онкологических заболеваний. Вышеперечисленные преимущества и накопленные доклинические данные открывают путь для будущего клинического применения вакцин на основе мРНК. Учитывая скорость производства, мРНК-вакцина является потенциальным терапевтическим методом в профилактике вирусных заболеваний и лечении опухолей [18, 25]. За последние годы создан и протестирован ряд мРНК-вакцин против инфекционных заболеваний (вирусы гриппа, бешенства, Зика, Эболы, HCV, HNV и др.). Эти вакцины показали обнадеживающие результаты при испытаниях как на животных моделях, так и на людях [19, 29]. В том числе разрешено к применению две вакцины против COVID-19.

Обоснование мРНК в качестве привлекательной платформы для вакцинации против рака заключается в доставке интересующего транскрипта, кодирующего один или несколько опухоль-ассоциированных (ТАА) или опухоль-специфичных антигенов (TSA), в цитоплазму клетки-хозяина (обычно антиген-презентирующую клетку, APC) для экспрессии целевых антигенов. Экспрессированные ТАА и TSA могут быть представлены на поверхности APC с помощью главного комплекса гистосовместимости (МНС) для активации противоопухолевого иммунитета. К настоящему времени десятки иммунотерапевтических препаратов на основе мРНК находятся на стадии клинических испытаний, в том числе препараты против рака легкого, яичников, меланомы, лейкемии, простаты и др. Ряд вакцин против рака уже дошли до III фазы клинических испытаний (*clinical.trials.gov*).

Системы доставки, такие как катионные наноэмульсии и липидные наночастицы, показали многообещающие результаты в доклинических исследованиях и клинических исследованиях, тем не менее ряд вопросов, касающихся доставки, требуют дальнейших исследований.

Таким образом, мРНК вакцины – это современная, быстро развивающаяся платформа. В настоящее время уже разработаны и применяются две профилактические вакцины против SARS-CoV-2. Данный опыт показал, что платформа на основе мРНК-вакцины предлагает сравнительно простое и быстрое решение против вирусных инфекций и онкологических заболеваний, на которую возлагают большие надежды.

Работа выполнена в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

Библиографический список

1. Alberer M., Gnad-Vogt U., Hong H.S. et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial // *Lancet*. 2017. Sep. 23. Vol. 390(10101). P. 1511–1520. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28754494.
2. Anderson E.J., Roupael N.G., Widge A.T. et al. mRNA-1273 Study Group. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults // *N. Engl. J. Med*. 2020. Dec 17. Vol. 383(25). P. 2427–2438. DOI: 10.1056/NEJMoa2028436. Epub 2020 Sep 29.

3. Capasso P.U., Kaczmarek J.C., Fenton O.S. et al. Poly(beta-amino ester)-co-poly(caprolactone) Terpolymers as Nonviral Vectors for mRNA Delivery In Vitro and In Vivo // *Adv. Healthc. Mater.* 2018. Vol. 7(14). e1800249. DOI 10.1002/adhm.201800249.
4. Chatterjee S., Pal J.K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases // *Biol. Cell.* 2009. Vol. 101. P. 251–262. DOI: 10.1042/BC20080104.
5. Corbett K.S., Edwards D.K., Leist S.R. et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness // *Nature.* 2020. Vol. 586. P. 567–571. DOI: 10.1038/s41586-020-2622-0.
6. Corbett K.S., Flynn B., Foulds K.E. et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 383. P. 1544–1555. DOI: 10.1056/NEJMoa2024671.
7. Guan S., Rosenecker J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems // *Gene Therapy.* 2017. Vol. 24(3). P. 133–143. DOI 10.1038/gt.2017.5.
8. Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A. DNA vaccines: Immunology, application, and optimization // *Annu. Rev. Immunol.* 2000. Vol. 18. P. 927–974.
9. Hobernik D., Bros M. DNA Vaccines How Far From Clinical Use? // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. P. 3605.
10. Houseley J., Tollervey D. The Many Pathways of RNA Degradation // *Cell.* 2009. Vol. 136(4). P. 763–776. DOI 10.1016/j.cell.2009.01.019.
11. Iavarone C., O'hagan D.T., Yu D., Delahaye N.F., Ulmer J.B. et al. Mechanism of action of mRNA-based vaccines // *Expert Rev. Vaccines.* 2017. Vol. 16(9). P. 871–881. DOI 10.1080/14760584.2017.1355245.
12. Ilyichev A.A., Orlova L.A., Sharabrin S.V. et al. mRNA technology as one of the promising platforms for the SARS-CoV-2 vaccine development // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii.* 2020. Vol. 24. P. 802–807.
13. Jackson N.A.C., Kester K.E. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective // *NPJ Vaccines.* 2020. Vol. 5. P. 11. DOI: 10.1038/s41541-020-0159-8.
14. Jackson L.A., Anderson E.J., Roupael N.G. et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2-Preliminary Report // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 383. P. 1920–1931.
15. Karpenko L.I., Rudometov A.P., Sharabrin S.V. et al. Delivery of mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 Using a Polyglucin: Spermidine Conjugate // *Vaccines.* 2021. Vol. 9. P. 76.
16. Kirschman J.L., Bhosle S., Vanover D. et al. Characterizing exogenous mRNA delivery, trafficking, cytoplasmic release and RNA-protein correlations at the level of single cells // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45. e113. DOI: 10.1093/nar/gkx290.
17. Kowalski P.S., Rudra A., Miao L. et al. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery // *Mol. Ther.* 2019. Vol. 27(4). P. 710–728. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.02.012.
18. Pardi N., Hogan M.J., Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology // *Curr. Opin. Immunol.* 2020. Aug 65. P. 14–20. DOI: 10.1016/j.coi.2020.01.008. Epub 2020 Mar 31. PMID: 32244193
19. Pardi N., Hogan M.J., Porter F.W. et al. mRNA vaccines – a new era in vaccinology // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018. Vol. 17(4). P. 261–279. DOI 10.1038/nrd.2017.243.
20. Qiu Y., Man R.C.H., Liao Q. et al. Effective mRNA pulmonary delivery by dry powder formulation of PEGylated synthetic KL4 peptide // *J. Control Release.* 2019. Vol. 314. P. 102–115. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.10.026.

21. Sahin U., Muik A., Derhovanessian E. et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses // *Nature*. 2020. Vol. 586(7830). P. 594–599.
22. Jackson L.A., Roberts P.C., Graham B.S. A SARS-CoV-2 mRNA vaccine - preliminary report // *Reply N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 383(12). P. 1191–1192.
23. Schlake T., Thess A., Fotin-Mleczek M. et al. Developing mRNA-vaccine technologies // *RNA Biol.* 2012. Vol. 9. P. 1319–1330. DOI: 10.4161/rna.22269.
24. Schwendener R.A. Liposomes as vaccine delivery systems: A review of the recent advances // *Ther. Adv. Vaccines*. 2014. Vol. 2(6). P. 159–182. DOI 10.1177/2051013614541440
25. Sebastian M., Papachristofilou A., Weiss C. et al. Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive®) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer // *BMC Cancer*. 2014. Vol. 14. P. 748. DOI 10.1186/1471-2407-14-748.
26. Slobodin B., Han R.Q., Calderone V. et al. Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation // *Cell*. 2017. Vol. 169. P. 326–337. DOI: 10.1016/j.cell.2017.03.031.
27. Starostina E.V., Sharabrin S.V., Antropov D.N. et al. Construction and Immunogenicity of Modified mRNA-Vaccine Variants Encoding Influenza Virus Antigens // *Vaccines*. 2021. Vol. 9. P. 452.
28. Wadhwa A., Aljabbari A., Lokras A. et al. Opportunities and challenges in the delivery of mRNA-based vaccines // *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12(2). P. 102. DOI: 10.3390/pharmaceutics12020102.
29. Wang Y., Zhang Z., Luo J. et al. mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy // *Mol. Cancer*. 2021. Feb 16. Vol. 20(1). P. 33. DOI: 10.1186/s12943-021-01311-z. PMID: 33593376; PMCID: PMC7884263.
30. Zhang C., Maruggi G., Shan H., Li J. et al. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 594. DOI 10.3389/fimmu.2019.00594.

УДК 616-01/09: 576.08; 616-039

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПАЦИЕНТ-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ ПОДХОД К МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ В НАУЧНОЙ ЛАБОРАТОРИИ ИНЖИНИРИНГОВОГО ЦЕНТРА

А.В. Кубышкин, Е.Ю. Зяблицкая, Е.П. Голубинская, Т.П. Макашиш

*Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского; Медицинская академия
им. С.И. Георгиевского (структурное подразделение), Симферополь, Россия*

По Приказу МЗ РФ от 18 мая 2021 г. № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований» немедицинские, в том числе научные и образовательные организации могут получать лицензии на выполнение работ по клинической лабораторной диагностике, лабораторной генетике и гистологии. В статье описан пятилетний опыт развития Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) Крымского федерального университета с акцентом на формирование пациент-ориентированного подхода в персонализированной диагностике в условиях федерального вуза. Выполнение клинических исследований в научном центре дает ряд преимуществ и имеет специфические черты планово-экономического, технологического, логистического характера. По нашему опыту совмещение научной и высокотехнологичной аналитической диагностической дея-

тельности на одной площадке потенцирует оба эти направления. Медико-биологический подход дает развитие новым научным направлениям и привлекает различных специалистов к эффективному решению сложных диагностических задач. Выполнение поточных диагностических исследований обеспечивает постоянную готовность лаборатории к работе, наличие расходных материалов, ее материальное обеспечение, создание биологических коллекций образцов по направлениям работы обслуживаемых организаций, социально значимыми заболеваниями с учетом этноспецифики региона, делает упрощенным софинансирование научных программ за счет наличия оборудования и ставок специалистов. Научный потенциал создает условия для привлечения средств научных фондов. Это хорошо вписывается в дорожную карту развития федерального университета с точки зрения развития региона и вклад в сохранение здоровья населения, при высокой гибкости и адаптивности лаборатории, и, как показал наш опыт, в условиях пандемии.

Ключевые слова: высокотехнологичная диагностика, патология, организация здравоохранения, научные исследования, морфология.

Оснащение научных лабораторий медицинских вузов в условиях фундаментализации медицинского образования способствует развитию междисциплинарности, дающей ряд преимуществ в подходах к исследованиям. Научно-исследовательские центры и научные лаборатории медицинских вузов имеют также большие перспективы в высокотехнологичных клинических исследованиях, потенцирующих научную деятельность, и перспективы перед медицинскими организациями. За 5 лет работы ЦНИЛ Медицинской академии имени С.И. Георгиевского (структурное подразделение) Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского (КФУ) как клиничко-научной лаборатории мы приобрели некоторый опыт. Нам бы хотелось остановиться на особенностях работы в части ряда интересных направлений, исследования редких диагностических случаев – в аспекте общих тенденций развития лаборатории.

В условиях перехода в правовое поле Российской Федерации Республика Крым оказалась в ситуации, способствующей развитию персонализированной медицины. С одной стороны, это вакуум на региональном рынке высокотехнологичных видов диагностических лабораторных услуг, стремительно развивающемся в мире, с другой стороны, КФУ получил возможность сформировать и быстро запустить в практику данное направление на базе Медицинской академии имени С.И. Георгиевского в научной лаборатории за счет старта программы развития вуза и далее за средства, заработанные приносящей доход деятельностью. ЦНИЛ восполнил нехватку наиболее востребованных в регионе видов диагностики: гистология, иммуногистохимия (ИГХ), ПЦР, ИФА и ELISPOT COVID-19, молекулярно-генетическая онкодиагностика, медицинская генетика и другие направления. Создание материальной, кадровой и биоресурсной базы, коллаборация с университетской клиникой и клиническими кафедрами способствовали росту научного потенциала ЦНИЛ, аккумулированного в работе НИОКТР «Молекулярно-генетические маркеры и этиологические факторы социально значимых заболеваний, их региональная специфика в РК» и задачах госзадания No FZEG-2020-0060 Минобрнауки России в сфере научной деятельности темы «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики злокачественных новообразований и подходы к их таргетной терапии с применением клеточных и генетических технологий» (работа выполнена при поддержке данного гранта). Создание инжинирингового центра (ИЦ) инициировало начало работ по созданию продуктов биомедицины как сегмента рынка персонализированной медицины. Наша работа посвящена краткому описанию дизайна и специфики данной деятельности.

В настоящее время работа научных и диагностических лабораторий в медицине сконцентрирована на молекулярной диагностике в концепции: поиск гена, поиск белка, разработка лекарства. Персонализированная медицина как раз подразумевает молекулярную направленность, особенно в прецизионной онкологии. Обеспечить ее может только мультидисциплинарный подход к пациенту, когда вокруг него сконцентрировано первичное клиническое звено, клиническая лабораторная диагностика, классическая и молекулярная морфология, цитология, генетика, звенья специализированной и высокотехнологичной медицинской помощи, клинической фармакологии и фармакогенетики. Задача медицинской организации – реализовать на своей базе этот потенциал, иметь такую команду. На данный момент это единственно востребованный вариант в сложных диагностических случаях. На этом принципе строятся наши взаимоотношения с Клиническим многопрофильным медицинским центром Святителя Луки, научно-клинической лабораторной службой ЦНИЛ Медицинской академии как структурных подразделений КФУ. Фундаментальная наука также играет важную роль, поскольку в ряде случаев позволяет моделировать, подтверждать гипотезу доклиникой, в экспериментах *in vivo*, *in vitro*. При этом исследования становятся достаточно прикладными, поскольку решают задачи, которые ставит жизнь – врачи-клиницисты и их сложные пациенты. Мы реализовали такой подход в диагностике COVID-19, когда делали 50–75% объемов ПЦР в Республике Крым и параллельно выполняли научное исследование о роли витамина D и его метаболитов, мультисистемном воспалительном синдроме у детей, разработали технологическую карту работ по ПЦР, занялись разработкой вакцины. Аналогично на основе клинической задачи диагностики узловых образований щитовидной железы оптимизировали алгоритм ведения таких пациентов и разработали иммуноцитохимический критерий (Z-индекс) для получения ответа в «серых» зонах цитологической диагностики [1, 5]. В проекте с ролью воспаления в инициации гиперплазий и атипии эндометрия мы выполнили ряд научных работ, в том числе и на биологической модели с обоснованием коррекции этого состояния [2, 4]. Также значимыми являются этногенетические исследования в онкологии, которые возможны при параллельной рутинной работе на сопроводительной фармакодиагностике.

В этих примерах важно создание своего биоресурсного хранилища, биобанка для систематизированного ответственного хранения, каталогизации и исследования биологических материалов с целью реализации научных, биомедицинских и медицинских целей.

В фундаментальных исследованиях основные направления нашей работы такие:

- Морфология;
- иммуногистохимия;
- электронная микроскопия;
- иммуноферментный анализ;
- метод полимеразной цепной реакции;
- электрофорез;
- гибридизация *in situ*;
- проточная цитофлуориметрия;
- работа с клеточными культурами.

Примером фундаментальных разработок может служить использование антисмысловых олигонуклеотидов (АСОН) в лечении аутоиммунных заболеваний [3].

В клинике мы стремимся задействовать те же методы. Мы оцениваем задачу клинко-диагностической лаборатории ЦНИЛ таким образом, чтоб реализовать замкнутый цикл клинко-морфологической диагностики опухолевой и неопухолевой патологии.

Клинический пример.

Примером может служить разработанный нами Алгоритм морфологической диагностики заболеваний щитовидной железы (рис. 1).

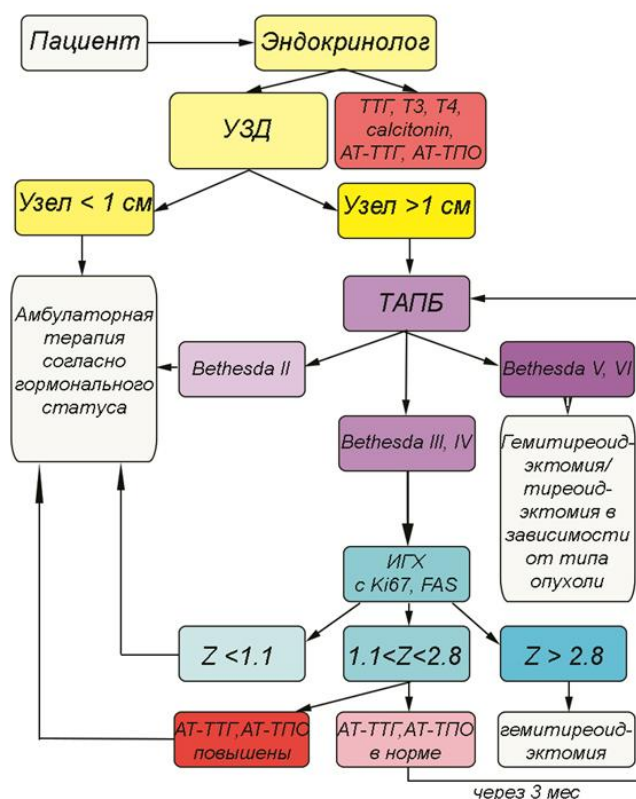


Рис. 1. Алгоритм морфологической диагностики заболеваний щитовидной железы

При верификации сомнительных изменений, выявленных при пункции без достоверной верификации рака (папиллярные структуры, плазмоцитоплазма, наличие внутриядерных борозд, нагромождение и укрупнение ядер), нами разработан алгоритм диагностики, когда проводится иммуноцитохимия (ИЦХ) на cell-block или ИГХ с маркерами пролиферации и апоптоза Ki-67 и Fas-R для определения злокачественного потенциала (Z-индекс). $Z = \text{Fas-R} / (\text{Ki-67} + 1)$ (среднее количество позитивных клеток, окрашенных соответствующим маркером, по 10 полям зрения в препарате. При определении Z-индекса менее 1,1 рекомендовано динамическое наблюдение пациента, с повторной цитологией в случаях увеличения размеров узла или изменении его экзогенности. При показателе Z-индекса более 2,8, гипоекзогенности узла, а также нормальных показателей АТ-ТПО, АТ-ТТГ рекомендована гемитиреоидэктомия с ревизией региональных лимфоузлов. При подозрении на метастатическое поражение – регионарная лимфодиссекция с тиреоидэктомией. В случаях изоэкзогенных ультразвуковых характеристик узла, наличии биохимических показателей аутоиммунного тиреоидита рекомендовано проведение жидкостной цитологии для исключения папиллярной карциномы. Наш подход удобен и для исключения опухолевой патологии, например, гиперплазии С-клеток и других состояний [1].

Иногда для верификации диагноза необходимы методы электронной микроскопии. Выявление этим методом редкого заболевания – Церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с подкорковыми инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL) – позволило быстро поставить точку в диагностике сложного случая с нарастающей неврологической симптоматикой и назначить пациентке адекватную терапию.

Важно отметить, что при введении новых видов исследований, например скрининга новорожденных детей на выявление орфанных и редких заболеваний, планируемом в 2022 г. в РФ, лаборатории при вузах могут стать референс-центрами, выполняющими в регионе данную работу. На врачебном симпозиуме в Ялте 7–11 сентября «VIII национальный конгресс Актуальные вопросы врачебной практики» на секции клинической лабораторной диагностики было предложено выполнение этих исследований в Крыму на базе ЦНИЛ. КФУ имеет опыт введения новых услуг в тарифное соглашение регионального фонда ОМС и участия в государственных заданиях и программах, финансирующих данные работы. Это, несомненно, экономит бюджетные средства, поскольку ранняя качественная диагностика в своем регионе – это база профилактической медицины и раннего выявления болезней, экономии средств на лечении запущенных случаев.

В работе по ПЦР-диагностике COVID-19 мы оперативно и с учетом максимального удобства для медиков выполнили около 2/3 объема Республики Крым, получили грантовую поддержку на научное исследование «Экспрессия рецепторов к витамину D в условиях новой коронавирусной инфекции (COVID-19): клинико-морфологические корреляции» (данный грант поддержал инновационную составляющую данной работы). Мы отработали много протоколов тестирования и создали технологическую карту оптимизации работы по сути в рамках бережливых технологий. Мы собирали пробы для секвенирования и исследования мутаций вируса, участвовали в работе по прогнозированию хода эпидемии в республике, разработке вакцины, сейчас включены в деятельность по работе с пациентами, перенесшими пневмонию на этапе адаптации и восстановления функций кардиореспираторной системы.

В заключение хочется подчеркнуть принципиальные преимущества совмещения науки и клиники на базе научных и инжиниринговых центров.

1. Техническое оснащение, позволяющее максимально использовать возможности современной диагностики.
2. Индивидуальный подход к каждому клиническому случаю.
3. Заинтересованность в мультидисциплинарности в тактике ведения пациента.
4. Научный подход в оптимизации клинико-диагностической алгоритмики.

Библиографический список

1. Зима Д.В., Безруков О.Ф., Зяблицкая Е.Ю. и др. Поиск маркеров молекулярной диагностики для оптимизации хирургической тактики при заболеваниях щитовидной железы // Таврический медико-биологический вестник. 2020. Т. 23. № 3. С. 14–20.
2. Карапетян О.В., Фомочкина И.И., Зяблицкая Е.Ю. и др. Состояние локальных маркеров воспаления и факторов апоптоза в эндометрии при гиперплазиях различной степени тяжести // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2020. Т. 15. №3. С. 342–347.
3. Makalish T.P., Golovkin I.O., Temirova Z.Z. et al. Anti-rheumatic effect of antisense oligonucleotide cytos-11 targeting TNF- α expression // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Т. 22. №3. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33498456>.

4. Karapetyan O.V., Kovalenko Ye.P., Litvinova S.V. et al. Pathogenetic relationship of endometrial hyperplasia with aseptic nonspecific inflammatory process // The New Armenian Medical Journal. 2019. Vol. 13. No 2. P. 80–86.
5. Zima D.V., Bezrukov O.F., Makalish T.P. et al. The pathogenetic role of stress in the course of thyroid gland cellular renewal // The New Armenian Medical Journal. 2019. Vol. 13. No 2. P. 52–58.

УДК 578.226

ЭКСПРЕССИЯ КРАСНОГО ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА DSRED-EXPRESS В СОСТАВЕ ГЕНОМА ВИЧ КАК МАРКЕР ДИНАМИКИ ВИРУСНОЙ РЕПРОДУКЦИИ В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

**А.А. Нефедова, М.Д. Бочкарева, К.А. Елфимов,
А.В. Тотменин, И.Р. Имамдинов, Н.М. Гашикова**

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности
и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы
развития генетических технологий, Кольцово, Новосибирская область, Россия*

Предыдущие исследования по созданию инфекционных молекулярных клонов (ИМК) показали высокую эффективность и гибкость данного подхода к изучению ВИЧ-инфекции. Здесь мы описываем ИМК ВИЧ-1, несущий в себе последовательность красного флуоресцентного белка DsRed-Express. Было показано, что данная модификация не влияет на репродуктивные свойства вируса. Наличие экспрессии DsRed-Express было подтверждено при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, что указывает на то, что DsRed-Express можно использовать как высокоэффективный маркер экспрессии ВИЧ-1.

Ключевые слова: ВИЧ, инфекционный молекулярный клон, DsRed-Express, репортерный ген.

На сегодняшний день опубликовано множество работ по получению и исследованию молекулярных клонов ВИЧ-1. Такие конструкции предполагается использовать для исследования аффинности и авидности антител [1], проверки кандидатных вакцин, а также исследованию важных для течения ВИЧ-инфекции генетических особенностей вируса [2, 3].

ВИЧ-1, в том числе молекулярные клоны этого вируса, имеет несколько важных биологических характеристик: тропность ВИЧ-1 к корецепторам Т-лимфоцитов (CCR5 и/или CXCR4); выраженность цитопатического эффекта; скорость наработки вируса, измеряемая с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) к протеину p24 ВИЧ-1; а также способность или неспособность индивидуального изолята или молекулярного клона образовывать синцитии в клеточной культуре. Эти данные должны быть собраны для сравнения полученных молекулярных клонов между собой, а также достижения воспроизводимости результатов экспериментов, в которых используются различные изоляты ВИЧ-1, молекулярные клоны этого ретровируса. Кроме того, использование молекулярных клонов ВИЧ-1 имеет одно важное преимущество – стандартизацию. Все ретровирусы изменчивы, мутационный процесс у них идет очень быстро. По этой причине изолят ВИЧ-1, выделенный у инфицированного челове-

ка, представляет собой некий пул вирусов, имеющих определенные отличия. При культивировании такого изолята ВИЧ-1, в том числе в селективной среде, через некоторое время в вирусном пуле может получить преимущество определенный вирусный вариант, в результате чего характеристики данного изолята ВИЧ-1 могут измениться. Молекулярные клоны устраняют этот недостаток, так как все ВИЧ-1, наработанные в клетках в результате их инфекции молекулярным клоном, будут иметь идентичные геномы.

Молекулярные биологи уже описали несколько способов получения молекулярных клонов ВИЧ-1 [1–3], их проверки на вышеперечисленные параметры, кроме которых учитывали молекулярно-генетическую гомологию дикому геноварианту, а также способность молекулярного клона образовывать инфекционные вирусные частицы ВИЧ-1 [4].

При всем многообразии созданных молекулярных клонов ВИЧ-1 все они имеют ограничения в практическом применении. Главным их недостатком является сложность визуализации событий инфекционного процесса внутри клетки. Возможность наблюдения, в том числе прижизненного, за инфицированными клетками стало бы преимуществом для уточнения мишени лекарственного средства, детальной визуализации нарушения жизненного цикла вируса внутри клетки. Для устранения данной проблемы нами был получен новый молекулярный клон ВИЧ-1, экспрессирующий красный флуоресцирующий белок DsRed-Express, имеющий максимум экстинкции и эмиссии на 557 нм и 579 нм соответственно. Предыдущая версия этого флуорохрома была выделена из Дискоактинии полосатой (*Discosoma* sp.). DsRed-Express является модифицированной версией DsRed третьего поколения, в котором была проведена замена девяти аминокислот для лучшей растворимости в цитоплазме клетки, усиления экспрессии и повышения интенсивности флуоресценции в красном спектре без добавления свечения в других длинах волн, как у предшественника [5].

Новый молекулярный клон позволяет визуализировать отдельные этапы инфекции ВИЧ-1 на клеточном уровне, что является большим преимуществом по сравнению с другими молекулярными клонами. Для визуализации подходят распространенные методы микроскопии, такие как эпифлуоресцентная микроскопия и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Такое дополнение к классическим молекулярно-генетическим и протеомным методам исследования позволит точнее оценить уровень репликации вируса, в том числе на клеточном уровне, отслеживать отдельные события в созревании вирусных частиц, что выведет исследования кандидатных вакцин и лекарственных препаратов на новый уровень.

Материалы и методы. Инфекционный молекулярный клон (ИМК) pSG3.1 был любезно предоставлен NIH AIDS Reagent Program [6]. Клонирование нуклеотидной последовательности DsRed-Express в pSG3.1 производили по уникальным сайтам рестрикции HpaI и BamHI. Для сборки вставки использовали Overlap Extension PCR по трем фрагментам (195 bp, 1472 bp – получены при помощи ПЦР с pSG3.1 и 679 bp – последовательность DsRed-Express) при помощи синтезированных олигонуклеотидов, перекрывающих стыки данных фрагментов. Полученный ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазами рестрикции HpaI и BamHI (New England BioLab) и очищали при помощи набора QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Германия); конечная длина вставки составила 2249 bp. Исходную плазмиду pSG3.1 также обрабатывали эндонуклеазами рестрикции HpaI и BamHI (New England BioLab) и очищали при помощи набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Сборку конструкции производили при помощи T4 ДНК лигазы (Thermo Scientific) и нарабатывали в NEB Stable Competent *E. coli* (New England BioLab). Полученные молекулярные клоны pSG3.1_DsRed-Express секвенировали при помощи BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) для проверки наличия мутаций или инделов.

Для сборки вирусных частиц использовали клетки HEK293T (5000 нг плазмиды на колбу T25 при 90% конфлюэнтности клеток) трансфекция pSG3.1_DsRed-Express проводилась с использованием липофектамина 3000 (Thermo Scientific). Концентрацию клеточного белка p24 в культуральной жидкости измеряли через 48 ч с использованием набора ВИЧ-1-p24-антиген-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест). Для культивирования pSG3.1_DsRed-Express использовалась клеточная линия MT-4 (получена из банка клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Клетки MT-4 были инфицированы полученными вирионами SG3.1_DsRed-Express (условия адсорбции: 1-часовая инкубация 10×10^6 клеток в 1 мл культуральной среды, содержащей 50 000 пг p24). После адсорбции клетки промывали чистой культуральной средой. Клетки MT-4, инфицированные SG3.1_DsRed-Express, культивировали в течение 11 дней в среде RPMI (Gibco®) с 10% FBS. Каждые 3 дня отбирали пробы культуральной жидкости для оценки концентрации p24 и одну треть культуральной среды заменяли на свежую. Инфекционный молекулярный клон pSG3.1 использовали в качестве положительного контроля для трансфекции HEK293T и культивирования вирионов ИМК.

В качестве метода детекции флуоресценции полученного молекулярного клона была выбрана сканирующая лазерная конфокальная микроскопия. Препараты были окрашены Аннексином V, конъюгированным с FITC, детекция производилась в канале зеленого спектра света, возбуждение – лазером с длиной волны 488 нм. Аннексин V – это специфично связывающийся с фосфатидилсерин белок. Фосфатидилсерин является маркером апоптоза и клеточной гибели, это вещество концентрируется у границ цитоплазматической мембраны клетки и часто используется для контрастности клеточной поверхности. Красный канал детекции флуоресценции был отведен для подтверждения наличия светимости DsRed-Express (экстинция/эмиссия: 557/579). Возбуждение вызывалось лазером с длиной волны 561 нм. Фото было сделано с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000.

Результаты исследований. В соответствии с поставленной задачей была проведена модификация ИМК pSG3.1 для получения маркера экспрессии ВИЧ-1 в клетках. Модификацию и сборку конструкции pSG3.1_DsRed-Express производили так, как показано в материалах и методах. Структура генома полученного инфекционного молекулярного клона pSG3.1_DsRed-Express представлена на рисунке 1.

Последовательность DsRed-Express располагается непосредственно после гена *nef*, отделенная от него последовательностью 2A-пептида (P2A) для отделения полипептидных цепей *Nef* и DsRed-Express после трансляции. В конструкции молекулярного клона отсутствует дополнительное усиление экспрессии DsRed-Express, благодаря чему интенсивность наработки данного белка отражает экспрессию ВИЧ-1 в клетке.

Полученные конструкции pSG3.1 и pSG3.1_DsRed-Express были трансфицированы в HEK293T для сборки вирусных частиц. Полученными в результате трансфекции модифицированными и исходными вирусными частицами заражали лимфоидную клеточную линию MT-4; каждый ИМК (модифицированный и контроль) брался в трех повторах для проверки воспроизводимости результатов. Сразу после заражения и в течение культивирования (0, 4, 7, 14 сутки) отбирались образцы супернатанта для определения динамики прироста вирусного белка p24.

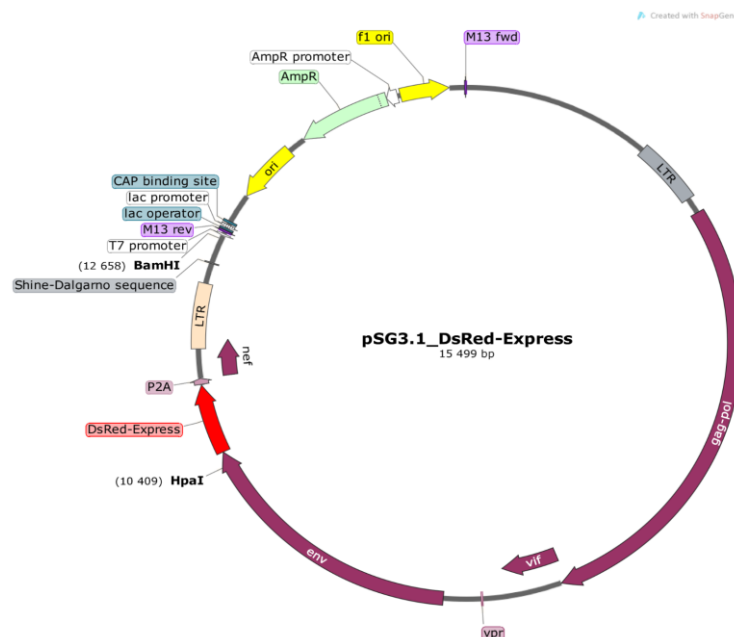


Рис. 1. Схема ИМК pSG3.1_DsRed-Express

Данные о накоплении белка р24 ВИЧ-1 (рис. 2) свидетельствуют о том, что новый молекулярный клон способен реплицироваться в культуре клеток МТ-4 и указывают на отсутствие снижения репликативной способности модифицированных молекулярных клонов ВИЧ-1. Концентрация белка вируса р24 увеличилась более чем в 100 раз по сравнению с его исходной концентрацией в культуральных средах уже на 7-й день культивирования, что свидетельствует о продукции репликационно-компетентных вирусов.

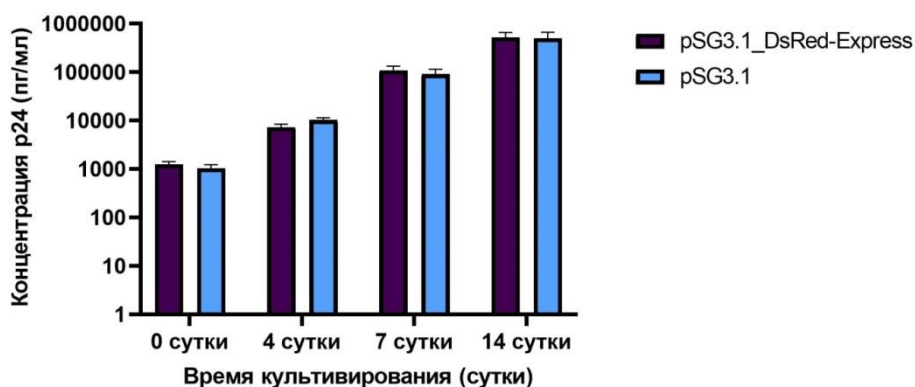


Рис. 2. Динамика прироста белка р24 ВИЧ-1 в процессе культивирования ИМК pSG3.1_DsRed-Express и ИМК pSG3.1

Отличительным преимуществом полученного инфекционного молекулярного клона является возможность детектировать его репродукцию в клетке с помощью флуоресценции белка DsRed-Express. Факт флуоресценции DsRed-Express, последовательность которого находится в молекулярном клоне pSG3.1_DsRed-Express, подтверждался с помощью метода лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Проверка была осуществлена с помо-

щью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV3000 при увеличении 370,2х, флуоресценция возбуждалась лазером 488 нм, эмиссия регистрировалась на 586 нм.

Наблюдения подтвердили, что модификация инфекционного молекулярного клона pSG3.1_DsRed-Express проведена успешно. На контрольном образце клеток клеточной культуры MT4, не зараженной полученным молекулярным клоном, отсутствовал сигнал флуоресценции в красном спектре. Основываясь на данных конфокальной микроскопии, можно заключить, что экспрессирующийся с нового инфекционного молекулярного клона белок DsRed-Express успешно накапливается в инфицированной клетке и способен к флуоресценции.

Модифицированный инфекционный молекулярный клон был получен в соответствии с дизайном эксперимента. Это исследование показало, что существует возможность изменять имеющиеся молекулярные клоны для большей вариативности в их использовании. Такая вариативность достигается вставкой флуорохрома, в нашем случае – флуоресцентного белка DsRed-Express, которая позволяет визуализировать репликацию ВИЧ-1 на уровне отдельной клетки, а также исследовать влияние лекарственных препаратов на скорость наработки вируса. Существует и возможность измерения относительного количества вирусных частиц во всем образце, например, с помощью планшетных флуориметров.

Таким образом, новый инфекционный молекулярный клон (pSG3.1_DsRed-Express) обладает преимуществом над аналогичными конструкциями [1–4], а именно – наличием вставки, экспрессирующей флуоресцентный белок DsRed-Express. Помимо этого, интерпретация данных по накоплению белка р24 ВИЧ-1 показала, что pSG3.1_DsRed-Express имеет хорошую продукцию на клеточной культуре MT-4, в том числе по сравнению с изолятом – предшественником. Это говорит об отсутствии уменьшения вирулентности, способности инфицировать клетки и реплицироваться *in vitro*, т.е. в клеточной культуре.

Выводы. Результатом работы стало получение инфекционного молекулярного клона pSG3.1_DsRed-Express, способного к продуктивной инфекции с выходом инфекционных вирусных частиц, а также экспрессирующего флуоресцирующий белок DsRed-Express. Получение таких ИМК ВИЧ-1 может быть полезно для изучения специфических фундаментальных особенностей течения ВИЧ-инфекции. Данная модель также может применяться в исследованиях эффективности антиретровирусных препаратов и вакцин в доклинических испытаниях.

Благодарность выражается NIH AIDS Reagent Program за предоставленный ИМК pSG3.1.

Данная работа выполнена в рамках Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий

Библиографический список

1. Kim J., Rao V. B., Rao M. Primary HIV-1 and Infectious Molecular Clones Are Differentially Susceptible to Broadly Neutralizing Antibodies // *Vaccines*. 2020. Т. 8. №. 4. С. 782.
2. Takeuchi H. et al. Isolation and characterization of an infectious HIV type 1 molecular clone from a patient with primary infection // *AIDS research and human retroviruses*. 2002. Т. 18. №. 15. С. 1127–1133.
3. Rodriguez M.A. et al. Construction and characterization of an infectious molecular clone of HIV-1 subtype A of Indian origin // *Virology*. 2006. Т. 345. №. 2. Р. 328–336.
4. Meng Z. et al. Construction and characterization of an infectious molecular clone of HIV type 1 CRF07_BC // *AIDS research and human retroviruses*. 2008. Т. 24. №. 2. Р. 259–264.

5. Dash A.K., Yende A.S., Tyagi R.K. Novel application of red fluorescent protein (DsRed-Express) for the study of functional dynamics of nuclear receptors // Journal of fluorescence. 2017. T. 27. №. 4. P. 1225–1231.
6. Ghosh Sajal K. et al. A molecular clone of HIV-1 tropic and cytopathic for human and chimpanzee lymphocytes // Virology, 1942. T. 1993. P. 858–864.

УДК 574.2:504.75.05

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ В КЛЕТКАХ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЖИТЕЛЕЙ АГРАРНЫХ РАЙОНОВ АЛТАЙСКОГО КРАЯ

*Н.Ю. Поцелуев¹, О.И. Швед¹, К.В. Шульц¹,
А.С. Нагорняк¹, О.В. Жукова¹, А.П. Пашков²*

¹ Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

² Алтайский государственный педагогический университет, Барнаул, Россия

Работа посвящена выявлению взаимосвязи цитогенетических показателей буккального эпителия населения и показателей социально-гигиенического мониторинга питьевой воды и продуктов питания. Показаны особенности негативного воздействия химического загрязнения воды и продуктов питания нитратами на здоровье жителей.

Ключевые слова: буккальный эпителий, цитогенетические показатели, нитраты, питьевая вода.

С раннего детства каждый человек подвержен воздействию факторов окружающей среды. При оценке влияния факторов на здоровье человека следует учитывать не только загрязнение атмосферного воздуха, почвы, но и загрязнение воды. Из нескольких сотен вредных веществ в питьевой воде нормируются лишь некоторые: продукты переработки нефти, хлорорганические пестициды, некоторые соли тяжелых металлов, сульфаты и т.д. При проведении стандартного мониторинга, однако, учитываются не все поллютанты. В окружающую среду поступают и выбросы радионуклидов и ряд загрязняющих веществ [1–3].

Оценку суммарного загрязнения окружающей среды следует проводить с помощью оценки экологически обусловленной заболеваемости населения. Краеугольной проблемой, однако, остается разработка индикаторов комплексного влияния загрязнения окружающей среды, с помощью которых можно было бы снизить рост экологически обусловленной заболеваемости. На сегодняшний день известно несколько таких индикаторов: уровень хромосомных аберраций и цитогенетические изменения (в том числе частота встречаемости микроядер) эпителия ротовой полости – буккального эпителия (БЭ) [1–3].

Известно, что качество питьевой воды играет важную роль в состоянии буккального эпителия. Качество питьевой воды, ее химические и органолептические свойства играют важную роль в состоянии здоровья населения. Ряд химических веществ при попадании в воду претерпевает процесс комплексообразования и трансформации. При употреблении такой воды увеличивается риск развития инфекционных патологий. Установлена взаимосвязь некачественной воды и состояния буккального эпителия. Доказано, что употребление воды

с высоким (выше допустимых величин) содержанием железа, марганца и другого приводит к таким изменениям буккального эпителия, как усиление апоптоза, активация деструктивных процессов в клетке. Однако следует учитывать, что буккальный эпителий изменяется под действием нескольких факторов, поэтому необходимо внедрять комплексный подход [4, 5].

Необходимость комплексного подхода обсуждается и другими исследователями, например, доказано, что некачественная вода в совокупности с другими экологическими факторами приводит к усиленной пролиферации клеток буккального эпителия школьников [4–6].

Следует отметить, что важную роль в изменениях буккального эпителия играет употребление не только воды, но и напитков. Например, длительное употребление газированных напитков приводит к таким изменениям, как гиперплазия и гиперкератоз [7, 8].

Таким образом, необходимо продолжать изучение влияния загрязнения питьевой воды и продуктов питания на изменения показателей буккального эпителия, так как процессы пролиферации клеток буккального эпителия, апоптоз, количество микроядер является одним из важных прогностических признаков оценки состояния здоровья конкретного человека и населения в целом [8–10].

Задачи исследования: выделить модельные территории Алтайского края на основании превышения проб по основным показателям социально-гигиенического мониторинга питьевой воды и продуктов питания. Ретроспективно оценить негативный вклад химического загрязнения питьевой воды. Провести исследование продуктов питания растительного происхождения на содержание в них нитратов с помощью ионометрического метода. Сравнить цитогенетические показатели буккального эпителия трудоспособного населения

Материалы и методы исследования. Лабораторная часть исследования (ионометрия) выполнялась в аккредитованной испытательной лаборатории Института гигиены труда и промышленной экологии АГМУ Минздрава РФ, оценка цитогенетических показателей клеток буккального эпителия проводилась на базе кафедры гигиены, основ экологии и безопасности жизнедеятельности данного университета.

На основании докладов «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Алтайском крае» определены модельные территории, различающиеся по содержанию вредных веществ в питьевой воде, продуктах питания и характере хозяйственной деятельности районов.

При микроскопии клеток буккального эпителия: окраска – метиленовый синий, визуальная микроскопия – увеличение 100x10, цифровая микроскопия – видеоокуляр TourCam 3,2 Мпикс, 1000 клеток/препарат. Жители Петропавловского района – 15 мужчин и 17 женщин (не курят) в возрасте 19–22 года; жители лесостепных территорий Алтайского края – 11 мужчин и 15 женщин (не курят) в возрасте 18–23-х лет. Статистическая обработка проводилась в программе SPSS Statistica непараметрическими методами, так как оценка распределения для всех выборок критерием Шапиро-Уилка не выявила признаков нормальности ($p > 0,05$).

Результаты исследования. Согласно докладу «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Алтайском крае в 2020 г.» за 2018–2020 гг. по санитарно-химическим показателям питьевой воды Усть-Пристанский район попадает в первый (наиболее благоприятный) ранг, не имея превышений.

При оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих питьевую воду централизованных систем водоснабжения, по данным регионального информационного фонда социально-гигиенического мониторинга, Петропавловский район находится на втором месте с величиной суммарного канцерогенного риска $1,57 \cdot 10^{-5}$, что соответствует второму диапазону и требует постоянного контроля. Ведущими

загрязнителями по неканцерогенным эффектам при пероральном пути поступления являются нитраты в воде с коэффициентом опасности 1,3.

Влияние на возникновение алиментарно-зависимых заболеваний оказывают в том числе продукты, содержащие нитраты, как один из основных загрязнителей плодоовощной продукции. Выявлено загрязнение продуктов питания, реализуемых и производимых на территории Алтайского края, химическими элементами, в том числе нитратами. Контаминация значительной доли пищевых продуктов нитратами способствует возникновению определенных негативных проявлений со стороны здоровья населения, употребляющего эти продукты питания в пищу, а именно: увеличение доли и количества алиментарно-зависимых заболеваний населения региона, включающих такие нозологические формы, как злокачественные новообразования, болезни обмена веществ, эндокринной системы и др. Установлено, что уровень ПДК по содержанию нитратов превышен в таких продуктах питания, как лук, свекла, огурец, томат, картофель.

С целью сравнительной оценки загрязнения плодоовощной продукции в двух районах края – Петропавловском и Усть-Пристанском, выбраны продукты питания, выращиваемые на территории данных регионов, такие продукты, как картофель, свекла, лук репчатый. Это те овощи, которые выращивают на собственных приусадебных участках и хранят в зимнее время, когда и проводился анализ содержания в них нитратов.

Таблица 1

Содержание нитратов в исследованных образцах продукции, мг/кг (n=157)

Показатель	Вид продукта					
	картофель		лук репчатый		свекла	
	Район					
	Петропав-ловский	Усть-Пристан-ский	Петропавлов-ский	Усть-Пристан-ский	Петропавлов-ский	Усть-Пристан-ский
Процентиль 0,10	87,2	74,8	39,8	49,2	369	328,8
Процентиль 0,16	94,6	77,76	44,12	51,72	448,2	425,28
Персентиль 0,25	102	81	57,5	55,5	549	549
Персентиль 0,75	235,5	214	93	83	1698	1122
Процентиль 0,84	266,32	258,04	101,32	87,04	1741,24	1668,52
Процентиль 0,90	276,6	274	106	95,8	2013,4	1754,2
Процентиль 0,95	283,4	279,3	151,5	106,1	4784,2	1811,6
МЕДИАНА	131,5	113	67	67	902	732,5

На основании выполненных исследований можно сделать следующий вывод: во-первых, в Алтайском крае в целом наблюдается негативная картина содержания нитратов в плодоовощной продукции отдельных видов; во-вторых, для Петропавловского района в большей степени характерно загрязнение нитратами продуктов питания, выращенных непосредственно на территории региона. Подвержены загрязнению нитратами на этой территории картофель и свекла. Уровень загрязнения лука-репки по показателю медиана не имеет статистически значимых отличий в сравниваемых территориях.

Таблица 2

Цитогенетические показатели клеток буккального эпителия

Показатель	Петропавловский район (мужчины)	Усть-Пристанский район (мужчины)	Примечание	Петропавловский район (женщины)	Усть-Пристанский район (женщины)	Примечание
Цитогенетические показатели, ‰						
Частота клеток с микроядрами	3,20±0,18	1,83±0,29	$p \leq 0,05$	2,43±0,46	1,67±0,21	$p \leq 0,05$
Частота клеток с протрузиями	2,80±0,31	2,21±0,38	$p \geq 0,05$	3,33±0,23	2,25±0,45	$p \geq 0,05$
Интегральный показатель цитогенетического действия (сумма клеток с микроядрами и протрузиями)	5,80±0,53	4,00±0,55	$p \leq 0,05$	5,67±0,67	3,91±0,21	$p \leq 0,05$

На основании данных, представленных в таблице 2, можно видеть, что цитогенетические показатели буккального эпителия как мужчин, так и женщин в Петропавловском и Усть-Пристанском районах статистически достоверно различаются по частоте встречаемости клеток с микроядрами и интегральному показателю цитогенетического действия. Исходя из того, что оба района являются сельскохозяйственными, ведущую роль в негативном воздействии можно отнести воде и продуктам питания.

Таблица 3

Показатели деструкции клеток буккального эпителия

Показатель	Петропавловский район (мужчины)	Усть-Пристанский район (мужчины)	Примечание	Петропавловский район (женщины)	Усть-Пристанский район (женщины)	Примечание
Показатели завершения деструкции ядра, ‰						
Частота клеток с апоптозными телами	3,40±0,37	3,00±0,32	$p \geq 0,05$	3,67±0,77	2,42±0,20	$p \geq 0,05$
Частота клеток с кариорексисом	2,50±0,24	2,11±0,35	$p \geq 0,05$	2,92±0,49	2,75±0,18	$p \geq 0,05$
Частота клеток с полным кариолизисом	114,10±7,42	137,75±5,33	$p \leq 0,05$	115,13±6,61	129,33±7,11	$p \leq 0,05$

Исходя из данных, представленных в таблице 3, показатели завершения деструкции ядра различаются в части клеток с полным кариолизисом для жителей обоего пола в обоих районах, что может быть обусловлено действием ряда социально обусловленных факторов,

таких как стресс, эмоциональное выгорание в процессе трудовой деятельности или активации процессов раннего старения.

Выводы. Выявлены особенности негативного воздействия химического загрязнения воды и продуктов питания на здоровье жителей сельскохозяйственных районов Алтайского края. Определены особенности цитогенетического пейзажа жителей сельскохозяйственных районов Алтайского края. Цитогенетический тест представляется как актуальная малоинвазивная методика, пригодная для скрининга негативного воздействия природных, техногенных и социальных факторов окружающей среды.

Библиографический список

1. Ладнова Г.Г. и др. Цитогенетические показатели буккального эпителия школьников, проживающих на территориях с разным уровнем загрязнения атмосферного воздуха // Гигиена и санитария. 2016. Т. 95, №. 5.
2. Калаев В. Н., Артюхов В. Г., Нечаева М. С. Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека: проблемы, достижения, перспективы // Цитология и генетика. 2014.
3. Корсаков А.В. и др. Буккальный эпителий как индикатор состояния окружающей среды // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2015. №. 3. С. 331–331.
4. Скамрова Г.Б. и др. Влияние микроволнового излучения на частотах мобильной связи и сети WiMAX на проницаемость мембран клеток буккального эпителия человека // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2011. Т. 24. №. 4 (63).
5. Шинкарук Е.В., Агбалин Е.В. Влияние качества питьевой воды на кариологические показатели клеток буккального эпителия у жителей города Надым Ямало-Ненецкого автономного округа // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины. 2015. С. 225–226.
6. Fahim A. et al. Effect of carbonated drinks on wound healing of oral epithelium // Journal of oral biology and craniofacial research. 2016. Т. 6. №. 1. С. 50–54.
7. Kyrylenko I. G. et al. Changes in electrokinetic index of buccal epithelium correlated with changes in some parameters of immunity and fecal microbiocenosis // Journal of Education, Health and Sport. 2018. Т. 8. №. 10. С. 168–174.
8. M Mohamed A., M Mansour A. Effect of oxygenated water as a new chemopreventive modality in experimentally induced hamster buccal pouch carcinogenesis // Al-Azhar Journal of Dental Science. 2018. Т. 21. №. 2. С. 99–112.
9. Palla S. et al. The genotoxic and cytotoxic effects of CT scan on buccal epithelial cells // Journal of Cytology. 2020. Т. 37. №. 4. С. 189.
10. Sementsova E. A. et al. Cytological features of buccal epithelium in patients of various ages // BIO Web of Conferences. EDP Sciences. 2020. Т. 22. С. 1003.

УДК 602.66:612.017.12

ВИРУСНЫЕ МИШЕНИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН НА ПРИМЕРЕ ВИРУСОВ ВИЧ-1 И SARS-COV-2

А.П. Рудомётов, Н.Б. Рудомётова, А.А. Ильичёв, Л.И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Роспотребнадзор, Кольцово, Новосибирская область, Россия

Вакцинация является проверенным, безопасным и экономически эффективным способом защиты от инфекционных заболеваний. Для разработки эффективной вакцины, очень важен правильный выбор вирусного белка-антигена, который будет стимулировать протективный иммунный ответ. В данной статье дается краткое описание вирусных мишеней, которые используются в вакцинах-кандидатах против ВИЧ-1 и SARS-CoV-2.

Ключевые слова: вакцины, вирусные антигены, bNAbs, ВИЧ-1, SARS-CoV-2.

Вакцины способны индуцировать защитные нейтрализующие антитела против соответствующего вируса, тем самым блокируют распространение вируса в организме и предотвращают инфекционные заболевания. Тем не менее, даже когда коррелятом защиты служат нейтрализующие антитела, для их созревания и выработки необходима помощь Т-хелперных клеток. Поэтому эффективная вакцина должна активировать как В-клеточное звено, так и Т-клеточное звено иммунитета. В вакцинах с инаktivированным вирусом и живым аттенуированным вирусом в качестве мишени для вакцины используется весь вирус. Однако, когда речь идет о новых платформах, векторных и субъединичных вакцинах, вакцинах на основе нуклеиновых кислот, чаще используют определенный белок вируса или его фрагмент, на который направлены нейтрализующие антитела. В данной работе мы рассмотрим вопрос о том, какие фрагменты вирусных белков используют в качестве мишеней для индукции иммунного ответа.

Поверхностные гликопротеины ВИЧ-1. В состав липидной мембраны вириона ВИЧ-1 входят тримеризованные молекулы гликопротеина Env, каждый из которых образован тремя молекулами трансмембранного гликопротеина gp41, служащего «якорем» комплекса, и тремя молекулами поверхностного гликопротеина gp120 [21]. Субъединица gp120 содержит сайт связывания с рецептором CD4 и ко-рецепторами CCR5 или CXCR4 клетки-мишени. Субъединица gp41 опосредует слияние вируса и мембраны клетки-мишени. Связывание gp120 с рецептором CD4 запускает каскад конформационных изменений в белках gp120 и gp41, необходимых для слияния вируса с клеткой [8]. Проникновение ВИЧ в клетку-мишень и слияние «клетка – клетка» происходят через эти тримерные комплексы, поэтому они являются мишенью нейтрализующих антител.

Основным препятствием на пути создания эффективной вакцины против ВИЧ является неспособность существующих иммуногенов вызывать иммунные ответы, нацеленные на консервативные эпитопы на тримерном гликопротеине оболочки ВИЧ-1, который замаскирован молекулами сахаров [13, 23]. Долгое время было широко распространено мнение о том, что большая изменчивость вирусных гликопротеинов будет абсолютным препятствием на пути разработки профилактической вакцины на основе нейтрализующих антител. Однако впоследствии было обнаружено, что у значительной части хронически инфицированных людей вырабатываются широконейтрализующие антитела (bNAbs), нацеленные на кон-

сервативные эпитопы Env и способные нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1, что демонстрирует потенциал иммунной системы для генерации эффективных bNAbs [12, 19].

В ходе многочисленных исследований было установлено, что иммунизация целым комплексом Env ВИЧ-1 или его субъединицами, такими как мономерные gp120, не вызывает индукцию широконейтрализующих антител [9]. Существенные усилия были предприняты для создания растворимых, стабилизированных Env-тримеров [4]. Однако ряд особенностей Env, в числе которых структурная и конформационная нестабильность и иммунодоминирование гипервариабельных областей, создают серьезные препятствия для разработки вакцины на основе тримеров Env, поэтому разрабатываются новые стратегии и подходы, направленные на фокусирование иммунного ответа на консервативные эпитопы Env и индукцию bNAbs [1, 2, 3, 7, 18].

На данный момент установлено несколько областей «уязвимости» Env ВИЧ-1, на которые нацелены bNAbs [15]. К данным участкам относятся: участок прикрепления gp120 к рецептору CD4 (CDbs); V1/V2-петля, на которой обнаружены эпитопы, содержащие N-связанные гликаны в позиции Asn160; V3-петля, на которой находятся эпитопы, включающие N-связанные гликаны в позиции Asn332; область взаимодействия gp120 и gp41; участок на gp41, примыкающий к цитоплазматической мембране (MPER, мембрано-проксимальная наружная область); и пептид слияния, обеспечивающий слияние вируса с клеткой. Все эти регионы уязвимости являются консервативными эпитопами белков ВИЧ-1 и могут использоваться для конструирования вакцин, способных индуцировать bNAbs.

Поверхностный гликопротеин SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 содержит четыре основных структурных белка, а именно белки шипа (S), мембраны (M) и оболочки (E), которые встроены в поверхностную оболочку вируса, и белок нуклеокапсида (N) [20]. S-белки отвечают за распознавание клеточного рецептора хозяина, чтобы инициировать проникновение вируса. M-белки встроены в оболочку и формируют оболочку вириона. Белки E – это небольшие полипептиды, которые имеют решающее значение для инфекционности. N-белки составляют спиральный нуклеокапсид и связываются вдоль генома вирусной РНК. Помимо этих структурных белков, SARS-CoV-2 кодирует 16 неструктурных белков и 9 дополнительных белков. Некоторые из этих вирусных белков потенциально могут служить мишенями для иммунных ответов, вызванных вакциной, но так как S белок отвечает за проникновение вируса в клетку, он является основным белком, используемым в качестве мишени в вакцинах против SARS-CoV-2 для индукции нейтрализующих антител.

S белок SARS-CoV-2. S-белок состоит из мембранно-дистальной субъединицы S1 и мембранно-проксимальной субъединицы S2, представлен на оболочке вируса как гомотример. Субъединица S1 определяет связывание с рецептором через свой рецептор-связывающий домен (RBD), тогда как субъединица S2 отвечает за слияние мембран, которое требуется для проникновения вируса в клетку. Субъединица S2 содержит пептид слияния (FP), соединительную область (CR) и гептадные повторы (HR1 и HR2) вокруг центральной спирали в виде структуры спираль-поворот-спираль. Взаимодействие RBD с клеточным рецептором, человеческим ангиотензин-превращающим ферментом 2 (hACE2), приводит к диссоциации субъединицы S1 и одновременно иницирует процесс рефолдинга подпружиненной субъединицы S2, которая выступает за FP на своем конце для мембранного слияния. Субъединица S2 в своей конформации после слияния складывается в виде длинного спирального пучка с FP, вставленным в мембрану клетки-хозяина. Теоретически нейтрализующие антитела (nAb) могут нацеливаться на S-белок, подавляя вирусную инфекцию на нескольких этапах процесса проникновения вируса. Рекомбинантный тримерный белок структурно имитирует

нативный S-белок, представленный на вирусных частицах, и может служить мишенью для pAb – стратегия, которая также применяется при разработке вакцины против ВИЧ.

Белок S является метастабильным, когда продуцируется как рекомбинантный белок, и склонен к трансформации из конформации до слияния в конформацию после слияния, отщепляя субъединицу S1. Однако субъединица S1 является иммунодоминантным антигеном во время инфекций из-за ее доступности для иммунного распознавания и содержит нейтрализующие эпитопы, главным образом на RBD [6]. Считается, что стратегии стабилизации S-белка в его конформации до слияния и повышения экспрессии S-белка до слияния повышают качество и количество индуцированных вакциной антител, направленных на функционально релевантные эпитопы на субъединице S1. Pallesen et al. сообщили о двух заменах пролина (2P) на вершине центральной спирали и HR1, которые могут сохранять S-белки MERS-CoV, SARS-CoV и HKU1 в антигенно оптимальной конформации до слияния [17]. Дизайн S-2P теперь используется в нескольких стратегиях вакцинации против COVID-19.

Рецептор-связывающий домен RBD SARS-CoV-2. Поверхность белка S защищена от распознавания антителами гликанами, за исключением RBD, что объясняет иммунодоминантность эпитопов RBD [10]. Большинство pAb SARS-CoV-2 связываются с RBD и блокируют взаимодействие RBD-hACE2, таким образом, подавляя прикрепление вируса к клетке [6]. RBD является привлекательной мишенью для вакцины, потому что он индуцирует функционально значимые для нейтрализации вируса антитела и не индуцирует антитела, способные вызывать антитело-зависимое усиление инфекции (ADE).

На сегодняшний день несколько вакцин против SARS-CoV-2 на основе белка RBD прошли клинические испытания. Однако использование RBD в вакцинах затруднено из-за его низкой иммуногенности из-за небольшого размера молекулы и возможных смешанных форм множественных комплексов (в виде мономеров, димеров или тримеров). Стратегии преодоления этих недостатков включают увеличение размера антигена (например, путем слияния RBD с Fc доменом [11]), или за счет мультимеризации RBD (например, путем отображения множества копий RBD на вирусоподобных частицах [22]).

S1-NTD и субъединица S2. S1-NTD (N-концевой домен) также содержит эпитопы для pAb, обнаруженных у инфицированных пациентов [14], считается потенциальной мишенью для вакцин против SARS-CoV-2. Нацеленные на NTD pAb обычно не блокируют связывание рецептора напрямую, а скорее мешают связыванию рецептора или сдерживают конформационные изменения S-белка, необходимые для перехода от предварительного слияния к переходу после слияния. Примечательно, что pAbs, нацеленные на SARS-CoV-2, именно на NTD, обычно проявляют более низкую нейтрализующую способность, чем pAbs, специфичные для RBD. До сих пор не сообщалось о вакцинах против COVID-19 на основе NTD.

Для субъединицы S2 описаны пептиды, полученные из HR1 или HR2 из SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, которые ингибируют слияние вируса с клетками-мишенями и тем самым предотвращают вирусную инфекцию. Кроме того, сообщалось, что pAb нацелены на субъединицу S2, включая SARS-CoV-2 [16], что позволяет предположить, что субъединица S2 является мишенью для вакцины. Проксимальная к мембране субъединица S2 содержит более обширную защиту от N-гликанов и менее доступна для иммунного распознавания, чем субъединица S1, и поэтому менее иммуногенна. Однако аминокислотная последовательности субъединицы S2 является относительно консервативной среди разных коронавирусов, поэтому она способна индуцировать перекрестно-реактивные антитела и CD4+ Т-клетки, распознающие как SARS-CoV-2, так и другие коронавирусы человека [5], что указывает на потенциальную мишень для универсальной вакцины против коронавирусов.

Заключение. В настоящее время определены ключевые направления, которые могли бы способствовать разработке вакцины против ВИЧ-1. Это обнаружение и характеристика

bNAbs, выделенных как от инфицированных лиц, так и от иммунизированных животных, описание структуры тримера Env, который является единственной целью bNAbs, и определение коэволюции «вирус-антитело» у людей, у которых развивается реакция bNAbs. Эти направления способствуют разработкам новых иммуногенов и стратегий для вакцинации с целью вызвать bNAbs против ВИЧ. Хотя многие вакцины состоят из целого вируса или специфических белков, использование только минимального эпитопа патогена, который может стимулировать длительную защиту, становится тенденцией в разработке вакцин. В случае SARS-CoV-2 быстрой разработке эффективных вакцин предшествовали, в частности, накопленные обширные знания в области исследований вакцины против ВИЧ-1. За короткий промежуток времени были выявлены вирусные мишени и определена их структура.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ
в рамках научного проекта № 20-04-00879*

Библиографический список

1. Рудометов А.П. и др. Антигенные свойства искусственного полиэпитопного ВИЧ-иммуногена // Сибирский научный медицинский журнал. 2018. Т. 38. №4.
2. Рудометов А.П. и др. Исследование структурных и иммунологических свойств химерных белков, содержащих участки MPER ВИЧ-1 // Acta Naturae (русскаяязычная версия). 2019. Т. 11. №3 (42).
3. Рудометов А.П. и др. Получение химерных вариантов HBsAg, экспонирующих фрагменты MPER ВИЧ-1 // Сибирский научный медицинский журнал. 2019. Т. 39. №4.
4. Aldon Y. et al. Rational design of DNA-expressed stabilized native-like HIV-1 envelope trimers // Cell reports. 2018. Т. 24. №. 12. С. 3324–3338.
5. Braun J. et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19 // Nature. 2020. Т. 587. №. 7833. С. 270–274.
6. Cao Y. et al. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells // Cell. 2020. V. 182. P. 73–84.
7. Combadière B., Beaujean M., Chaudesaigues C., Vieillard V. Peptide-Based Vaccination for Antibody Responses Against HIV // Vaccines. 2019. Т. 7. С. 105.
8. Eckert D.M., Kim P.S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition // Annual Review of Biochemistry. 2001. V. 70. P. 777–810.
9. Falkowska E. et al. Broadly neutralizing HIV antibodies define a glycan-dependent epitope on the prefusion conformation of gp41 on cleaved envelope trimers // Immunity. 2014. Т. 40. №. 5. С. 657–668.
10. Grant O.C., Montgomery D., Ito K., Woods R.J. Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition // Science Reports. 2020.
11. Gu F.H. et al. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy // Science. 2020. V. 369. P. 1603–1607.
12. Hrabner P., Seaman M.S., Bailer R.T. et al. Prevalence of broadly neutralizing antibody responses during chronic HIV-1 infection // AIDS. 2014. V. 28. P. 163–169.
13. Lee J.H., Ozorowski G., Ward A.B. Cryo-EM structure of a native, fully glycosylated, cleaved HIV-1 envelope trimer // Science. 2016. V. 351. P. 1043–1048.
14. Liu L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike // Nature. 2020. V. 584. P. 450–456.
15. McCoy L.E., Burton D.R. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV // Immunological Reviews. 2017. V. 275. № 1. P. 11–20.

16. Ng K.W. et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans // Science. 2020.
17. Pallesen J. et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen // PNAS. 2017. P. 7348–7357.
18. Rudometov A.P. et al. Artificial anti-HIV-1 immunogen comprising epitopes of broadly neutralizing antibodies 2F5, 10E8, and a peptide mimic of VRC01 discontinuous epitope // Vaccines. 2019. V. 7. №. 3.
19. Shcherbakov D.N. et al. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1 as a novel aspect of the immune response // Acta Naturae (англоязычная версия). 2015. V. 7. №. 4 (27).
20. Srinivasan S. et al. Structural genomics of SARS-CoV-2 indicates evolutionary conserved functional regions of viral proteins // Viruses. 2020. V. 12.
21. Turner B.G., Summers M.F. Structural biology of HIV // Journal of Molecular Biology, 1999. V. 285. № 1. P. 1-32.
22. Walls A.C. et al. Elicitation of potent neutralizing antibody responses by designed protein nanoparticle vaccines for SARS-CoV-2 // Cell. 2020. V. 183. P. 1367–1382.
23. Wei X. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1 // Nature. 2003. V. 422. P. 307–312.

УДК 57.083

ТЕХНОЛОГИЯ ПСЕВДОВИРУСОВ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Н.Б. Рудомётова, Д.Н. Щербаков, Л.И. Карпенко

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Роспотребнадзор, Кольцово, Новосибирская область, Россия

В данной работе представлена краткая характеристика технологии псевдовирусов; описано применение данной технологии, а также платформы, используемые для получения псевдовирусов.

Ключевые слова: псевдовирусы, вируснейтрализация, лентивирусная система.

Как известно, большинство лабораторных исследований и экспериментов с живыми вирусами должны проводиться в условиях BSL-3 или BSL-4, которые доступны далеко не каждой научно-исследовательской лаборатории. Альтернативой, которая предоставляет возможность изучать интересующий вирус различным исследовательским группам и проводить разработку противовирусных препаратов или вакцин против особо опасных патогенов, является использование технологии псевдовирусов. Псевдовирусы представляют собой химические частицы, которые имеют капсид одного вируса и поверхностный белок другого, исследуемого вируса. В отличие от инфекционных вирусов, работа с псевдовирусами безопасна, поскольку геном псевдовирусов нарушен для того, чтобы их инфекция ограничивалась лишь одним циклом, поэтому псевдовирусы также называются «вирусами одного цикла инфекции» [1, 9]. Начальные этапы инфекции псевдовирусов определяются их поверхностными белками и, таким образом, соответствуют ранним этапам инфекции вируса, вследствие чего псевдовирусы широко используются для изучения клеточного тропизма и распознавания рецепторов, механизмов проникновения вирусов и ингибирования данного этапа, а также для тестирования антител, химиопрепаратов и вакцин [1].

Для получения псевдовирuses чаще всего используют две платформы – лентивирусную и ретровирусную. Основу лентивирусной платформы составляют плазмидные векторы, разработанные на основе вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), вируса иммунодефицита обезьян (ВИО) [18, 19], вируса иммунодефицита кошек (ВИК) [11] и вируса мышинного лейкоза [17]. Данные векторы несут генетические последовательности, необходимые для вирусной транскрипции, упаковки и интеграции, за исключением тех, которые кодируют белки оболочки.

Среди лентивирусных систем для получения псевдовирuses наиболее широко используемой является система упаковки на основе ВИЧ-1. В качестве векторов используются от 2 до 4 плазмид, каждая из которых кодирует соответствующие гены ВИЧ-1, с целью минимизации рекомбинации вирусных генов и, как следствие, снижения вероятности возврата к вирусу дикого типа. В зависимости от этого, выделяют несколько поколений лентивирусных систем. Первое поколение включает 2 плазмиды, из которых одна плазида несет в своем составе ген поверхностного гликопротеина оболочки и является *оболочечной*, а другая плазида является *коровой* или *упаковочной*, несет гены белков лентивируса, необходимые для вирусной транскрипции, упаковки и интеграции. Позднее появились системы упаковки, состоящие из 3 или 4 плазмид – второе и третье поколение, соответственно. Так, второе поколение включает *упаковочную* плазмиду, экспрессирующую белки Gag и Pol; *трансферную* плазмиду, содержащую репортерный ген, цис-регуляторные элементы, необходимые для обратной транскрипции, интеграции и упаковки, а также множественные сайты клонирования; и *оболочечную* плазмиду, экспрессирующую поверхностный гликопротеин [9]. Третье поколение, кроме вышеописанных плазмид, включает дополнительную плазмиду, экспрессирующую белок Rev [2]. Например, с использованием системы псевдотипирования ВИЧ-1, были получены вирусные частицы, несущие поверхностные гликопротеины вируса Эбола [13], вируса Марбург [22], вируса Ласса [23], коронавируса ближневосточного респираторного синдрома [24], вируса бешенства [15], вируса чикунгуньи [21] и вируса Нипах [14]. Кроме того, на основе данной технологии активно разрабатываются псевдовирусные платформы для SARS-CoV-2 [3, 5, 6].

Помимо лентивирусной, другой популярной системой упаковки является система, основанная на использовании вируса везикулярного стоматита (ВВС). В ранних исследованиях для ко-инфекции клеток использовали два вируса, ВВС и любой другой вирус, в результате чего формировался псевдотипированный вирус, несущий кор ВВС с белками оболочки, полученными от другого вируса [4]. Позднее геном ВВС был клонирован в составе плазмиды, для того чтобы сделать его стабильным [20]; дополнительно в этот плазмидный вектор были добавлены различные репортерные гены (GFP или люциферазы светлячка) с целью облегчения обнаружения сборки вирусных частиц и их последующего проникновения в клетки-мишени [7, 12]. С использованием системы на основе VSV были получены псевдовирuses Эбола [16], вируса гепатита С [10], хантавируса [8] и др. Важно отметить, что при продукции псевдовирусных частиц в данном случае, может иметь место остаточный вирус ВВС, смешанный с псевдовирсом, что усложняет анализ нейтрализации, в котором он используется, или дает ложноположительные результаты. Поэтому количество ВВС должно быть минимизировано путем обработки препарата псевдовируса ВВС-нейтрализующим антителом до его использования в последующих анализах [9].

В заключение необходимо отметить, что технология псевдовирuses является безопасной, позволяет поддерживать высокий уровень воспроизводимости результатов, а метод нейтрализации с использованием псевдовирuses можно оптимизировать и стандартизировать.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

Библиографический список

1. Кононова А.А., Чересиз С.В., Прокопьева Е.А. и др. Разработка системы для поиска ингибиторов вируса клещевого энцефалита // *Современные проблемы науки и образования*. 2018. № 6. С. 1–9.
2. Dull T., Zufferey R., Kelly M. et al. A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system // *Journal of Virology*, 1998. V. 72. № 11. P. 8463–8471.
3. Hu J., Gao Q., He C. et al. Development of cell-based pseudovirus entry assay to identify potential viral entry inhibitors and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 // *Genes & Diseases*. 2020. V. 7. № 4. P. 551–557.
4. Huang A.S., Palma E.L., Hewlett N. et al. Pseudotype formation between enveloped RNA and DNA viruses // *Nature*, 1974. V. 252. № 5485. P. 743–745.
5. Hyseni I., Molesti E., Benincasa L. et al. Characterisation of SARS-CoV-2 Lentiviral Pseudotypes and Correlation between Pseudotype-Based Neutralisation Assays and Live Virus-Based Micro Neutralisation Assays // *Viruses*. 2020. V. 12. № 9.
6. Johnson M.C., Lyddon T.D., Suarez R. et al. Optimized pseudotyping conditions for the SARS-COV-2 spike glycoprotein // *bioRxiv*. 2020. P. 1–19.
7. Kaku Y., Noguchi A., Marsh G.A. et al. A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein // *Journal of Virological Methods*. 2009. V. 160. № 1–2. P. 7–13.
8. Lee B.H., Yoshimatsu K., Araki K. et al. A pseudotype vesicular stomatitis virus containing Hantaan virus envelope glycoproteins G1 and G2 as an alternative to hantavirus vaccine in mice // *Vaccine*. 2006. V. 24. P. 2928–2934.
9. Li Q., Liu Q., Huang W. et al. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses // *Reviews in medical virology*. 2018. V. 28. № 1. P. 1–10.
10. Matsuura Y., Tani H., Suzuki K. et al. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins // *Virology*. 2000. V. 286. P. 263–275.
11. Medina M.F., Kobinger G.P., Rux J. et al. Lentiviral vectors pseudotyped with minimal filovirus envelopes increased gene transfer in murine lung // *Molecular Therapy*. 2003. V. 8. № 5. P. 777–789.
12. Moeschler S., Locher S., Conzelmann K.K. et al. Quantification of lyssavirus-neutralizing antibodies using vesicular stomatitis virus pseudotype particles // *Viruses*. 2016. V. 8. № 9. P. 1–14.
13. Mohan G.S., Ye L., Li W. et al. Less is more: Ebola virus surface glycoprotein expression levels regulate virus production and infectivity // *Journal of Virology*. 2015. V. 89. № 2. P. 1205–1217.
14. Nie J., Liu L., Wang Q. et al. Nipah pseudovirus system enables evaluation of vaccines in vitro and in vivo using non-BSL-4 facilities // *Emerging microbes & infections*. 2019. V. 8. № 1. P. 272–281.
15. Nie J., Wu X., Ma J. et al. Development of in vitro and in vivo rabies virus neutralization assays based on a high-titer pseudovirus system // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. № 1. P. 1–12.
16. Quinn K., Brindley M.A., Weller M.L. et al. Rho GTPases modulate entry of Ebola virus and vesicular stomatitis virus pseudotyped vectors // *Journal of Virology*. 2009. V. 83. № 19. P. 10176–10186.
17. Sakuma T., De Ravin S.S., Tonne J.M. et al. Characterization of retroviral and lentiviral vectors pseudotyped with xenotropic murine leukemia virus-related virus envelope glycoprotein // *Human gene therapy*. 2010. V. 21. № 12. P. 1665–1673.
18. Sandrin V., Boson B., Salmon P. et al. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of pri-

mary lymphocytes and CD34⁺ cells derived from human and nonhuman primates // *Blood*. 2002. V. 100. № 3. P. 823–832.

19. Sandrin V., Cosset F.L. Intracellular versus cell surface assembly of retroviral pseudotypes is determined by the cellular localization of the viral glycoprotein, its capacity to interact with Gag, and the expression of the Nef protein // *Journal of Biological Chemistry*. 2006. V. 281. № 1. P. 528–542.

20. Whitt M.A. Generation of VSV pseudotypes using recombinant ΔG-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines // *Journal of virological methods*. 2010. V. 169. № 2. P. 365–374.

21. Wu J., Zhao C., Liu Q. et al. Development and application of a bioluminescent imaging mouse model for Chikungunya virus based on pseudovirus system // *Vaccine*. 2017. V. 35. № 47. P. 6387–6394.

22. Zhang L., Lei S., Xie H. et al. Screening and Identification of Marburg Virus Entry Inhibitors Using Approved Drugs // *Virologica Sinica*. 2019. P. 1–5.

23. Zhang X., Yan F., Tang K. et al. Identification of a clinical compound losmapimod that blocks Lassa virus entry // *Antiviral research*. 2019. V. 167. P. 68–77.

24. Zhao G., Du L., Ma C. et al. A safe and convenient pseudovirus-based inhibition assay to detect neutralizing antibodies and screen for viral entry inhibitors against the novel human coronavirus MERS-CoV // *Virology journal*. 2013. V. 10. № 1. P. 1–8.

УДК 577.127:547.973

АНТИОКСИДАНТНАЯ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФЛАВОНОИДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

**Р.Б. Сейдахметова¹, Т.С. Сейтембетов², Д.С. Тутай¹, А.Т. Казбекова²,
А.А. Жолбарыс¹, Д.К. Нуркадыров¹, Г.М. Байсаров¹, С.М. Адекенов¹**

¹Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан

²Медицинский университет Астана, Нур-Султан, Казахстан

Флавоноиды являются перспективными соединениями для разработки на их основе новых антиоксидантных и гепатопротекторных препаратов. В представленной статье обобщены результаты экспериментов по определению антиоксидантной, антирадикальной и гепатопротекторной активности образцов растительных флавоноидов в условиях *in vitro* и *in vivo*. По результатам экспериментов установлено, что выраженную антиоксидантную активность проявляет флавоноид артемизетин, антирадикальной активностью обладает оксим пиностробина. Также выявлена выраженная гепатопротекторная активность пиностробина и оксима пиностробина при токсическом гепатите *in vivo*.

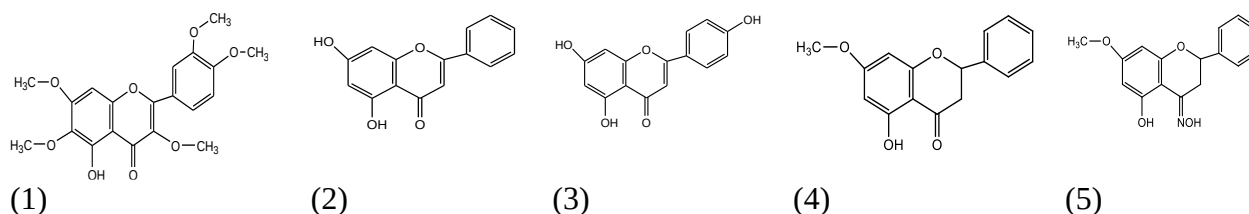
Ключевые слова: флавоноид, артемизетин, хризин, апигенин, пиностробин, антиоксидант, гепатопротектор.

Введение. В медицинской практике широко применяются лекарственные препараты на основе растительного сырья, содержащего флавоноид, с которым связывают широкий спектр биологической активности [1]. Флавоноиды являются одной из важных групп вторичных метаболитов и биологически активных соединений в растениях и перспективными источниками природных антиоксидантов [2–4]. В частности, антиоксиданты блокируют воз-

действие свободных радикалов, защищая организм от вредного воздействия окислительных процессов и ряда опасных заболеваний, например, снижая риски развития рака [5]. В представленной статье обобщены результаты экспериментов *in vitro* и *in vivo* по изучению антиоксидантной и гепатопротекторной активности образцов растительных флавоноидов артемизетина, хризина, апигенина, пиностробина и его оксима. Определена перспективность разработки новых антиоксидантных и гепатопротекторных препаратов на основе артемизетина, пиностробина и его оксима.

Материалы и методы. Объектами для исследования антиоксидантной и антирадикальной активности выбраны флавоноидные соединения артемизетин (Af-1) (1), хризин (Pb-4) (2), апигенин (Ap-1) (3), пиностробин (Pb-1) (4) и оксим пиностробина (OPb) (5), выделенные из растений, произрастающих в Казахстане: аянии кустарничковой (*Ajanía fruticulosa* (Ledeb.) Poljakov), почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.) и серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) [6–8].

Антиоксидантная и антирадикальная активность образцов флавоноидов изучались по методам FRAP (метод определения железо-восстанавливающего потенциала) и DPPH (метод, основанный на ингибировании радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила).



В качестве стандарта для оценки антиоксидантной активности *in vitro* применялась аскорбиновая кислота, для которой установлено наличие прямой зависимости величины оптической плотности от концентрации аскорбиновой кислоты (АК), что указывает на соответствующий механизм ингибирования перекисных процессов.

На основании анализа литературных данных, указывающих на наличие взаимосвязи между антиоксидантной активностью и гепатопротекторным свойством биологически активных веществ, проведен эксперимент *in vivo* с целью определения гепатопротекторной активности флавоноидных соединений артемизетина (1), пиностробина (4) и оксима пиностробина (5), обладающих выраженной антиоксидантной активностью *in vitro*.

Животные были разделены на группы по 10 крыс в каждой группе: 1) интактная группа; 2) группа с токсическим гепатитом (ТГ, после CCl_4 -воздействия); 3) опытная группа с применением пиностробина (4) (ТГ + пиностробин (4) в концентрации 30 мг/кг в течение 7 дней); 4) опытная группа с применением оксима пиностробина (5) (ТГ + оксим пиностробин в концентрации 30 мг/кг в течение 7 дней); 5) опытная группа с применением артемизетина (1) (ТГ + артемизетин в концентрации 30 мг/кг в течение 7 дней); 6) К – контрольная группа – с карсилем (ТГ + карсил концентрации 30 мг/кг в течение 7 дней).

Результаты и обсуждения

Антиоксидантная (АОА) и антирадикальная (АРА) активность *in vitro*

По результатам скрининга антиоксидантной и антирадикальной активности *in vitro* образцов растительных флавоноидов, а также их производных, выявлено, что в ряду данных соединений выраженную антиоксидантную активность проявляет флавоноид артемизетин (1), уступающий только эффекту аскорбиновой кислоты (рис. 1).

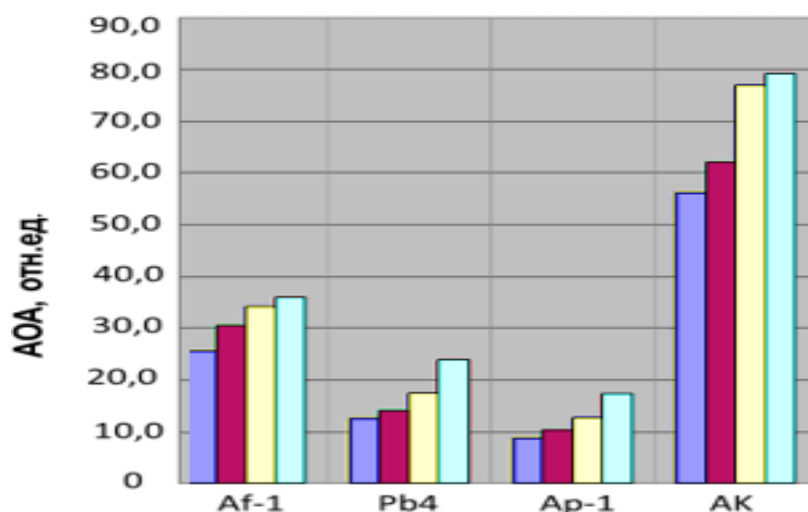


Рис. 1. Зависимость АОА от природы и концентрации исследованных веществ

Установлено наличие прямой зависимости между величинами антиоксидантной активности и концентрацией веществ, указывающей на радикальный механизм ингибирования перекисных процессов *in vitro*, что позволяет оценить антирадикальную активность объектов с выраженной антиоксидантной активностью.

Антирадикальная активность определена *in vitro* с применением свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. Зависимость оптической плотности от концентрации раствора исследуемого образца представлена в таблице 1. Сравнение динамики оптической плотности исследуемых растворов указывает на проявление антирадикального эффекта раствора оксима пиностробина (5), который уступает активности бутилгидроксианизола (ВНА).

Таблица 1

Динамика зависимости АРА от концентрации раствора исследуемого образца

Объект	Концентрация			
	0,25 мг/мл	0,5 мг/мл	0,75 мг/мл	1,0 мг/мл
ОРb (5)	0,4460±0,0089	0,5772±0,0058	0,5636±0,0057	0,5474±0,0055
ВНА	0,2850±0,0020	0,2400±0,0300	0,2290±0,0180	0,2610±0,0150

Оценка гепатопротекторной активности in vivo. Тетрахлорметан вызывает изменение ферментативной активности мембран, которая может регулироваться действием полифенольных соединений. Установлено, что при интоксикации активность трансаминаз повышается в 2–3 раза, а превентивное введение исследуемых соединений снижает данные параметры, при этом наиболее выраженный эффект проявляет пиностробин (4). Снижение малонового диальдегида в сыворотке крови, ткани мозга и печени крыс под действием пиностробина (4) и его оксима (5) указывает на положительный эффект изучаемых соединений. Динамика биохимических показателей гепатопротекторной активности *in vivo* при острой интоксикации печени лабораторных животных в присутствии исследуемых соединений отражена в таблице 2.

Таблица 2

Изменение биохимических показателей при гепаптозе

Группы	АЛТ	АСТ	ЩФ	МДА сыв.	МД А мозг	МД А печ.	Катала- за	Коэф. де Ри- тиса
	мкмоль/л*ч		нмоль/л* с	мкмоль/л			мкат/л	АСТ/А ЛТ
Интактный	1,170*	1,09*	1313,61*	6,67*	2,43 *	1,94 *	0,226*	0,951*
Контроль	3,13 ^	1,48 ^	2489,44 ^	11,84 ^	4,26 ^	3,23 ^	0,32 ^	0,48 ^
Артеми- зетин (1)	2,839 ^#	1,36 ^ *#	2011,38 ^*#	10,6 ^*#	2,81 ^	2,81 ^	0,284 ^*	0,485 ^#
Пиностро- бин (4)	1,298^	1,0 ^*#	1997,9 ^*#	8,66 ^ *#	3,23	2,37 *	0,275	0,771 ^
Оксим пи- ностробин (5)	1,99 ^*#	0,944 ^ ^*	1660,42 ^*#	9,48 ^ *#	2,83 *	2,16 *	0,255 ^*#	0,475 ^*#
Карсил	1,258*	0,903 ^ *	1593,61 ^ *	7,05*	2,68 *	2,21 *	0,301 ^ *	0,127 ^ *
^ – достоверность различия к данным интактных животных при $p < 0,05$; * – достоверность различия к значениям контрольной серии опытов – токсический гепатит при $p < 0,05$; # – достоверность различия к карсилу при $p < 0,05$.								

На основании полученных результатов установлена выраженная гепатопротекторная активность пиностробина (4) и оксима пиностробина (5) при токсическом гепатите. Гепатопротекторная активность указанных соединений проявилась в снижении уровня перекисных процессов и улучшении функционального состояния печени, которое оценивалось по результатам снижения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). На основании данных среднего процента гепаптоза защитной активности установлено, что наибольшей эффективностью в условиях CCl_4 - гепаптоза обладает флавоноид пиностробин (4) (93,4%).

Заключение. Проведенный скрининг на антиоксидантную активность *in vitro* образцов растительных флавоноидов и их производных, указывает на то, что в ряду исследованных соединений выраженную антиоксидантную активность проявляет флавоноид артемизетин (1), уступающий по эффекту только аскорбиновой кислоте, а сравнительно высокую антирадикальную активность проявляет оксим пиностробина (5). Также установлена выраженная гепатопротекторная активность пиностробина (4) и оксима пиностробина (5) при токсическом гепатите.

Таким образом, результаты выполненных экспериментов свидетельствуют о перспективности разработки на основе растительных флавоноидов новых лекарственных препаратов, что будет способствовать расширению ассортимента оригинальных фитопрепаратов и развитию отечественного фармацевтического производства.

Работа выполнена по грантовому проекту АР09259740 «Изучение взаимосвязи «структура-активность» и фармакологическое исследование новых растительных метаболитов и их производных», финансируемого Комитетом науки МОН Республики Казахстан

Библиографический список

1. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений. Самара, 2012. 290 с.
2. Kim D., Jeond S., Lee C. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums // Food Chemistry. 2003. No 81. P. 321–326.
3. Sokol-Letowska A., Oszmianski J., Wojdylo A. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap // Food Chemistry. 2007. V. 103. P. 853–859.
4. Candan F., Unlu M., Tepe B. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (*Asteraceae*) // Journal of Ethnopharmacology. 2003. V. 87. P. 215–220.
5. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview // Methods Enzymol., 1990. No 186. P. 80–85.
6. Донбаева Э.К., Хабаров И.А., Смагулова Ф.М. и др. Артемизетин из *Ajania fruticulosa* (Ledeb.) Poljak и разработка рабочего стандартного образца на его основе // Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений. Алматы. 2007. С. 208.
7. Адекенов С.М., Байсаров Г.М., Хабаров И.А. и др. Флавоноиды почек тополя бальзамического *Populus balsamifera* L. и способы их выделения // Химия растительного сырья. 2020. № 2. С. 181–188.
8. Нуркадыров Д.К., Байсаров Г.М., Адекенов С.М. Растения – потенциальные источники флавоноида апигенина // Современные тенденции развития технологий здоровье сбережения. Москва. 2019. С. 156–162.

УДК 616-091.8

РАЗРАБОТКА БИОПОЛИМЕРНЫХ КАРКАСОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ КОЖИ

Н.М. Семенихина, К.Е. Абрамова, Н.А. Омелько, Е.В. Климова
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

В работе представлены данные по созданию из природного биополимера коллагена разных видов скаффолдов с целью их дальнейшего использования в тканеинженерных конструкциях кожи. Коллаген получали из сухожилий хвостов крыс методом кислотной экстракции. Для создания скаффолдов производили полимеризацию коллагена и его лиофильное высушивание. Полученные образцы оценивали на биосовместимость и цитотоксичность на культуре дермальных фибробластов, используя ХТТ-тест. Клетки получали миграционным способом из биоптатов кожи. Для проведения теста использовали фибробласты на 3 –м пассаже с высокой пролиферативной активностью. Было выявлено преобладание показателей теста у лиофильно высушенных скаффолдов ($p < 0,01$) в сравнении с гидрогелевыми образцами. В контрольной группе показатели теста были максимально высокие ($p < 0,01$), что можно объяснить способностью клеток легко прикрепляться к пластику. Фибробласты во всех опытных группах оставались жизнеспособными на протяжении трех дней, образовывали ровный монослой 70–80%.

Ключевые слова: регенеративная медицина, эквивалент кожи, биополимеры, коллаген, фибробласты.

Введение. Разработка скаффолдов и эквивалентов кожи на их основе связана прежде всего с необходимостью повышения эффективности лечения ожогов, хронических ран, а также реэпителизации больших площадей поврежденного кожного покрова при хирургических операциях [1]. Кожные эквиваленты применяют в косметологии для тестирования новых косметических средств, в фармакологии для оценки биологической активности, проницаемости [1, 8] и аллергизирующих свойств дерматотропных лекарственных препаратов [10]. Также в последнее время разрабатываются эквиваленты кожи уже с моделированным заболеванием, в частности экзема, атопический дерматит, фиброз, раковые заболевания и др. [3–5, 7, 9].

Эквиваленты кожи могут быть сконструированы на основе клеток эпидермиса, дермы или тех и других, в таком случае они носят название полнослойные. Для создания эквивалентов чаще используют фибробласты, меланоциты и кератиноциты. Кератиноциты являются наиболее распространенным типом клеток кожи и образуют поверхностный барьерный слой. Меланоциты находятся в нижнем слое эпидермиса и обеспечивают цвет кожи. Фибробласты образуют нижний слой дермы и обеспечивают прочность и упругость [6].

Также важным компонентом эквивалента кожи является межклеточный матрикс. В настоящее время для его изготовления используют большой спектр веществ, выбор зависит от того, какие свойства должны проявлять эквиваленты кожи.

В настоящее время имеется большое количество научных публикаций, посвященных созданию матриксов на основе полимерных биоматериалов. В частности, к ним относятся синтетические полимеры – сложные эфиры и сополимеры, полиангидриды и прочее, а также природные полимеры – коллаген, шелк, хитозан, альгинат [11, 13]

Для получения трехмерной структуры с системой взаимосвязанных пор используют различные методы. В частности, в литературе описаны методы фазового разделения, вспенивания, электроспиннинг [10].

Метод децеллюляризации подразумевает собой процедуру очистки тканей, соединительно-тканых комплексов или же органов в целом от клеточного компонента. Созданные эквиваленты кожи методом децеллюляризации хорошо подходят для тестирования проницаемости и доставки лекарств [6].

Наиболее распространенным методом создания модели кожи *in vitro* является использование гидрогелей, служащих каркасом для дермальных фибробластов, которые затем культивируются совместно с кератиноцитами на поверхности. Коллаген типа I часто служит в качестве гидрогелевого материала, а клетки дермальных фибробластов обычно распределяются внутри коллагенового геля для имитации дермального слоя [2, 12]

Цель исследования: разработать скаффолды на основе коллагена и оценить их биосовместимость и цитотоксичность на культуре дермальных фибробластов.

Материалы и методы исследования. В качестве биополимера использовали коллаген, экстрагированный из сухожилий крысиных хвостов уксусной кислотой на протяжении 30 дней при температуре 4°C. Полученный раствор коллагена осаждали, центрифугировали, очищали путем диализа против воды. Оценили стерильность микробиологическим способом, определили концентрацию. После этого получали гидрогель. Также изготавливали пленки из коллагена методом лиофильного высушивания.

Культуру фибробластов получали из биоптатов кожи здорового донора механическим способом. Для этого кожу разделяли на мелкие фрагменты и помещали в чашки Петри с культуральной средой, накрывали покровным стеклом. Состав ростовой среды включал в себя готовую питательную среду DMEM/F12, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% антибиотик-антимикотик. Через 14 дней удаляли фрагменты кожи, а прикрепившиеся клетки трипсинизировали, подсчитывали и пересеивали в новую чашку Петри со свежей ростовой средой. Для оценки полученных скаффолдов использовали фибробласты на 3-м пассаже.

Оценку биосовместимости и цитотоксичности скаффолдов проводили при помощи ХТТ теста. Для этого готовили рабочий раствор ХТТ реагента в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Германия). Образцы коллагеновых матриц размером 0,3×0,3 см укладывали в 96-луночную планшете, затем засеивали поверхность суспензией фибробластов из расчета 5 000 клеток на каркас при помощи многоканального дозатора. После 72 часов культивирования в каждую лунку добавляли 200 мкл рабочего раствора ХТТ, инкубировали 4 часа. Контролем служили клетки, свободно культивируемые в планшете. Результаты оценивали через 4 часа при помощи планшетного ридера в стандартных условиях при длине волны 450 нм.

Результаты исследований. Для получения скаффолдов использовали коллаген, полученный из сухожилий крысиных хвостов. После экстрагирования и диализа конечная концентрация коллагена составила $1,7 \pm 0,1$ мг/мл. Для получения гидрогеля производили полимеризацию коллагена раствором щелочи. При этом нами был получен плотный гель, который держал свою форму. При лиофильной сушке коллагена был получен скаффолд в виде тонкой пленки беловатого цвета плотной консистенции. Полученные скаффолды обладали стерильностью, что подтвердилось отсутствием роста микроорганизмов на питательной среде с помещенными на нее опытными образцами.

Культуру дермальных фибробластов для оценки скаффолдов получали миграционным способом. Через 14 дней были выделены клетки, обладающие мезенхимальным фенотипом: веретенообразной формы, с крупным центральным ядром, расположены пучками. При оценке ростовых свойств фибробластов на третьем пассаже было выявлено их высокая пролиферативная активность, в связи с чем стали использовать клетки на 3-м пассаже для дальнейшей оценки скаффолдов.

При проведении ХТТ-теста было выявлено преобладание показателей в контрольной группе ($p < 0,01$), что можно объяснить условиями эксперимента и способностью клеток легко прикрепляться к пластику. При сравнении данных опытных образцов было отмечено преобладание показателей теста у лиофильно высушенных скаффолдов ($p < 0,01$). Фибробласты во всех опытных группах оставались жизнеспособными на протяжении трех дней, образовывали ровный монослой 7-80%.

Заключение. Скаффолды на основе коллагена в виде гидрогеля или лиофильно высушенных пленок обладают биосовместимостью и не проявляют цитотоксических свойств на культуру дермальных фибробластов. В связи с чем они могут быть использованы как матрикс при создании тканеинженерных конструкций кожи с заданными свойствами.

Библиографический список

1. Asbill C. et al. Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies // *Pharmaceutical research*. 2000. Т. 17. №. 9. Р. 1092–1097.
2. Carlson M.W. et al. Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin // *Current Protocols in Cell Biology*. 2008. Т. 41. №. 1. Р. 1991–1997.
3. Gu H. et al. Development of a new eczema-like reconstructed skin equivalent for testing child atopic dermatitis-relieving cosmetics // *Journal of cosmetic dermatology*. 2020. Т. 19. №. 3. Р. 752–757.
4. Kitisin T. et al. Utilization of an in vitro biofabricated 3D skin as a pathological model of cutaneous candidiasis // *The new Microbiologica*, 2020. Т. 43. №. 4.
5. Liu X. et al. A biofabricated vascularized skin model of atopic dermatitis for preclinical studies // *Biofabrication*. 2020. Т. 12. №. 3.
6. MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin // *Nature*. 2007. Т. 445. №. 7130. Р. 874–880.

7. Netzlaff F. et al. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005. Т. 60. №. 2. С. 167–178.
8. Pappinen S. et al. Organotypic cell cultures and two-photon imaging: tools for in vitro and in vivo assessment of percutaneous drug delivery and skin toxicity // *Journal of controlled release*. 2012. Т. 161. №. 2. Р. 656–667.
9. Semlin L. et al. In vitro models for human skin disease // *Drug discovery today*. 2011. Т. 16. №. 3–4. Р. 132–139.
10. Suhail S. et al. Engineered skin tissue equivalents for product evaluation and therapeutic applications // *Biotechnology journal*. 2019. Т. 14. №. 7.
11. Van Gele M. et al. Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations // *Expert opinion on drug delivery*. 2011. Т. 8. №. 6. Р. 705–720.
12. Zaroni T. B. et al. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT) // *Toxicology letters*. 2014. Т. 227. №. 2. Р. 139–149.
13. Zhuang L. et al. Development of a new diaper dermatitis like reconstructed skin equivalent for testing children atopic dermatitis relieving cosmetics // *Skin Research and Technology*. 2019. Т. 25. №. 6. Р. 839–845.

УДК 582.28, 615.281.8, 615.277.3

ГРИБЫ-МАКРОМИЦЕТЫ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ВИРУСОВ И ОПУХОЛЕЙ

Т.В. Теплякова

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, Россия*

Представлены данные коллектива микологов и вирусологов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по выделению грибов-макромицетов в чистую культуру, изучению их культурально-морфологических характеристик, а также оценке противовирусных и противоопухолевых свойств водных экстрактов, полисахаридов и меланинов. Обосновано дальнейшее изучение некоторых штаммов, выделенных в чистую культуру, как например, гриба чага, *Inonotus obliquus*, который имеет широкий спектр противовирусной активности. Водные экстракты и меланин из природной чаги подавляли репликацию коронавируса SARS-cov-2.

Ключевые слова: грибы-макромицеты, плодовые тела, мицелий, выделение, перспективные штаммы, культивирование, противовирусная и противоопухолевая активность.

Введение. Более 200 видов грибов-макромицетов используются в традиционной медицине Китая, Кореи, Японии и других юго-восточных стран. В России широко известен гриб чага и препараты из него, но природные запасы лекарственных грибов истощаются, поэтому большую актуальность приобретает развитие биотехнологий на основе грибов. Западная Сибирь представляет собой уникальный регион России с высокой концентрацией биоразнооб-

разия и природных ресурсов, в том числе и лекарственных видов грибов. Для разработки новых лекарственных препаратов важным является наличие эффективных штаммов – продуцентов биологически активных веществ.

Поиск новых продуцентов биологически активных веществ среди грибов- макромицетов природных местообитаний чрезвычайно актуален для медицинской биотехнологии.

Цель данной работы: обобщить результаты проведенных исследований за 2007-2021 гг., по которым опубликовано более 150 статей, 2 монографии, получено 12 патентов на изобретения с целью определения наиболее перспективных штаммов грибов для разработки медицинских препаратов против вирусов и опухолей.

Материалы и методы. Методы исследований изложены в отчетах ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора, в приведенных публикациях и патентах.

Результаты и обсуждение. Впервые на юге Западной Сибири из природных местообитаний в чистую культуру выделены 130 штаммов 60 видов грибов- макромицетов, имеющих пищевое и лекарственное назначение (1-3). На основе эффективных штаммов может быть получена биомасса мицелия методами биотехнологии. Известно, что по содержанию полисахаридов, белков и других ценных компонентов она не отличается от плодовых тел. К съедобным грибам-макромицетам относятся *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная или устричная), *Pleurotus pulmonarius* (вешенка легочная), *Coprinus comatus* (навозник белый или лохматый), *Laetiporus sulphureus* (трутовик серно-желтый), *Flammulina velutipes* (опенок зимний), *Lycoperdon perlatum* (дождевик шиповатый), *Lycoperdon utriforme* (дождевик мешковидный), *Grifola frondosa* (грифола курчавая), *Phallus impudicus* (веселка обыкновенная), *Piptoporus betulinus* (трутовик березовый) и другие. К чисто лекарственным грибам (с твердыми плодовыми телами): *Fomitopsis officinalis* (лиственничная губка, трутовик лиственничный), *Ganoderma applanatum* (трутовик плоский), *Fomes fomentarius* (трутовик обыкновенный), *Trametes versicolor* (траметес разноцветный), *Inonotus obliquus* (трутовик скошенный, чага).

Для большинства из этих грибов подобраны среды и условия культивирования, позволяющие получать до 15-20 г сухой биомассы гриба на 1 л среды в условиях глубинного культивирования, имеются методики по выращиванию грибов твердофазным методом на разных субстратах.

Разработана стандартная операционная процедура (СОП) для обнаружения и контроля микофильных грибов в культурах штаммов- продуцентов препаратов.

Анализ противовирусной активности более 700 образцов (водных экстрактов, полисахаридов, меланинов) из грибов позволил отобрать наиболее перспективные природные штаммы, проявляющие противовирусный эффект в отношении вирусных патогенов из коллекции ГНЦ ВБ Вектор: вируса иммунодефицита человека 1 типа [3, 8] вируса простого герпеса 2 типа [13], вируса гриппа разных субтипов [11, 12] вируса Западного Нила, ортопоксвирусов (вируса натуральной оспы, вируса осповакцины, вируса оспы обезьян) [14]. Отобраны штаммы, наиболее эффективные и технологичные для разработки противовирусных препаратов. Было обнаружено, что чага обладает самым широким спектром противовирусной активности [14]. Она имеет сложный полифенолоксикарбоновый комплекс (ПФК), включающий в себя меланины и многие другие соединения.

Водные экстракты природной чаги показали противовирусный эффект на культуре клеток и на животных (мыши) в отношении следующих штаммов вируса гриппа: вируса гриппа

птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), пандемического вируса гриппа A/Moscow/226/2009 (H1N1)v, вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) [2, 7, 11, 12].

Для получения меланина на основе культивируемого штамма чаги *Inonotus obliquus* разработан технологический регламент. Электронно-микроскопическое исследование влияния меланина из глубинной культуры чаги *I. obliquus* F-1244 на вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm09) в культуре клеток MDCK показало, что меланин действует на репликацию и морфогенез вируса [10].

Получены ингибиторы репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе водного экстракта гриба *Inonotus obliquus* (приоритетная справка № 2020127270 от 13.08.2020) [5] и на основе меланина из чаги *Inonotus obliquus* (приоритетная справка № 2020133916 от 14.10.2020) [6].

Поиск новых продуцентов противоопухолевых соединений из базидиальных грибов является актуальной задачей для развития медицинской биотехнологии.

Полисахариды базидиальных грибов и их комплексы с белками рассматривают как новый тип противоопухолевых соединений. На основе литературных данных и собственных исследований установлено, что существует корреляция противовирусной и противоопухолевой активности [14].

Проведен скрининг экстрактов, полисахаридов и меланина в отношении клеток Hep-2, HeLa и MCF-7. Концентрация, ингибирующая рост клеток на 50 % (ИК50) экстрактов из мицелия дождевика жемчужного *Lycoperdon perlatum* составила для клеток Hep-2 и HeLa 25 мкг/мл и 30 мкг/мл, соответственно. Экстракты из мицелия трутовика горбатого *Trametes gibbosa* ингибировали рост клеток Hep-2 и HeLa в концентрациях 90 мкг/мл и 100 мкг/мл, соответственно. ИК50 экстрактов из мицелия вольвариеллы вольвовой *Volvariella volvacea* составила 80 мкг/мл для клеток Hep-2, 85 мкг/мл для клеток HeLa и 64 мкг/мл для MCF-7 [15].

Интерес для дальнейших исследований представляет гриб *Daedaleopsis confragosa*, F-1368. Данный штамм содержит белки, проявляющие противоопухолевую активность в отношении миеломы костного мозга человека (IM-9), лимфомы человека (Namalva) и ингибирующую активность против простого герпеса 2 типа, вируса гриппа A/H1N1/California/2009 [1].

Выводы. Грибы-макромицеты из лесных местообитаний юга Западной Сибири представляют богатый источник биологически активных веществ (БАВ), которые проявляют противовирусную и противоопухолевую активность. Это является основой создания эффективных, нетоксических биопрепаратов, в том числе и против коронавируса Sars-cov-2, вызвавшего пандемию COVID-19. Гриб чага характеризуется самым широким спектром противовирусной активности, ингибируя все изученные нами вирусы. Изучение механизмов действия чаги позволит получать на ее основе противовирусные препараты против ряда опасных вирусных патогенов. Проявление противоопухолевых свойств штаммами грибов с противовирусной активностью дает возможность создавать комплексные препараты.

Библиографический список

1. Kochneva G., Grazhdantseva A., Lebedev L. et al. Antitumor activity of the proteins from biomass of fungus *Daedaleopsis confragosa* F-1368 in relation to human epidermoid carcino-

ma // Abstract of the 10th International Medicinal Mushroom Conference (September 19–22. 2019, Nantong, China). P. 266–267.

2. Teplyakova T. V., Ilyicheva T. N., Kosogova T. A. et al. Medicinal Mushrooms Against Influenza Viruses // International Journal of Medicinal Mushrooms. 2021. V. 23(2). P.1–11

3. Teplyakova T.V., Gashnikova N.M. Medicinal Mushrooms in Complex Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection // International Journal of Medicinal Mushrooms. 2019. V. 21(5). P. 487-492.

4. Teplyakova T.V., Psurtseva N.V., Kosogova T.A. et al. Antiviral Activity of Polyporoid Mushrooms (Higher Basidiomycetes) from Altai Mountains // International Journal of Medicinal mushrooms. 2012. V. 14(1). P. 37–45.

5. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Skarnovich M.O. et al. SARS-CoV-2 coronavirus replication inhibitor based on melanin from *Inonotus obliquus* fungus. Russian Federation Patent 2747018 C1. No 2020133916. Application date 14 Oct 2020. Publication date: 23 Apr 2021. Bulletin No 12.

6. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Skarnovich M.O. et al. Sars-cov-2 Coronavirus replication inhibitor based on Humic substances. Russian Federation Patent 2752872 C1. No 2020136343. Application date 03 Nov 2020. Publication date: 11 Aug 2021. Bulletin No 23.

7. Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Markovich N.A. Prospects for the Development of Anti-Influenza Drugs Based on Medicinal Mushrooms (Review) // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. Vol. 56. N 5. P. 489-496. DOI: 10.1134/S0003683820050142.

8. Гашникова Н.М., Теплякова Т.В., Проняева Т.Р. и др. Результаты исследований по выявлению анти-ВИЧ активности экстрактов из высших базидиальных грибов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. №2. С. 170–171.

9. Горбунова И.А., Власенко В.А., Теплякова Т.В. и др. Ресурсы лекарственных грибов на юге Западной Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2009. № 1. С. 12–21.

10. Ильичева Т.Н., Ананько Г.Г., Косогова Т.А. и др. Противовирусная активность меланина из чаги *Inonotus obliquus*), полученного на основе культивирования штамма F-1244, выделенного в чистую культуру // Химия растительного сырья. 2020. №2. С. 283–289. DOI: 10.14258/jcprm.2020025167.

11. Кабанов А.С., Косогова Т.А., Шишкина Л.Н. и др. Изучение противовирусной активности экстрактов, выделенных из базидиальных грибов, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов вируса гриппа разных субтипов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2011. № 1. С. 40–43.

12. Кабанов А.С., Шишкина Л.Н., Теплякова Т.В. и др. Изучение противовирусной эффективности экстрактов, выделенных из базидиальных грибов, в отношении вируса гриппа птиц // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2009. №2. С. 185–186.

13. Разумов И.А., Косогова Т.А., Казачинская Е.И. и др. Противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов // Антибиотики и химиотерапия. 2010. Т.55. № 9-10. С. 14–18.

14. Теплякова Т.В., Косогова Т.А. Высшие грибы Западной Сибири-перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск. 2014. 298 с.

15. Трошкова Г.П., Костина Н.Е., Бардашева А.В. и др. Базидиальные грибы Западной Сибири – продуценты противоопухолевых соединений // Успехи медицинской микологии. 2014. Т. 12. С. 355–358.

УДК 577.112.083: 577.112.4

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНЫЙ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР ЧЕЛОВЕКА

Д.Н. Щербаков, Е.А. Волосникова, Т.И. Есина, Я.С. Гогина,

Е.Д. Даниленко, М.Б. Боргоякова, Н.В. Волкова

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Роспотребнадзора, НСО, Кольцово, Новосибирская область, Россия

Проведена очистка и выделение рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GM-CSF). Получены конъюгаты рекомбинантного GM-CSF человека с декстраном в комплексе с рекомбинантным аналогом рецепторсвязывающего домена поверхностного белка S SARS-CoV-2. Разработана схема иммунизации мышей полученными конъюгатами. При помощи ИФА показаны отличия в гуморальном иммунном ответе.

Ключевые слова: RBD, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, хроматография, конъюгация

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения [1], на 17 сентября 2021 г. количество смертей от коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2, превышает 4,5 миллиона.

Пандемия COVID-19 заставила исследователей всего мира вести разработки вакцин против этой инфекции на основе большого числа платформ. В первую очередь на основе вирусных векторов, рекомбинантных белков и нуклеиновых кислот.

Вакцины на основе белков и нуклеиновых кислот считаются более безопасными, чем на основе вирусных векторов, так как в них отсутствуют инфекционные агенты, однако эти вакцины менее иммуногенны, поэтому часто вместе с ними необходимо применять адъюванты, а также разрабатывать более сложные схемы иммунизации: двух- и трёхкратное введение. Рецептор связывающий домен RBD является привлекательной мишенью, так как он содержит основные эпитопы нейтрализующих антител, достаточно консервативен и потенциально более безопасен чем полноразмерный спайковый белок.

Для увеличения иммуногенности возможно использование адъювантов. Одной из перспективных групп адъювантов являются рекомбинантные цитокины.

Таким образом, целью работы была разработка и анализ иммуногенности вакцинных конструкций на основе рекомбинантного аналога рецептор связывающего домена поверхностного белка S SARS-CoV-2 в комплексе с рекомбинантным гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) человека.

Материалы и методы. *Получение рекомбинантных белков.* Культуры-продуценты RBD и тримеров S-белка получали на основе клеточной линии яичников китайского хомячка CHO-K1. Для этого проводили трансфекцию клеток плазмидами pVEAL2-RBD (содержит последовательность, кодирующую RBD) и pVEAL2-S (содержит последовательность, коди-

рующую S белок с рядом стабилизирующих мутаций), соответственно, с помощью LipoFestamine 3000 (ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя. Клетки-продуценты культивировали на роллерных установках в среде DMEM/F12 и собирали культуральную среду.

Для получения GM-CSF использовали штамм-продуцент *E. coli* SG20050/p280_2GM из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (№ В-1369) [4]. Культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* SG 20050/p280_2GM проводили в полупромышленном ферментере «Биотрон», Liflус SP вместимостью 100 л.

Анализ содержания целевого белка. Содержание целевых белков определяли методом электрофореза в 12 % полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с окрашиванием Кумасси G-250 и последующим денситометрическим сканированием окрашенных гелей. Относительное содержание белка определяли с использованием программы «Gel-Pro Analyzer, Ver. 3.1».

Очистка рекомбинантных белков. Рекомбинантный RBD выделяли из культуральной среды клеток CHO-K1. Культуральную среду центрифугировали для удаления клеточного дебриса, фильтровали с помощью фильтрационных систем (0,22 мкМ). Первый этап очистки рекомбинантного белка включал металл-хелатную хроматографию на колонке с Ni-NTA (Qiagen, Германия). На следующем этапе проводили очистку ионообменной хроматографией на соединенных последовательно колонках с катионообменным (SP-сефароза) и анионообменным (Q-сефароза) сорбентами.

Для выделения GM-CSF биомассу *E. coli* разрушали при помощи ультразвука до снижения оптической плотности при длине волны 595 нм до 40–45% от ее исходного значения. Затем суспензию центрифугировали. Осадок телец включения отмывали. Экстракцию целевого белка из телец включения проводили буфером, содержащим солибилизирующий агент – мочевины, в концентрации 6 моль/л.

Для очистки белка GM-CSF применялась комбинация двух ионообменных хроматографий на сорбентах при значении pH 8,0 [3]. Субстанцию белка стерильно фильтровали через фильтры 0.22 мкМ и хранили при температуре минус 20 °C.

Получение конъюгатов белка GM-CSF с комплексом декстран-спермидин (PGS). Конъюгаты (GM-CSF + PGS) получали путем конъюгирования декстрана 40 000 с белком GM-CSF и спермидином. Декстран активировали периодатом натрия в соотношении 1 : 40 (моль/моль), непрореагировавшие компоненты отделяли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. К активированному декстрану добавляли субстанцию белка GM-CSF в эквивалентном количестве. Смесь инкубировали в течение двух часов. Затем в смесь добавляли раствор спермидина (Sigma, США) из расчета на одну молекулу декстрана – 30 молекул спермидина. Смесь инкубировали в течение двух часов и добавляли боргидрид натрия, из расчета 80 молекул боргидрида на одну молекулу декстрана, инкубировали два часа и удаляли непрореагировавшие компоненты гель-фильтрацией на сефадексе G-25.

Иммунизация мышей. Эксперименты были одобрены Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГНЦ ВБ «Вектор»/10-09.2020, утвержден протоколом Биоэтической комиссии №5 от 01.10.2020).

Иммунизацию проводили на мышах линии Balb/c, самцах, весом 16–18 г, 10 шт./группе. Контрольной группе вводили 0,9% раствор хлорида натрия. Опытным группам вводили белок-антиген в дозе 50 мкг/мышь (RBD), индивидуально или в сочетании

с препаратами GM-CSF в дозе 40 мкг/мышь, в/м, в объёме 0,2 мл/мышь. Препарат вводили двукратно с интервалом в три недели. Кровь для проведения ИФА забирали через 10 дней после второй иммунизации.

Определение титра специфических антител с помощью ИФА. Рекомбинантные белки RBD и тримеры S-белка (50–100 нг/лунку) сорбировали в лунках 96-луночного планшета в PBS, pH 7.4 (Greiner bio one, Германия) при +4°C в течение ночи. Отмывали буфером PBST (0.1% р-р Tween-20 в PBS) и блокировали 1 % раствором казеина в буфере PBST в течение одного часа при комнатной температуре. После этого образцы сывороток (100 мкл) вносили в разведении 1:100 и инкубировали в течение 1,5 часов при 37 °C. Затем добавляли антитела против IgG человека (1:5000 в 1% блокирующем буфере), конъюгированные с пероксидазой хрена (GenScript, США), инкубировали в течение одного часа при 37°C. Лунки промывали буфером PBST и вносили раствор субстрата TMB (Amresco, США), терминировали реакцию раствором 1N HCl и измеряли OD450 на Varioskan Lux multimode microplate reader (Thermo Scientific., США). Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0.

Результаты исследования. Несмотря на то, что белок RBD имеет вирусное происхождение, его иммуногенность сама по себе не позволяет использовать его для вакцинации, поэтому для разработки вакцин необходимо использовать адъюванты и приемы, повышающие иммуногенность. Очень важным требованием при получении вакцин является минимальное влияние на структуру белка комплексов, образующихся с адъювантом или других методов увеличения иммуногенности. Важность сохранения структуры белка обусловлена необходимостью презентовать иммунной системе эпитопы проективных белков в форме, максимально приближенной к нативной, что позволяет индуцировать наработку нейтрализующих антител.

В работе для усиления иммунного ответа были предложено использовать GM-CSF. Ранее было показано, что GM-CSF обладает адъювантными свойствами и способен усиливать иммунный ответ [2]. Сравнение титров специфических антител в ответ на введение GM-CSF в комплексе с RBD в нашем эксперименте не позволило значительно усилить иммунный ответ (рис.). Средние титры специфичных антител против RBD в группе, иммунизированной комплексом GM-CSF + RBD, были несколько ниже, чем в группе, иммунизированной RBD. Однако средние титры антител против тримера S белка оказались сходными. Это может свидетельствовать о том, что использование GM-CSF + RBD не препятствует индукции антител, взаимодействующих с эпитопами, доступными в составе полноразмерного белка. В то же время часть антител, возникающих в ответ на иммунизацию «голым» RBD, не реактивны в отношении полноразмерного S белка.

Значительного увеличения иммуногенности удалось добиться при использовании комплекса GM-CSF + PGS + RBD. Средние титры антител в группе, иммунизированной этим вариантом, были практически на порядок выше средних титров в группе, иммунизированной RBD. Важно также отметить, что антитела были реактивны как в отношении RBD, так и S белка, что говорит о распознавании эпитопов RBD в составе тримера (рис. 1).

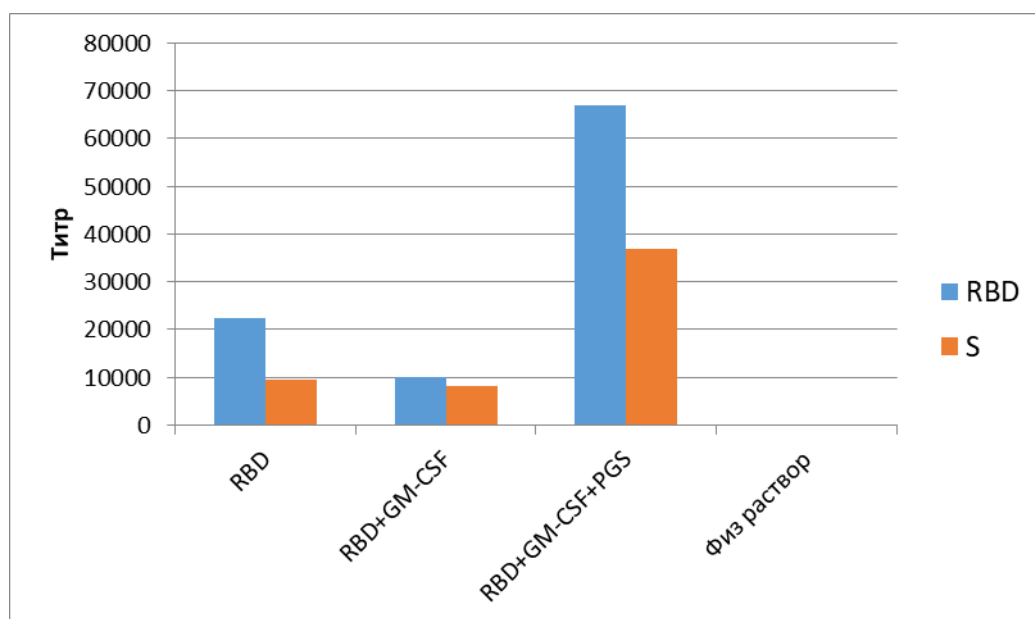


Рис. 1. Средние титры специфических антител после иммунизации RBD и конструкциями, содержащими GM-CSF

Заключение. В работе с целью увеличения иммуногенности RBD были получены конструкции, включающие рекомбинантный GM-CSF. Иммунизация мышей полученными конструкциями показала, что использование GM-CSF позволяет сконцентрировать иммунный ответ на эпитопах RBD, распознаваемых в составе полноразмерного тримеризованного S белка. Конъюгация GM-CSF с PGS позволила увеличить иммуногенность RBD, средние титры специфических антител значительно превышали аналогичные титры для группы, иммунизированной RBD. При этом индуцированные антитела распознавали эпитопы RBD в составе S белка. Предложенный комплекс GM-CSF + PGS + RBD является альтернативой существующим подходам по увеличению иммуногенности, таким как использование адъювантов на основе солей алюминия.

Библиографический список

1. World Health Organization. COVID-19 weekly epidemiological update. Edition 57. 14 September 2021.
2. Алпатова Н.А. и др. Адъювантные свойства цитокинов при вакцинации (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2019. Т. 53. № 11. С. 3–8.
3. Есина Т.И., Лебедев Л.Р., Волосникова Е.А. и др. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека // Биотехнология. 2019. Т. 35. №. 3. С. 68–73. DOI 10.21519/0234-2758-2019-35-3-68-73.
4. Рекомбинантная плазмидная ДНК p280_2GM, кодирующая полипептид со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, штамм E.COLI SG 20050/ p280_2GM – продуцент полипептида со свойствами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека и способ получения указанного полипептида: пат. 2708556 Рос. Федерация. № 2018140842 / Гилева И.П. и др.; заявл. 19.11.2018; опубл. 09.12.2019, Бюл. № 34.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ РАСТЕНИЙ

УДК 634.8; 631.527

ИЗУЧЕНИЕ СЛУЧАЙНОГО ПЕРЕОПЫЛЕНИЯ ГИБРИДОВ F1 ВИНОГРАДА

М.М. Агаханов, Ю.В. Ухатова

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

Один из способов борьбы с вирусами и патогенами виноградной лозы – это гибридизация с вовлечением в качестве родительских форм устойчивых автохтонных (староместных) сортов. Некоторые из сохранившихся местных сортов винограда прошли естественный отбор на резистентность к филлоксеру, милдью и оидиуму и имеют гены устойчивости к этим патогенам. На основании результатов микросателлитного анализа с использованием SSR праймеров выявлены гибриды, которые не подверглись контаминации и потенциально могут быть использованы для создания генетических карт.

Ключевые слова: виноград, автохтонные сорта, гибридизация, микросателлитный анализ.

Виноградная лоза является многолетней широко культивируемой сельскохозяйственной культурой. Получение большого и качественного урожая напрямую зависит от фитосанитарного состояния насаждения. Известно, что виноград поражают различные грибные заболевания, и вредители тоже наносят значительный ущерб. Особенно сильным вред, наносимый болезнями и вредителями, возник тогда, когда из Америки были завезены грибные болезни – милдью и оидиум, а затем филлоксеры. Появление филлоксеры способствовало уничтожению почти всех старых виноградников Старого Света. Среди грибных болезней наиболее опасными считаются: оидиум (*Uncinula necator* Burill.), серая гниль (*Botrytis cinerea* Pers.), фомопсис (*Phomopsis viticola* Sacc.), милдью (*Plasmopara viticola* Berl. Et Toni.), антракноз (*Gloeosporium ampelophagum* Sacc.). Некоторые из сохранившихся местных сортов винограда прошли естественный отбор на резистентность к филлоксеру (*Phylloxera vastatrix* Planch.), милдью и оидиуму и имеют гены устойчивости к этим патогенам.

На практике борьба с вирусами и патогенами виноградной лозы ведется разными способами. Один из них – это гибридизация с вовлечением в качестве родительских форм устойчивых автохтонных (староместных) сортов.

В настоящей работе были использованы автохтонные сорта ампелографической коллекции Дагестанской опытной станции – филиала ВИР. На сегодняшний день в посадках Да-

гестанской опытной станции ВИР насчитывается 320 сортов, собранных со всего мира, из них более 80 – это автохтонные (староместные) сорта. В большинстве случаев именно они являются источниками генов хозяйственно-ценных признаков. Так, при работе с коллекцией на фоне многолетней эпифитотии (массового поражения образцов винограда грибными патогенами) был выявлен образец, устойчивый к болезням. Это уникальное растение было использовано в качестве родительской формы для привлечения в скрещивания с поражаемыми сортами.

В результате проведенных скрещиваний всего было получено 8 популяций для исключения случайного переопыления, был проведен микросателлитный анализ с использованием SSR праймеров. Для молекулярных исследований из каждой популяции была сделана выборка из 10 растений. С каждого растения были собраны свежие листья, из которых была выделена ДНК СТАВ-методом [1]. Растения анализировались по 10 микросателлитным локусам: scu10vv, scu11vv, scu15vv [2], udv107 [3], vvip31, vvib01, vviv67 [4], vvmd5, vvmd6 [6], vvs3 [5]. Для получения фрагментов выбранных локусов провели ПЦР. Результат реакций сначала детектировали в агарозном геле, а затем проводили измерение длины фрагментов на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Полученные с помощью анализатора сырые данные обрабатывали с использованием онлайн платформы Thermo Fisher Connect. Для обработки полученной информации о размерах локусов и анализа структуры популяций использовали программное обеспечение Structure 2.3.4, а также RStudio.

На основании результатов анализа микросателлитных локусов можно заключить, что скрещивание 3 и скрещивание 6 не подверглись контаминации и потенциально могут быть использованы для создания генетических карт.

Библиографический список

1. Rahimah A.B., Cheah S.C., Rajinder S. Freeze-drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA // *J. Oil Palm Res.* 2006. V. 18. P. 296–304.
2. Scott K.D., Eggler P., Seaton G., Rossetto M., Ablett E.M., Lee L.S., Henry, R.J. Analysis of SSRs derived from grape ESTs // *Theoretical and applied genetics.* 2000. Vol. 100(5). P. 723–726.
3. Di Gaspero G., Cipriani G., Marrazzo M. T., Andreetta D., Castro M. J. P., Peterlunger E., Testolin, R. Isolation of (AC) n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection // *Molecular Breeding.* 2005. Vol. 15(1). P. 11–20.
4. Merdinoglu D., Butterlin G., Bevilacqua L., Chiquet V., Adam-Blondon A.F., Decroocq S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR // *Molecular Breeding.* 2005. Vol. 15(4). P. 349–366.
5. Thomas M.R., Scott N.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs) // *Theoretical and Applied Genetics,* 1993. Vol. 86(8). P. 985–990.
6. Bowers J.E., Dangl G.S., Vignani R., Meredith C.P. Polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.) // *Genome,* 1996. Vol. 39. P. 628–633.

УДК 634.25: 58.085:632.3

СОЗДАНИЕ НА БЕЗВИРУСНОЙ ОСНОВЕ И АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ФОРМ ПЕРСИКА

И.В. Булавин, Н.П. Лесникова-Седошенко, И.В. Митрофанова

Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад –
Национальный научный центр РАН, Ялта, Россия

В статье представлены данные о введении новых гибридных форм персика в культуру *in vitro* (эмбриокультуру) и результаты анализа полученных растений на наличие вирусов PPV и PNRSV методом ОТ-ПЦР. При культивировании зародышей на модифицированных средах Монье и Мурасиге-Скуга отмечена большая действенность первой. Подтверждена эффективность применения модифицированной питательной среды Гамборга-Эвелега (B₅) для изучения регенерационной способности слаборазвитых проростков персика. После укоренения и одного года культивирования у полученных гибридных форм выявлено отсутствие вирусной инфекции PPV и PNRSV. Подобный результат получен для растений, у которых родительская форма изначально была поражена одним из вирусных агентов.

Ключевые слова: *Prunus* sp., селекция, эмбриокультура, ОТ-ПЦР, PPV, PNRSV.

Плодовые культуры выращивают во всем мире в основном как источник питания. В их плодах содержатся витамины, микроэлементы, сахара, органические кислоты, ферменты и другие биологически активные вещества, которые служат важнейшей, незаменимой составной частью качественного питания, обеспечивающего здоровье и долголетие человека [8]. Одними из самых востребованных древесных растений являются виды рода *Prunus*: миндаль, абрикос, вишня, персик, слива и нектарин [12]. При их культивировании, как и плодовых культур в целом, в качестве ограничивающего фактора роста и развития может выступать поражение вирусной инфекцией [3]. В латентном состоянии вирусы замедляют рост растений, сокращают период онтогенеза культур, являются причиной снижения качества плодов, что может повлечь в дальнейшем значительный экономический ущерб [12]. В агроценозах вирусы распространяются через зараженный посадочный материал, пыльцу, семена, посредством насекомых-переносчиков и нематод, тесного взаимодействия органов растений и инструмента при выполнении агротехнических работ [6, 7, 9]. Вирус шарки слив (plum pox virus, PPV), относящийся к роду *Potyvirus* семейства Potyviridae, являющийся самым распространенным среди косточковых культур, обычно не передается через семена [20, 22, 23]. Вирус некротической кольцевой пятнистости косточковых (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV) рода *Ilarvirus* семейства Bromoviridae, также является одним из вредоносных, при этом величина значений при семенной передаче для разных культур может варьировать от 5 до 19% [21].

В Никитском ботаническом саду коллекции персика представлены отечественными и интродуцированными сортами и формами [17], которые используются в селекции. Для части косточковых плодовых культур, согласно данным научных сотрудников НБС, была установлена высокая степень поражения вирусами, диагностированы PPV и PNRSV [5]. При скрещивании перспективных сортов и создании новых гибридных форм в большинстве случаев происходит формирование семян с неполноценными зародышами, которые не способны развиваться во взрослые растения при традиционных приемах выращивания [2]. Эм-

бриокультура как один из биотехнологических методов получения растений позволяет преодолеть постгамную несовместимость гибридного организма. Вместе с тем в комплексе мероприятий по борьбе с вирусными болезнями важную роль играет ранняя и точная диагностика, позволяющая оценить состояние растения. Поэтому целью данной работы являлось получение новых гибридных форм персика через эмбриокультуру и их анализ на наличие вирусной инфекции.

Для введения 33 гибридных зародышей персика в культуру *in vitro* и регенерации проростков извлеченные из плодов косточки погружали на 1–2 секунды в 96% этиловый спирт и обжигали в пламени спиртовки. Зрелые зародыши извлекали из семян и помещали на безгормональные питательные среды Монье [18] и Мурасиге-Скуга (МС) [19] с 400 мг/л гидролизата казеина, 2,5% сахарозы и 0,9% агара. Незрелые зародыши переносили на питательные среды с 0,1–0,5 мг/л кинетина, 1,0–2,0 мг/л L-глутамина, 3,0 мг/л глицина, 0,2–1,0 мг/л гибберелловой кислоты (ГК₃) и 250–400 мг/л гидролизата казеина. При изучении регенерационной способности персика в случае формирования слабо развитых проростков применяли питательную среду Гамборга-Эвелега (В₅) [13], дополненную 0,5–1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,1–0,25 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК) (рН среды 5,7–5,8). Для элиминации вирусной инфекции в питательные среды при введении и первом субкультивировании зародышей добавляли вироцид рибавирин (Virazole®, 1-β-D-рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) в концентрации 40–60 мг/л. Первоначально культуральные сосуды с зародышами помещали в холодильную камеру FKv-4143 (Liebherr, Германия) с температурой 4°C без освещения. После стратификации через 45–60 суток их переносили в фитокапсулу с температурой 24±1°C, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 37,5 мкМ м⁻² с⁻¹. Полученные из гибридных зародышей растения высаживали на адаптацию *in vivo* в почвенную смесь: почва-песок-перлит (3:1:1).

Для вирусологической оценки состояния полученных гибридных форм персика суммарную РНК выделяли из листьев при помощи реагента ExtractRNA (Евроген, Российская Федерация). Одностадийную ОТ-ПЦР проводили с набором БиоМастер ОТ-ПЦР-Стандарт (2×) (Биолабмикс, Российская Федерация) и праймерами для определения PPV P1: 5-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3 и P2: 5-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3 [1] (Синтол, Российская Федерация). Для двухстадийной ОТ-ПЦР кДНК получали с использованием коммерческого набора ОТ-М-MuLV-RN (Биолабмикс, Российская Федерация) на твердотельном термостате TDB-120 (Biosan, Латвия). Амплификацию выполняли с применением специфических пар праймеров PNRSV-F 5-GGT CCC ACT CAG GGC TCA AC-3 и PNRSV-R 5-CGC AAA AGT GTC GAA ATC TAA ATC-3 [14] (Синтол, Российская Федерация) и набором БиоМастер HS-Тақ ПЦР (2х) (Биолабмикс, Российская Федерация) в термоциклере C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Сингапур). Амплифицированные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле с маркером Step50 plus и Step100 plus (Биолабмикс, Российская Федерация) и 1×TBE буфером при 85 В в течение одного часа с использованием универсального источника питания PowerPac™ (Bio-Rad, Сингапур). Агарозный гель визуализировали с помощью системы геледокументации E-box (Vilber Lourmat, Франция).

Гибридные зародыши персика длиной 1,21 – 1,90 см были введены в условия *in vitro* в августе-сентябре 2019 г. (рис. 1).

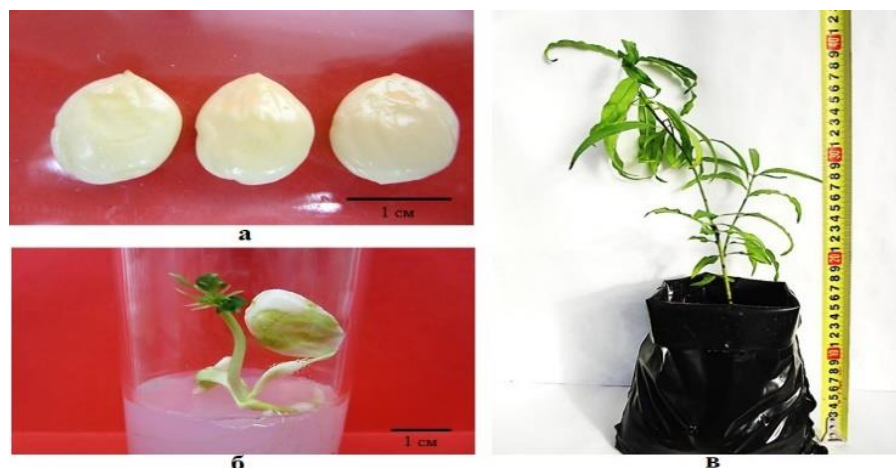


Рис. 1. Введение в эмбриокультуру и адаптация гибридных форм персика:
а – зародыши персика, б – проросток гибридной формы персика в условиях *in vitro*,
в – укорененное растение гибридной формы персика

В ноябре, после предварительной стратификации в условиях низкой положительной температуры (4 °С) и без освещения, на безгормональных питательных средах Монье и МС наблюдали прорастание гибридных зародышей. При этом лучшее развитие было отмечено на питательной среде Монье, в первую очередь для гибридных форм Loadel × Никитский Подарок, Summerglo × Никитский Подарок.

На регенерацию влияет ряд факторов, таких как генотип, состав питательной среды, концентрация регуляторов роста, физические условия культивирования [16]. Для культуры персика *in vitro* ранее была показана эффективность модифицированной питательной среды В₅ [4]. В наших исследованиях введение 0,75–1,0 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК способствовало успешному развитию сегментов слабо развитых проростков с 2–3 междоузлиями. Высоким регенерационным потенциалом обладали микропобеги гибридной формы Summerglo × Никитский Подарок. После второго субкультивирования количество сформировавшихся адвентивных почек увеличивалось и достигало $7,82 \pm 0,15$ штук, микропобегов – $6,43 \pm 0,22$ штук. В целом все испытанные концентрации БАП в сочетании с 0,1 и 0,2 мг/л ИМК активизировали процесс морфогенеза и повышали частоту регенерации по сравнению с контролем. Наибольшие показатели длины побега и количества листьев отмечали также на среде В₅ с 1,0 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК.

В ходе наблюдений установлено, что растения персика после 9 месяцев адаптации *ex vitro* имели от 2 до 6 сформированных скелетных ветвей, высота растений составляла от 36 до 59 см. Распускание листьев отмечено в апреле, полностью облиственное растение наблюдали в мае. Листовые пластинки по форме и цвету соответствовали таковым растений открытого грунта.

В октябре 2020 г. проводили анализ на наличие вирусной инфекции PPV и PNRSV. При визуальном обследовании растений хлорозы и некротические пятна на листьях обнаружены не были. Проведенный анализ с применением ОТ-ПЦР (рис. 2) не выявил наличия вирусных инфекций у полученных 33 селекционных форм персика. При этом гибридные формы под номерами 9-12, 19 (Loadel × Никитский Подарок), а также 26–28 (97-120 × Никитский Подарок) изначально характеризовались присутствием PNRSV и PPV соответственно.

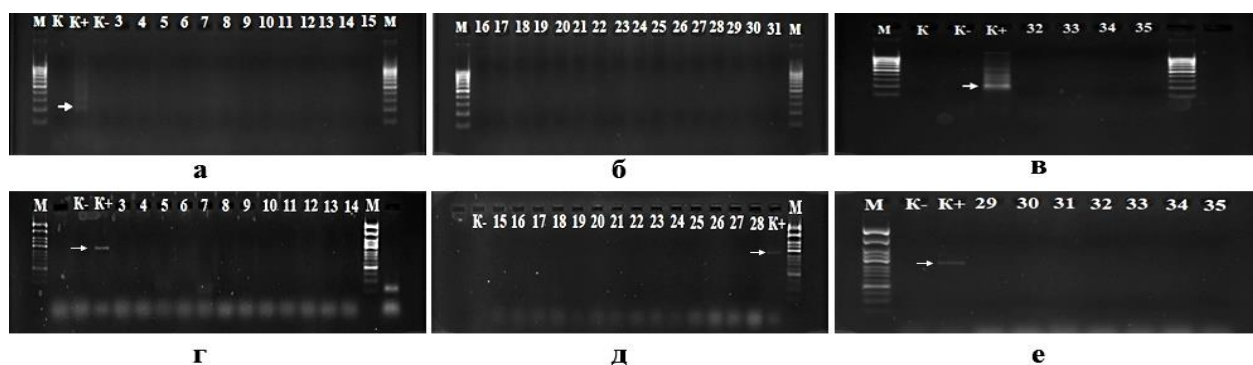


Рис. 2. Фореграмма продуктов ОТ-ПЦР PPV (а, б, в) и PNRSV (г, д, е) разных гибридных форм персика. М – маркер, К⁻ – образец персика, свободный от вирусных инфекций, К⁺ – образец персика с вирусной инфекцией, 3-35 – исследуемые образцы

Результаты, полученные нами относительно PPV, ожидаемы. Считается, что вирус не передается через семена. Его РНК можно обнаружить в семенной кожуре и в незначительном количестве в семядолях. Существует мнение, что в зрелом семени происходит инактивация вируса [15]. В наших исследованиях, в случае применения эмбриокультуры, зародыши освобождали от семенной кожуры, что также снизило риск возникновения вирусной инфекции. В отличие от PPV, PNRSV способен проникать в ткани зародыша [10]. Успешная элиминация вируса может быть достигнута с применением термо- и хемотерапии [4, 7, 11]. В наших исследованиях применение виروцида рибавирина в концентрациях 40–60 мг/л способствовало элиминации PNRSV.

Проведенные нами исследования показали, что для культивирования зрелых зародышей персика *in vitro* наиболее оптимальной является среда Монье, дополненная 400 мг/л гидролизата казеина, 40–60 мг/л рибавирина, 2,5% сахарозы, 0,9% агара. Для изучения регенерационной способности подтверждена эффективность модифицированной питательной среды Гамборга-Эвелега (B5). Включение виروцида в состав питательной среды при введении и первом субкультивировании зародышей способствует элиминации/инактивации PNRSV, что подтверждается при исследованиях методом ОТ-ПЦР.

Исследования выполнены в рамках гранта РФФИ № 19-16-00091 на базе Уникальной научной установки Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений (УНУ “ФИТОБИОГЕН”)

Библиографический список

- ГОСТ 33505-2015 Карантин растений. Методы выявления и идентификации потивруса шарки слив. URL: <http://psystudy.ru/index.php/forauthors/gost2008.html> (дата обращения: 11.08.2021).
- Лесникова-Седошенко Н.П., Митрофанова О.В., Смыков А.В., Горина В.М. Применение биотехнологических методов в получении селекционных форм персика (*Prunus persica* (L.) Batsch.) и абрикоса (*Prunus armeniaca* L.) // Труды Никитского ботанического сада. 2007. Т. 128. С. 33–39.
- Лукичева Л.А., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П. Оздоровление сортов вишни (*Prunus cerasus* L.) и сливы (*Prunus domestica* L.) от вирусов с использованием биотехнологических приемов // Сборник научных трудов ГНБС. 2007. Т. 127. С. 27–34.

4. Мартынов С.А., Митрофанова О.В. Биотехнологические приемы микроразмножения персика (*Prunus persica* (L.) Batsch) в условиях *in vitro* // Бюллетень ГНБС. 2011. Вып. 103. С. 101–105.
5. Мартынов С.А., Митрофанова О.В. Основные вирусные болезни, поражающие культуру персика (*Prunus persica* (L.) Batsch) в Крыму // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. 2010. Т. 8. С. 194–198.
6. Метлицкая К.В., Упадышев М.Т., Петрова А.Д., Упадышева Г.Ю. Распространенность вредоносных вирусов в насаждениях сливы и алычи в Московской области // Плодоводство и ягодоводство России. 2018. Т. 52. С. 152–156.
7. Рягузова Т.В. Диагностика вирусов плодово-ягодных культур и современные методы их оздоровления // Селекция и сорторазведение садовых культур. 2020. Т. 7, N 1–2. С. 130–134.
8. Савельев Н.И., Савельева Н.Н. Селекционное использование генетической коллекции плодовых культур для повышения адаптивного потенциала и качества плодов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2014. Т.175, N 4. С.109–114.
9. Упадышев М.Т., Метлицкая К.В., Петрова А.Д. Распространенность вирусных болезней плодовых и ягодных культур // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2017. N 44(02). С. 1–12.
10. Amari K., Burgos L., Palla V., Sanchez-Pina M.A. Vertical transmission of prunus necrotic ringspot virus: hitch-hiking from gametes to seedling // Journal of General Virology. 2009. Vol. 90. P. 1767–1774. DOI:10.1099/vir.0.009647-0.
11. Cieśliński M. Application of thermo- and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees // Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 2007. Vol. 15. P. 117–124.
12. Diaz-Lara A., Stevens K., Klaassen V., Golino D., Al Rwahnih M. Comprehensive real-time RT-PCR assays for the detection of fifteen viruses infecting *Prunus* spp. // Plants. 2020. Vol. 9(2). P. 273. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9020273>.
13. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Canadian Journal of Biochemistry, 1968. Vol. 46(5). P. 417–421.
14. Huo Y., Li G., Qiu Y., Zhang Y. Rapid detection of prunus necrotic ringspot virus by reverse transcription-cross-priming amplification coupled with nucleic acid test strip cassette // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. P. 161-175. DOI: 10.1038/s41598-017-16536-6.
15. Milusheva S., Gercheva P., Bozhkova V., Kamenova I. Experiments on transmission of plum pox virus through *Prunus* seeds // Journal of Plant Pathology. 2008. Vol. 90(Suppl. 1). P. 23–26.
16. Mitrofanova I., Lesnikova-Sedoshenko N., Mitrofanova O., Smykov A., Chelombit S. Comparative studies of *in vitro* regeneration capacity in some breeding forms of *Prunus persica* (L.) Batsch // BIO Web Conference. 2020. Vol. 24. P. 00055. DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202400055>.
17. Mitrofanova I., Mitrofanova O., Chirkov S., Lesnikova-Sedoshenko N., Chelombit S. Detection and identification of plum pox virus on *Prunus* species in Crimea // Agriculture & Forestry. 2015. Vol. 61(4). P. 197–204. DOI: 10.17707/AgricultForest.61.4.22.
18. Monnier M. Croissance et développement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastoris* cultivés *in vitro* dans un milieu à base d'une nouvelle solution minérale // Bulletin de la Société Botanique de France, 1973. Vol. 120(Suppl. 1). P. 179–193. DOI: <https://doi.org/10.1080/00378941.1973.10839201>.

19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*, 1962. Vol. 15(3). P. 473–497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
20. Pasquini G., Barba M. The question of seed transmissibility of Plum pox virus // *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2006. Vol. 36(2). P. 287–292. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2006.00989.x>.
21. Ramadan N.A., Kassem N.A., Al-Baringy K.M. Prunus necrotic ring spot virus: transmission and movement in tissue of stone fruit trees // *Rafidain Journal of Science*. 2018. Vol. 27(1). P.183–192. DOI: 10.33899/rjs.2018.143928.
22. Simmons H.E., Munkvold G.P. Seed transmission in the Potyviridae // *Global perspectives on the health of seeds and plant propagation material. Plant pathology in the 21st century (Contributions to the 9th International Congress)*, – Vol. 6 / Gullino M., Munkvold G.P. (eds). Dordrecht. 2014. Ch. 1. P. 3–15. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-017-9389-6_1.
23. Sheveleva A., Glasa M., Kudryavtseva A., Ivanov P., Chirkov S. Genetic diversity, host range and transmissibility of CR isolates of Plum pox virus // *Journal of General Plant Pathology*. 2019. Vol. 85(1). P. 39–43. DOI: 10.1007/s10327-018-0824-1.

УДК 581.143.5/6

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ВИНОГРАДА ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР ПО СПОСОБНОСТИ К РЕГЕНЕРАЦИИ

М.В. Ерастенкова, А.Е. Бумагина, Н.Г. Тихонова, Ю.В. Ухатова

*Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических
ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия*

В работе представлены данные по регенерации растений винограда в культуре *in vitro* на среде Мурасиге и Скуга с содержанием фитогормона 6-БАП (6-бензиламинопурина) в концентрации 1 мг/л. Регенерационную способность оценивали по уровню приживаемости растений и морфометрическим показателям. В результате проведенных исследований выделены сорта с высокой регенерационной способностью.

Ключевые слова: виноград, культура *in vitro*, регенерация, генетическое редактирование.

Введение. Виноград – это одна из широко используемых плодовых и ягодных культур. По данным FAO STAT, объём валового производства в мире за 2019 г. составляет 77 млн тонн, в Российской Федерации производится 677 тыс. тонн (<https://www.fao.org/faostat/ru/#data/QCL> 2019). На территории Российской Федерации культура винограда распространена в южных регионах. К основным регионам возделывания винограда относятся: Краснодарский край, Республика Дагестан, Республика Крым, Севастополь, Ставропольский край, Ростовская область и Кабардино-Балканская республика. Для расширения ареала возделывания необходимо повысить устойчивость винограда к низким температурам и преодолеть восприимчивость к патогенам. Традиционная селекция винограда требует больше временных затрат, эту проблему можно решить за счет использования современных генетических технологий, в частности, генетического редактирования с использованием системы

CRISPR/Cas9 [4]. Применение данного метода открывает возможность для улучшения винограда, позволяя привнести заданные свойства в уже существующие сорта [4]. Прогресс генетических манипуляций в селекции плодовых культур напрямую зависит от степени регенерации образцов, поскольку формирование эмбриоидов и регенерантов из редактированных эксплантов растений является одним из ключевых этапов редактирования и успешного получения редактированных растений. Поэтому так важно оценить по способности к регенерации и выбрать сорта с наилучшей регенерационной способностью. Сорта с высокой степенью регенерации могут служить материалом для апробации методов генетической трансформации и генетического редактирования.

Цель работы – оценить сорта винограда по способности к регенерации.

Материалы и методы. В работе была произведена оценка регенерационной способности 10 образцов винограда из коллекции ВИР, сохраняемых в полевых условиях Дагестанской опытной станции – филиала ВИР. После введения в культуру *in vitro* рассчитывали уровень приживаемости эксплантов, а затем образцы оценивали по морфометрическим показателям.

Перед введением в культуру *in vitro* черенки, заготовленные в осенне-зимний период, помещали на светоустановку для проращивания. Эксплантами служили почки в стадии активного роста. Стерилизацию исходного материала проводили хлорсодержащим бытовым отбеливателем ACE (10%) с экспозицией 15 минут.

На основе литературных данных для введения образцов в культуру *in vitro* была выбрана среда Мурасиге и Скуга [3] с содержанием фитогормона 6-БАП в концентрации 1 мг/л. Эта концентрация считается оптимальной для винограда [1, 2].

На первом этапе выращивания микрорастений (14 дней) были проведены наблюдения по уровню приживаемости.

Результаты. Отмечена высокая эффективность стерилизации эксплантов. Оценка приживаемости эксплантов выявила различия между образцами по эффективности введения в культуру *in vitro*. Наибольший процент инфицированности при введении в культуру *in vitro* наблюдали у сортов Шоколадный (20%), ранний ВИРа (16,7%) и Ахтамар (11,1%).

Диапазон приживаемости меристем винограда составил от 75,0% (с. Сеянец Малегра) до 95,0% (с. Рушаки). Самый высокий процент приживаемости меристем наблюдали у сортов Рушаки, Кишмиш мускатный, Ахтамар (95,0, 92,9, 88,9% соответственно). У остальных сортов уровень приживаемости немного меньше, но на достаточно высоком уровне. Также проводили наблюдения за ростом и развитием микрорастений, измеряли длину и начало корнеобразования. Наибольший размер микрорастений на 30 сутки отмечается у сортов – Ранний ВИРа ($4,20 \pm 1,20$ см), Джунга ($3,90 \pm 1,40$ см), Ахтамар ($3,80 \pm 0,80$ см).

Заключение. В настоящее время проведена работа подбора режима стерилизации растительного материала, подобраны оптимальные среды для интенсивного развития растений в культуре *in vitro*. Оценка динамики роста микрорастений указала на сорта винограда с высокими показателями к регенерации. Полученные данные могут являться основой для дальнейшего изучения регенерационной способности растений винограда и в перспективе – для генетического редактирования растений.

Библиографический список

1. Батукаев А.А., Эдиева Х. Биотехнологические методы ускорения размножения винограда // Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ. 2013. Т. 1. С. 271–275.

2. Медведева Н.И., Поливара Н.В., Трошин Л.П. Методические рекомендации по микроклональному размножению винограда *in vitro* // Научный журнал КубГАУ. 2010. № 62.
3. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiologia Plantarum*, 1962. Vol. 15. P. 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
4. Fizikova A., Tikhonova N., Ukhatova Y., Ivanov R., Khlestkina E. Applications of CRISPR/Cas9 System in Vegetatively Propagated Fruit and Berry Crops // *Agronomy*. 2021. Vol. 11(9). P. 1849. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091849>.

УДК 58.085

ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ОБРАЗЦОВ СОИ (*GLYCINE MAX* (L.) MERR.) ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР

Е.С. Коршикова, Ю.А. Мокшенинова, К.М. Ершова, Ю.В. Ухатова

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

Используя систему геномного редактирования CRISPR/Cas, можно получить высокопродуктивные генотипы сои с заданными свойствами. Лимитирующим фактором применения геномного редактирования является уровень регенерации в культуре *in vitro*. На основе анализа особенностей каллусообразования десяти сортов сои показана зависимость регенерационной способности образцов от типов эксплантов и выявлены генотипы, пригодные в качестве моделей для геномного редактирования.

Ключевые слова: соя, геномное редактирование, культура *in vitro*, каллусогенез.

На сегодняшний день в мировом производстве растительного белка и масла соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является ведущей культурой [9].

С применением методов традиционной селекции необходимо выявлять в генофонде наиболее скороспелые сорта со слабой чувствительностью к фотопериоду для выращивания культуры в северных широтах. Такая работа по изучению коллекции образцов сои, имеющих различное эколого-географическое происхождение, с успехом ведется в отделе генетических ресурсов зернобобовых культур ВИР уже много лет [4, 6–9]. Результаты многолетнего изучения позволили выделить источники ФПЧ, скороспелости и т.п. Для получения растений с заданными свойствами используют современные методы геномного редактирования, ведущие к изменению функционирования генов, что приводит к формированию новых генотипов [5].

Используя систему геномного редактирования CRISPR/Cas, можно получить высокопродуктивные генотипы сои для выращивания практически во всех климатических зонах, что будет экономически выгодным и приведет к решению проблемы возделывания данной культуры в более северных широтах по сравнению с существующими зонами возделывания сои.

Основными этапами генной инженерии с помощью системы CRISPR/Cas являются: выбор целевой последовательности и определение способа редактирования; создание направляющей конструкции (вектора) для доставки генетического материала в ядро клетки; собственно, редактирование и последующий анализ участка генома, подвергнутого воз-

действию [3]. Большинство работ методами геномного редактирования, в том числе сои, начинаются в культуре *in vitro*. Именно уровень регенерации является фактором, лимитирующим применение геномного редактирования. Благодаря выбору оптимальных условий позволит повысить уровень регенерации различных генотипов и вовлечь большее число образцов в развивающиеся программы генетического редактирования.

Целью настоящей работы было проведение оценки регенерационной способности образцов сои в культуре *in vitro*. **В качестве материала** исследований использовали 5 скороспелых (Fiskeby V; Светлая; KG-20; Aldana; Касатка) и 5 среднеспелых (К-7248; К-9308; К-7102; К-9605; К-10546) сортов сои.

Для работ в культуре *in vitro* из коллекции ВИР были взяты семена образцов свежей репродукции 2020 года.

1 ЭТАП. Семена подвергали тщательной поверхностной стерилизации. В качестве стерилизующего агента использовали 20%-ный раствор отбеливателя АСЕ (15 минут), затем промывали автоклавированной дистиллированной водой (3 раза по 10 минут) и дополнительно стерилизовали перекисью водорода 3% (15 минут) [2]. После второго стерилизующего агента семена дважды промывали автоклавированной дистиллированной водой (по 10 минут) и высаживали на питательную среду Мурасиге-Скуге [10], с добавлением 2 мг/л БАП; 20 г/л сахарозы; 6 г/л агара. Все образцы были успешно введены в культуру *in vitro* в трех биологических повторностях. 2 ЭТАП. После введения семян в культуру *in vitro* были взяты экспланты растений возрастом 1,5–2 недели для определения регенерационной способности. Для получения каллусной культуры использовали следующие виды эксплантов: эпикотили, гипокотили, семядольные узлы, половинки нижних и верхних семядолей.

Каждый образец по 5–10 эксплантов был высажен в индивидуальные пробирки на питательную среду для регенерации следующего состава: МС + 2 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИУК + 20 г/л сахарозы [1].

В результате исследований отметили, что гипокотили показали наилучший результат по образованию каллуса (61,7%), хуже всего образуется каллус на половинках нижних семядолей (12,5%). Два скороспелых сорта сои (KG-20 и Светлая) из 5 показали самый высокий процент образования каллуса у трех типов экспланта – гипокотили, эпикотили и семядольные узлы.

Таким образом, тип экспланта достоверно влияет на регенерационную способность образцов сои. Наиболее высокая способность к каллусообразованию отмечена у гипокотилей, в ряде случаев – у эпикотилей и семядольных узлов. Выбраны генотипы в качестве моделей для геномного редактирования KG-20 и Светлая, отбор сортов из группы среднеспелых сортов продолжается.

В настоящее время фиксируются изменения, происходящие с эксплантами, отмечается формирование каллуса.

Библиографический список

1. Ефремова О.С., Шкрыль Ю.Н., Веремейчик Г.Н. Регенерационный потенциал *in vitro* сортов сои (*Glycine max* (L.) Merr.) при агробактериальной трансформации // Аграрный вестник Приморья. 2017. С. 21–24.
2. Жумагулова Ж.Б. Совершенствование биотехнологических методов сохранения генофонда груши: дис. ... д-ра философ. Алматы, 2014.
3. Короткова А.М., Герасимова С.В., Шумный В.К., Хлесткина Е.К. Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. №. 21(2). С. 250–2583.
4. Корсаков Н.И. Соя (систематика и основы селекции). Л., 1973.

5. Салина Е.А. Технологии геномного моделирования и редактирования для решения задач селекции растений // Достижения науки и техники АПК. 2016. №30(9). С. 9–14.
6. Сеферова И.В., Некрасов А.Ю., Силаева О.И., Кияшко Н.И., Тетер З.Ю., Кива Т.И., Никишкина М.А. Каталог мировой коллекции ВИР соя / под ред. М.А. Вишняковой. СПб., 2008.
7. Сеферова И.В., Герасимова Т.В. Оценка скороспелых образцов сои коллекции ВИР в условиях Северо-запада Российской Федерации // Деп. в ВИНТИ. 2010. №. (168-В). С. 3–10.
8. Сеферова И.В. Соя в условиях северо-запада Российской Федерации // Масличные культуры. 2016. №3 (167). С. 101–102.
9. Сеферова И.В., Вишнякова М.А. Генофонд сои из коллекции ВИР для продвижения агрономического ареала культуры к северу // Зернобобовые и крупяные культуры : научно-производственный журнал. 2018. № 3(27). С. 41-47. DOI: 10.24411/2309-348X-2018-11030.
10. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // Physiologia Plantarum. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

УДК 575.22

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ТИМЬЯНА КРЫМСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИЛОКУСНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Е.В. Пузанова^{1,2}

¹*Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, Симферополь, Россия*

²*Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, Россия*

Появление современных методов изучения генома обусловило необходимость в генетической паспортизации сортов. Генотипирование сортов растений – это первый шаг на пути к паспортизации. В основе таких методов лежит поиск уникальных участков генома с помощью различных молекулярных маркеров. Наиболее часто используются в генотипировании растений ISSR- и RAPD-маркеры. В работе представлены результаты исследования генетического разнообразия 28 образцов тимьяна из крымской коллекции с помощью 3 ISSR- и 4 RAPD-маркеров. Межмикросателлитные молекулярные маркеры оказались более информативными, нежели случайно амплифицируемые фрагменты полиморфной ДНК. На основании генетических данных обособлен большой кластер *Thymus vulgaris* L., от которого отделились несколько других исследуемых образцов. Полученные данные будут использованы в дальнейшей паспортизации сортов крымской коллекции тимьяна.

Ключевые слова: генотипирование, молекулярные маркеры, ISSR, RAPD, мультилокусные маркеры, тимьян, эфиромасличные культуры, генетическое разнообразие, полиморфизм.

Введение. Внедрение постгеномных подходов в мировой науке стимулирует и процесс развития сельского хозяйства в данном направлении. Генотипирование является важной задачей в современной селекции, так как позволяет быстрее проводить отбор, основываясь не только на морфологических и биохимических показателях, но и на генетических маркерах [12, 14]. Особенно актуально генотипирование вегетативно размножающихся культур, обладающих определенной стабильностью. Несмотря на то, что генотипирование не является новым методом и давно широко используется селекционерами [11], оно не теряет своей акту-

альности, ведь большинство сортов сельскохозяйственных культур до сих пор не имеют генетических паспортов [2].

Целью работы является исследование генетического разнообразия тимьяна крымской коллекции с помощью ISSR- и RAPD-маркеров.

Тимьян – ценная пряно-ароматическая культура, активно возделываемая в Средиземноморье и других южных регионах. Растительное сырье тимьяна используется в медицине, пищевой промышленности, парфюмерии и декоративном садоводстве, а получаемые из него компоненты находят применение в химической промышленности.

Поскольку возрождение эфиромасличной отрасли в Крыму является приоритетной задачей сельского хозяйства [10], то и защита сорта с помощью генетического паспорта поможет закрепить позиции Крыма на растениеводческом рынке РФ.

Материалы и методы. Отбор образцов осуществляли на базе двух научных учреждений Крыма, в которых выращивается большое количество образцов тимьяна. Образцы № 1–11 были отобраны в отделе эфиромасличных и лекарственных растений НИИСХ Крыма (с. Крымская Роза), №12–28 в НБС-ННЦ (Ялта, п. Никита). Включение контрастных форм было необходимо для достоверного анализа генетического разнообразия.

Далее приведен полный перечень исследуемых образцов:

1. <i>Thymus vulgaris</i> L. №110-17	15. <i>Thymus striatus</i> Vahl. сорт Юбилейный
2. <i>Thymus vulgaris</i> L. №7-19-1	16. <i>Thymus mastichina</i> L. сорт Светлячок
3. <i>Thymus vulgaris</i> L. № 6-19-4	17. <i>Thymus kotschyanus</i> Boiss et Hoken.
4. <i>Thymus vulgaris</i> L. №8-1-3	18. <i>Thymus roegneri</i> K. Koch. aggr.
5. <i>Thymus vulgaris</i> L. №6-19-1	19. <i>Thymus vulgaris</i> L. сорт Ялос
6. <i>Thymus vulgaris</i> L. №8-1-4	20. <i>Thymus vulgaris</i> L. сорт Фантазия
7. <i>Thymus vulgaris</i> L. №7-19-4	21. <i>Thymus vulgaris</i> L. №14232
8. <i>Thymus vulgaris</i> L. №7-19-3	22. <i>Thymus vulgaris</i> L. 7/2
9. <i>Thymus vulgaris</i> L. сорт Горный бальзам	23. <i>Thymus vulgaris</i> L. 7/4
10. <i>Thymus vulgaris</i> L. сорт Крымрозовец	24. <i>Thymus vulgaris</i> L. 8/1
11. <i>Thymus vulgaris</i> L. сортообразец Нижнегорский	25. <i>Thymus vulgaris</i> L. 24/5
12. <i>Thymus nitens</i> Lamott.	26. <i>Thymus</i> sp. 4/6/1
13. <i>Thymus pulegioides</i> L.	27. <i>Thymus</i> sp. 6/2/2
14. <i>Thymus striatus</i> Vahl.	28. <i>Thymus serpyllum</i> L.

Для подбора наиболее подходящего для эфиромасличных растений метода выделения ДНК тестировали три варианта СТАВ-метода [1, 3, 5].

Праймеры (табл. 1) заимствованы из статей по генотипированию тимьяна [6, 7, 9].

Таблица 1

Сведения о праймерных последовательностях

Название праймера	Последовательность	Температура отжига, °C
UBC-834	(AG)8TT	56
UBC-826	(AC)8C	56
UBC-825	(AC)8T	50
OPN-10	ACAACCTGGGG	34
OPN-11	TCGCCGCAAA	34
OPO-16	TCGGCGGTTC	34
OPE-12	TTATCGCCCC	34

Температуру праймеров с последовательностью до 14 нуклеотидов определяли по формуле [4] (1):

$$Tm = (wA + xT) * 2 + (yG + zC) * 4, \quad (1)$$

где w, x, y, z – количество оснований А, Т, G, С в последовательности соответственно.

Для последовательностей длиной более 13 нуклеотидов использовали уравнение [8] (2):

$$Tm = 64,9 + 41 * (yG + zC - 16,4) / (wA + xT + yG + zC), \quad (2)$$

где w, x, y, z – количество оснований А, Т, G, С в последовательности соответственно.

Режим амплификации соответствует рекомендуемым производителями ПЦР-смесей. Амплификацию проводили при следующих условиях: предварительная денатурация 3 мин. при 94°C; далее 35 (45 для RAPD-маркеров) циклов: 30 с. 94°C, 30 с. Tm, 1 мин. 72°C; 10 мин. 72°C финальной элонгации. Для визуализации результатов продукты ПЦР переносили в 3 % агарозный гель и подвергали электрофорезу в 0,5× TAE-буфере с напряжением 5 В/см. Оценку длин амплифицированных фрагментов проводили с использованием маркера длин ДНК 100+ bpDNALadder (Evrogen, Россия), анализируя фингерпринты в программе TotalLab.

Оценку маркерных параметров генетической изменчивости проводили, используя стандартные формулы [13].

Результаты и их обсуждение. Из трех методик выделения ДНК была выбрана модификация СТАВ-метода (табл. 2), особенностью которой являлось центрифугирование при 4°C на всех этапах работы [5].

Таблица 2

Результаты выделения ДНК из листьев тимьяна с помощью трех вариантов СТАВ-метода

Метод выделения ДНК	260/280	260/230	Концентрация, нг/мкл*
Doyle J. J. & Doyle J. L., 1987	1,53±0,1	1,31±0,21	2,3±0,92
Huang Q.-X. et al., 2013	1,86±0,01	1,85±0,03	32±1,53
Keb-Llanes et al., 2002	1,93±0,03	1,85±0,03	55,3±2,73

* при разбавлении осадка в 0,5 мл mQ.

Для оптимизации состава ПЦР-смеси от QiaGen была проведена ПЦР без добавления MgCl₂ и с добавлением 50 мМ MgCl₂. Было установлено, что добавление MgCl₂ является излишним, а стандартный буфер, содержание соли в котором составляет 15 мМ, дает большее количество четких специфических полос.

ПЦР с RAPD праймерами не показала положительного для всех образцов результата, поэтому из дальнейшего анализа эти праймеры были исключены. Так, OPN-10 дал от 1 до 2 полос только на пяти образцах №19, 22, 23, 25, 26 из группы *T. vulgaris* НБС-ННЦ. OPN-11 также сработал на пяти образцах из той же группы №21, 23, 25, 26, 27, амплифицировав от 1 до 5 полос на дорожку, что дает основания полагать об их гибридной природе и необходимости более тщательной видовой идентификации. OPO-16 и OPE-12 оказались неэффективными, не выявив ни одного фрагмента на матрице ДНК тимьяна.

Всего с помощью трех ISSR-маркеров было детектировано 79 полос, 77 из которых полиморфны (табл. 3).

Таблица 3

Анализ фингерпринта

Маркер	Всего полос	Число полиморфных полос	Среднее кол-во полос
UBC-834	40	40	8,76
UBC-826	18	17	7,18
UBC-825	21	20	6,68

Маркерные параметры имеют высокие показатели, что свидетельствует об информативности молекулярных маркеров (табл. 4).

Таблица 4

Маркерные параметры генетической изменчивости

Маркер	PPB, %	PIC	EMR	MI	RP
UBC-834	100	0,39	40	15,43	14,72
UBC-826	94,4	0,37	16,05	5,95	12,71
UBC-825	95,2	0,37	19,05	7,02	13,36

Условные обозначения: PPB – процент полиморфных полос, PIC – мера информационного полиморфизма, EMR – эффективное мультиплексное отношение, MI – маркерный индекс, RP – разрешающая способность.

Полученная на основе матрицы данных визуализация (рис. 1) генетического разнообразия с помощью метода главных компонент указывает на формирование большой группы *T. vulgaris*, к которой близки *T. striatus*, *T. nitens* и *T. kotschyanus*. Наиболее отдалены от этого кластера *T. serpyllum* и *T. mastichina*, стоящие совсем близко друг к другу, а также *T. roegneri* и *T. pulegioides*.

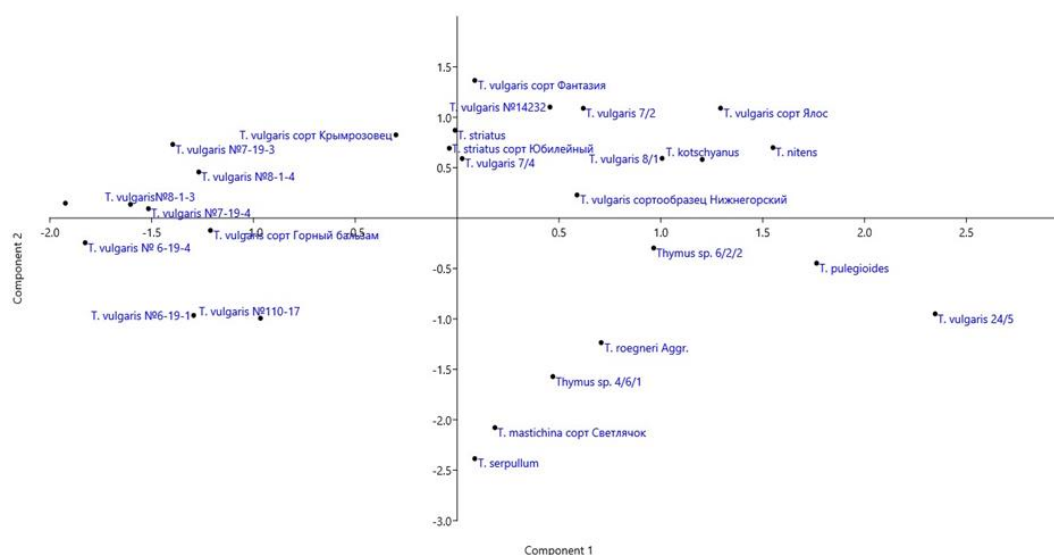


Рис. 1. Визуализация данных о генетическом разнообразии с помощью метода главных компонент

Заключение. Проведенный анализ позволил выявить обширную группу схожих образцов коллекции, а также определить уникальные локусы для подлежащих паспортизации в НИИСХ Крыма и НБС-ННЦ сортов.

*Работа выполнена в рамках Государственного задания № 30562-2019-0001
«Исследование генетического потенциала и молекулярных механизмов функционирования
биологических процессов хозяйственно ценных микроорганизмов,
сельскохозяйственных растений и животных»*

*Выражаю особую благодарность С.Ф. Абдурашитову и В.А. Уппе за консультирование
в области молекулярно-генетических методов, а также кураторам
задействованных в исследовании коллекций*

Библиографический список

1. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue // *Phytochemical Bulletin*, 1987. Vol. 19. P. 11–15.
2. ФГБУ Госсорткомиссия. URL: <https://gossortrf.ru/> (дата обращения: 14.09.2021).
3. Huang Q.-X., Wang X.-C., Kong H., Guo Y.-L. and Guo A.-P. An efficient DNA isolation method for tropical plants // *African Journal of Biotechnology*. 2013. Vol. 12. No. 19. P. 2727–2732.
4. Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature // *J. Mol. Biol.*, 1962. Vol. 5. P. 109–118.
5. Protocol modified from Keb-Llanes et al. // *Plant Molecular Biology Reporter*. 2002. Vol. 20. P. 299a–299e.
6. Rahimmalek M., Bahreininejad B., Khorrami M., Tabatabaei B. E. Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers // *Biochem Genet*. 2009. Vol. 47. No. 11–12. P. 31–42.
7. Trindade H., Costa M., Lima A., Pedro L., Figueiredo A., Barroso, Jose. A combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for the characterization of *Thymus caespitius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal) // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2009. V. 37. P. 670–677. DOI: 10.1016/j.bse.2009.10.006.
8. Wallace R. B., Shaffer J., Murphy R. F., Bonner J., Hirose T., Itakura K. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to $\Phi \times 174$ DNA: the effect of single base pair mismatch // *Nucleic acids research*, 1979. Vol. 6. No.11. P. 3543–3558.
9. Yousefi V., Najaphy A., Zebarjadi A., Hooshmand S. Molecular characterization of *Thymus* species using ISSR markers // *Journal of Animal and Plant Sciences*. 2015. V. 25(4). P. 1087–1094.
10. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В., Назаренко Л.Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. 2-е изд., доп. Симферополь, 2018. 320 с.
11. Сухарева А. С. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // *Биомика*. 2018. Т. 10. №1. С. 69–84.
12. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2015. Т. 17. №. 4/2. С. 1044–1054.
13. Чесноков Ю.В., Артемьева А.М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия // *Сельскохозяйственная биология*. 2015. № 5. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-mery-informatsionnogo-polimorfizma-geneticheskogo-raznoobraziya> (дата обращения: 16.09.2021).
14. Чесноков Ю.В. ДНК-фингерпринтинг и анализ генетического разнообразия у растений // *Сельскохозяйственная биология*. 2005. Т. 40. №. 1. С. 20–40.

БИОРЕФАЙНИНГ И БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

УДК 661.728.855

МОДИФИКАЦИЯ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ЛИМОННОЙ КИСЛОТОЙ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

Н.А. Бикмаева, Е.А. Николаева, А.В. Протопопов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

В статье рассмотрены закономерности взаимодействия древесины с лимонной кислотой в среде толуола. В ходе работы получены сложные эфиры целлюлозы с лимонной кислотой со степенью замещения близкой к 1,3. Образование сложных эфиров подтверждено методом ИК-спектроскопии. С применением метода ИК-спектроскопии изучены продукты взаимодействия полиэтиленгликоля со сложными эфирами целлюлозы с лимонной кислотой. Показано, что при использовании в качестве катализаторов хлоридов поливалентных металлов возможно получение сополимеров целлюлозы и полиэтиленгликоля на основе их сложных эфиров.

Ключевые слова: ацилирование, древесина, цитраты целлюлозы, сложные эфиры целлюлозы.

Полимерные материалы на основе ископаемого топлива, характерные для большинства термореактивных и термопластичных материалов, стали важной частью современного общества. Из-за этих проблем существует острая необходимость в разработке товарных полимеров из биоразлагаемых возобновляемых ресурсов. Существует множество классов полимеров, изготовленных из природных ресурсов. Как правило, они включают полимеры на основе растительного масла, поли(молочная кислота), поли(гидроксибутират), поли(бутилсукцинат), поли(3-гидроксибутират-со-гидроксивалерат), поли(гидроксиалканоатов), целлюлозы, крахмала, хитина и лигнина. Древесина является возобновляемым и экологически чистым материалом, а более широкое использование материалов из возобновляемых источников желательно для устойчивого развития. В некоторых применениях для замены, например, пластмасс или других материалов, необходимы более однородные или поддающиеся формованию изделия из дерева, такие как ДСП, МДФ, HDF или OBS. Однако изделия из древесных композитов, такие как древесно-стружечные плиты и древесноволокнистые плиты, содержат 10–15% клея, в основном на основе формальдегида / мочевины или изоцианатов. Химическая модификация древесины, в частности ацилирование оксикислотами, позволит создать термопластичные продукты [1].

В ходе нашей работы было проведено взаимодействие древесины осины с лимонной кислотой в среде толуола при продолжительности 0,5–5 часов с варьированием температуры от 20 до 60 °С. Полученные продукты, отмытые от непрореагировавшей кислоты, анализировали на содержание связанной лимонной кислоты (рис. 1).

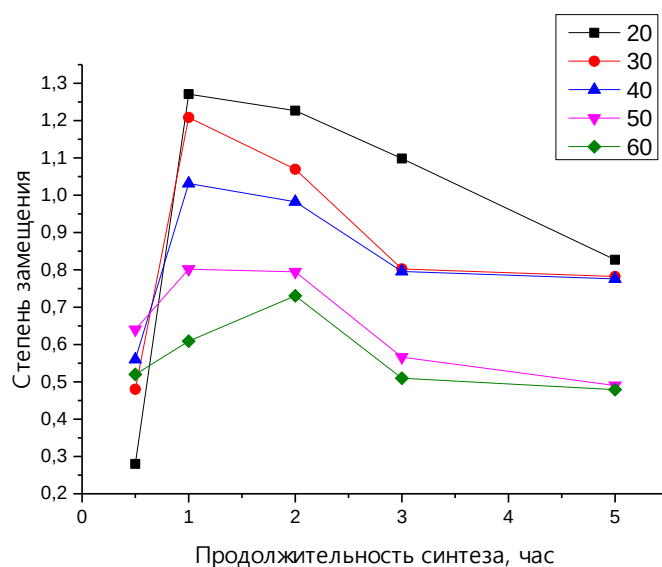


Рис. 1. Степень замещения в полученном продукте при различных температурах

Полученные данные показывают, что реакция лучше при низких температурах. Повышение температуры может приводить к деструкции полимеров древесины и побочным реакциям конденсации лимонной кислоты.

Исследование полученных продуктов методом ИК-спектроскопии (рис. 2) показало образование сложноэфирных связей, при этом в продукте взаимодействия наблюдается увеличение полосы поглощения в области 1740 см^{-1} , характерной для колебаний сложноэфирной группы, что также свидетельствует о протекающем взаимодействии.

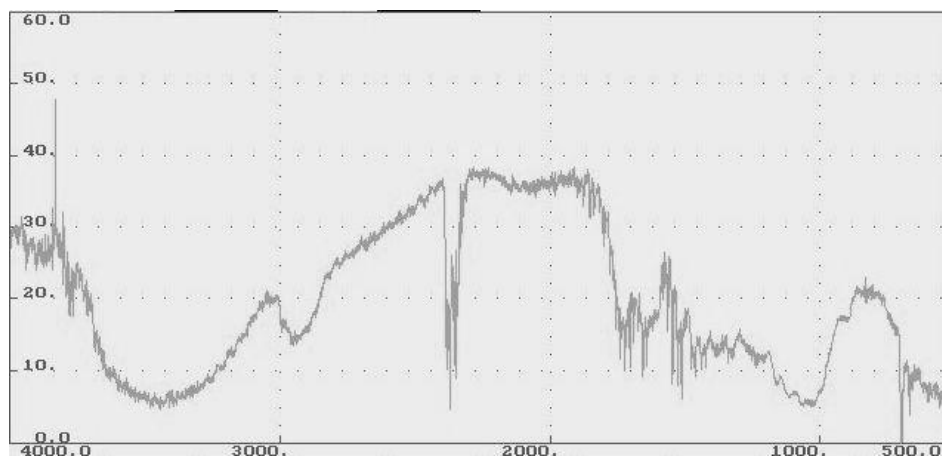


Рис. 2. ИК-спектр продукта, полученного при температуре 30°C и продолжительности один час

Полученные данные позволяют сделать заключение о возможности ацилирования древесины многоосновными кислотами в неполярных средах.

В дальнейшем нами проведена химическая модификация полученных цитратов древесины полиэтиленгликолем при высоких температурах с использованием в качестве катализаторов хлоридов цинка и олова.

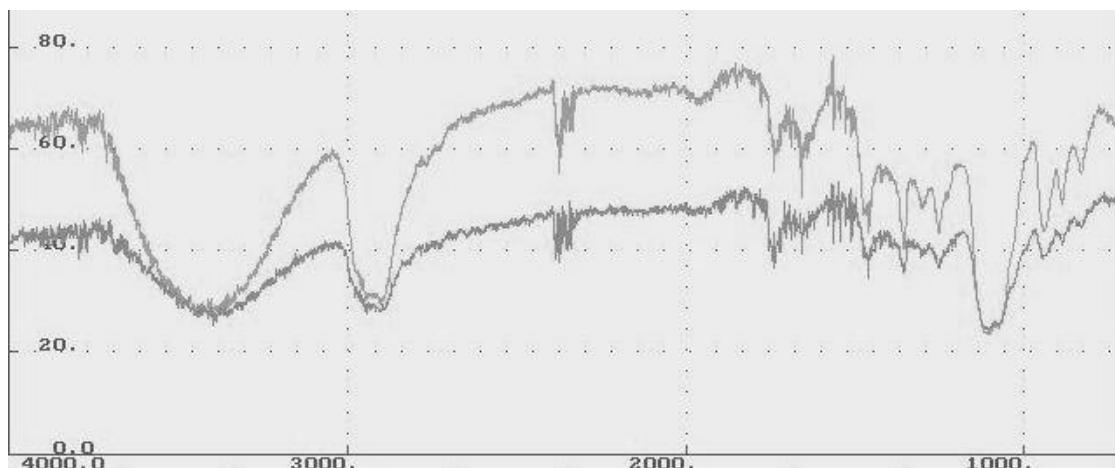


Рис. 3. ИК-спектр продукта модификации цитрата древесины при 120 °С

При взаимодействии полученных сложных эфиров древесины с полиэтиленгликолем при 120 °С наблюдается закономерное увеличение полос поглощения, характерной для алифатической цепи. Однако практически не происходит изменений в колебаниях сложноэфирной связи.

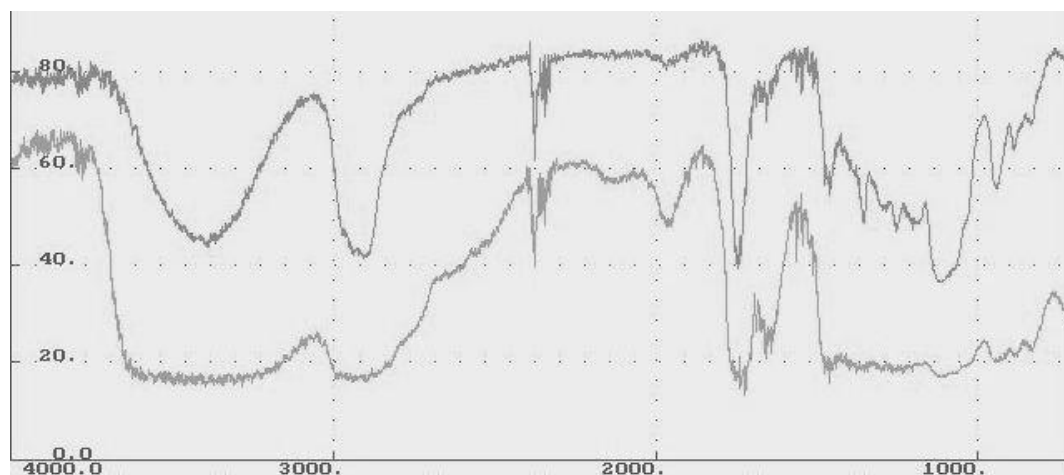


Рис. 4. ИК-спектр продукта модификации цитрата древесины при 150 °С

Увеличение температуры взаимодействия до 150 °С приводит к увеличению полосы поглощения, характерной для сложноэфирной связи. Таким образом, при использовании в качестве катализаторов хлоридов поливалентных металлов возможно получение сополимеров целлюлозы и полиэтиленгликоля на основе их сложных эфиров. Как свидетельствуют полученные ИК-спектры, использование хлорида цинка предпочтительнее в качестве катализатора, в этом случае не происходит побочных реакций, как в случае использования хлорида олова.

Библиографический список

1. Ghorbani M., Konnerth J., Budjav E., et al. Ammoxidized Fenton-Activated Pine Kraft Lignin Accelerates Synthesis and Curing of Resole Resins // *Polymers*. 2017. Vol. 9(2). P. 43. <https://doi.org/10.3390/polym9020043>.

УДК 57.083.134

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ЭКСТРУДИРОВАННЫХ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

*И.В. Владимцева^{1,2}, А.В. Сухоплещенко¹, А.А. Тихонова¹,
А.А. Мосолов³, Л.А. Минченко²*

¹Волгоградский государственный технический университет, Волгоград, Россия

²Волгоградский государственный аграрный университет, Волгоград, Россия

³Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки
мясомолочной продукции, Волгоград, Россия

В работе экспериментально установлено, что использование в качестве компонента искусственной питательной среды водорастворимых экстрактов экструдированного растительного сырья (злаковых культур) повышает урожайность микроорганизмов. Показано увеличение концентрации биомассы бактерий *Escherihia coli* и *Bacillus subtilis* при их выращивании на среде, содержащей водорастворимые экстракты экструдированных культур пшеницы, ячменя и зерносмеси этих злаков. Наибольший прирост биомассы бактерий происходит при проведении экстракции в течение 24 ч при температуре +5 °С на среде, содержащей водорастворимую фракцию экструдированного ячменя. При этом урожайность микроорганизмов *Escherihia coli* увеличивается в 2,26 раза, а *Bacillus. subtilis* – в 3,1 раза по сравнению с контрольным образцом. Предложена операционная технологическая схема приготовления питательной среды для культивирования микроорганизмов на основе экстрактов из экструдированного растительного сырья.

Ключевые слова: искусственные питательные среды, экструзия растительного сырья, технология приготовления питательных сред.

Введение. Приготовление искусственной питательной среды является необходимым этапом при проведении любых микробиологических исследований, они широко применяются в биотехнологической отрасли, использующей микроорганизмы в качестве продуцента. Искусственные питательные среды должны содержать все элементы, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов в легко усваиваемой клеткой форме [2, 3, 5, 8]. Питательные потребности микроорганизмов чрезвычайно многообразны, это нужно учитывать при конструировании питательных сред для выращивания конкретного вида микробов [2, 3]. Питательные среды не могут быть универсальными, даже при культивировании одного вида микроорганизмов зачастую используют различные среды [1, 8].

Для увеличения производительности и рентабельности биотехнологических предприятий необходимо конструировать новые среды и улучшать технологию их приготовления, поскольку оптимальная среда приводит к максимальной скорости роста и метаболизма штамма-продуцента и, соответственно, к высокому выходу целевого продукта. Поэтому конструирование новых питательных сред, обеспечивающих максимальный уровень получения биомассы или продуктов микробного синтеза, является актуальной задачей биотехнологии.

При приготовлении питательных сред используют вещества различной природы как животного или растительного происхождения, так и синтезированные химическим путем. Данные вещества, являющиеся сырьем, не должны содержать токсичных примесей и должны быть легко доступными для микроорганизмов и недорогими [4, 5].

Сырье растительного происхождения широко используется в биотехнологии и микробиологической промышленности, поскольку является возобновляемым ресурсом [2,3]. Основу подобных питательных сред составляют различные части растений, злаковые культуры, овощи, а также многочисленные отходы сельского хозяйства [2, 5, 7]. В состав растительного сырья входят сложные по строению биополимерные молекулы, которые микроорганизм не может использовать напрямую в качестве источника питания или энергии. В связи с этим при приготовлении искусственных питательных сред растительные основы подвергают предварительной предобработке, например, химическому или ферментативному гидролизу [5].

Для увеличения доступности и облегчению усвоения микроорганизмами растительного сырья, в частности злаковых культур, в нашей работе предложена их экструзионная обработка, заключающаяся в комплексном воздействии на сырье с помощью механической и температурной обработки во влажной среде. Растительное сырье нагревается благодаря внешнему нагреву, а также за счет температуры, выделяемой в процессе преодоления внутреннего трения и деформации материала. Кроме того, процесс экструдирования проводится при повышенном давлении [6]. В процессе экструзии происходит изменение структуры и химического состава питательных веществ растительного сырья. Белки расщепляются до пептонов, пептидов и аминокислот, крахмал – до декстринов и моносахаров. При экструзионной обработке погибает патогенная микрофлора, происходит нейтрализация токсических метаболитов, что приводит к биологической безопасности экстрадата. Результатом экструзии растительного сырья является препарат, легко утилизируемый микробными культурами.

Целью данной работы явилось конструирование искусственной питательной среды на основе экструзионной обработки растительного сырья.

Материалы и методы исследования. В качестве растительной основы искусственной питательной среды были выбраны злаковые культуры – пшеница, ячмень и зерносмесь из этих культур. Растительное сырье обрабатывали на экструдере ЭК-40 (производства ООО Волгоградский центр промышленного оборудования «Фавор»). Из полученного препарата экстрагировали водорастворимую фракцию. В качестве экстрагента использовали синтетическую среду, содержащую минеральные источники питания для микроорганизмов (в %): хлорид натрия – 0,5; нитрат аммония – 0,3; хлорид калия – 0,1; хлорид кальция – 0,01; сульфат магния – 0,05; сульфат натрия – 0,01; сульфат марганца – 0,01. Экстракцию проводили при температуре +5 °С. В процессе экспериментов подбирали время экстракции биополимеров из экструдированных препаратов, осуществляя экстракцию в течение 24 и 72 часов. Далее экстракты фильтровали через бумажные фильтры во флаконы и стерилизовали в автоклаве в течение 15 мин при 1 атм. Контрольными образцами служили экстракты соответствующих злаковых культур, не подвергнутые экструзии.

В экспериментах использовали грамотрицательные микроорганизмы – бактерии кишечной палочки *Escherichia coli* (*E. coli*) и грамположительные – сенную палочку *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*).

Методика экспериментальной работы заключалась в следующем. В стерильные пробирки помещали по 3 мл экстракта злаковых культур, обработанных методом экструзии, и засеивали их бактериальными взвешями культур *E. coli* и *B. subtilis* в концентрации 1 млрд микробных клеток в 1 мл. Посевы инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. В полученных взвешах определяли концентрацию биомассы фотокolorиметрическим методом на приборе КФК-2-УХЛ-4.2 при длине волны 750 нм в кюветах с длиной оптического пути 5,065 мм.

Поскольку уровень экстинкции образцов бактериальных суспензий прямо пропорционален концентрации клеток, последнюю выражали в условных единицах (усл. ед.) оптической плотности – D. Эксперимент проводили в трех повторностях, определяя среднее значение оптической плотности каждого образца.

Результаты экспериментальных исследований. Результаты проведенной экспериментальной работы приведены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика биомассы, полученной при выращивании микроорганизмов на средах с экстрадированными злаковыми культурами

Злаковая культура	Бактериальная культура	Время экстракции, час	Оптическая плотность, D, усл. ед.	
			опыт	контроль
Пшеница	<i>E. coli</i>	24	0,060	0,055
		72	0,170	0,150
	<i>B. subtilis</i>	24	0,067	0,045
		72	0,180	0,110
Ячмень	<i>E. coli</i>	24	0,140	0,062
		72	0,350	0,230
	<i>B. subtilis</i>	24	0,140	0,045
		72	0,550	0,185
Зерносмесь	<i>E. coli</i>	24	0,075	0,057
		72	0,360	0,210
	<i>B. subtilis</i>	24	0,074	0,027
		72	0,415	0,250

Данные, приведенные в таблице, свидетельствуют, что экструзионная обработка всех злаковых культур увеличивает оптическую плотность бактериальных взвесей и, соответственно, урожайность обоих микробных штаммов. Наибольший прирост биомассы микроорганизмов наблюдали при культивировании на экстрактах из экструдированного ячменя. У кишечной палочки урожай увеличился в 2,26 раза, а у бацилл – в 3,10 раза по сравнению с контрольными образцами (при проведении 24-часовой экстракции).

Более длительное время экстрагирования водорастворимых веществ из экструдированного растительного сырья приводит к более высокой концентрации биомолекул в среде, однако не во всех экспериментах данное увеличение сопровождалось повышением урожайности микробных культур. Возможно, это связано с токсическим влиянием высоких концентраций некоторых растительных метаболитов.

На основании полученных в экспериментальной работе результатов нами была предложена операционная технологическая схема приготовления питательной среды на основе экструдированного растительного сырья (рис. 1).



Рис. 1. Операционная технологическая схема приготовления питательной среды на основе экструдированного растительного сырья

Предлагаемая технологическая схема включает следующие операции: экструзионная обработка растительного целлюлозосодержащего сырья (зерновых культур, отходов сельскохозяйственного производства и т.п.); экстракция водорастворимых компонентов из экструдата, например, в роторно-дисковом экстракторе; отделение осадка путем фильтрования, например, на мембранных фильтрах; смешивание экстракта с минеральными компонентами, необходимыми для роста конкретной бактериальной культуры; термическая стерилизация питательной среды, например, в автоклаве; охлаждение. Далее стерильная искусственная питательная среда поступает в ферментер для культивирования микроорганизмов.

Заключение. На основании проведенной работы можно сделать следующие выводы:

1. Использование в составе питательной среды водорастворимых экстрактов из экструдированного растительного сырья (злаковых культур) повышает урожайность микроорганизмов.
2. Наибольший прирост биомассы бактерий происходит при проведении экстракции в течение 24 ч при температуре +5 °C на среде, содержащей водорастворимую фракцию экструдированного ячменя. Урожайность микроорганизмов *Escherihia coli* увеличивается в 2,26 раза, *Bacillus subtilis* – в 3,1 раз по сравнению с контрольными образцами.
3. Предложена операционная технологическая схема приготовления питательной среды для культивирования микроорганизмов на основе экстрактов из экструдированного растительного сырья.

Библиографический список

1. Баснакьян И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. М., 1992. 192 с.
2. Безбородов А.М. Биотехнология продуктов микробного синтеза. М., 1991. 238 с.
3. Биотехнология микробного синтеза / под ред. М. Е. Бекера. Рига, 1980. 350 с.

4. Быков В.А., Винаров В.А., Шерстобитов В.В. Расчет процессов микробиологических производств. Киев, 1985. 244 с.
5. Лиепиньш Г.К., Дунце М.Э. Сырье и питательные субстраты для промышленной биотехнологии. Рига, 1986. 156 с.
6. Остриков А.Н., Магомедов Г.О., Дерканосова Н.М. Технология экструзионных продуктов. СПб., 2007. 202 с.
7. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. 2-е изд., перераб. и доп. М., 1979.
8. Яковлев В.И. Технология микробиологического синтеза. М., 1987. 272 с.

УДК 630.864.9

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ АЦИЛИРОВАНИЯ ЛИГНИНА СИСТЕМОЙ «ПИРИДИН – ХЛОРАНГИДРИД ВЫСШЕЙ КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ»

Д.Д. Ефрюшин, О.В. Жогов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

Рассмотрена возможность ацилирования технических лигнинов системой на основе пиридина и хлорангидрида пальмитиновой кислоты. Строение полученных соединений подтверждено методом ИК-спектроскопии.

Ключевые слова: сульфатный лигнин, ацилирование, хлорангидрид карбоновой кислоты, ацилиевая соль, тионилхлорид.

Одним из методов химической модификации технических лигнинов является ацилирование его гидроксильных групп, поэтому поиск новых доступных ацилирующих систем является актуальным направлением в химии лигнина. Одной из таких систем, является смесь «пиридин – ацетилхлорид», использование которой позволяет получать продукты с высокими степенями превращения. При этом в реакцию вступают как алифатические, так и фенольные ОН-группы, чего было очень сложно достичь, используя другие ацилирующие системы [1].

С целью расширения ряда ацилирующих систем нами была предложена система «пиридин – хлорангидрид высшей карбоновой кислоты». В процессе синтеза образуется ацилиевая соль, которая является сильным ацилирующим агентом, превосходящим по активности ангидриды и хлорангидриды карбоновых кислот [2].

Для качественной оценки возможности направления реакции ацилирования предлагаемой системой рассчитаны энергии Гиббса продуктов реакции и исходных реагентов с использованием метода теории функционала плотности (DFT) в рамках базиса B3LYP/6-31G для фенилпропановых, сиригилпропановых и гваяцилпропановых единиц лигнина. В качестве ацилирующего агента была предложена ацилиевая соль пальмитиновой кислоты [3].

В результате расчета подтверждена возможность самопроизвольного протекания реакции ацилирования лигнина пальмитиновой кислотой (рис. 1).

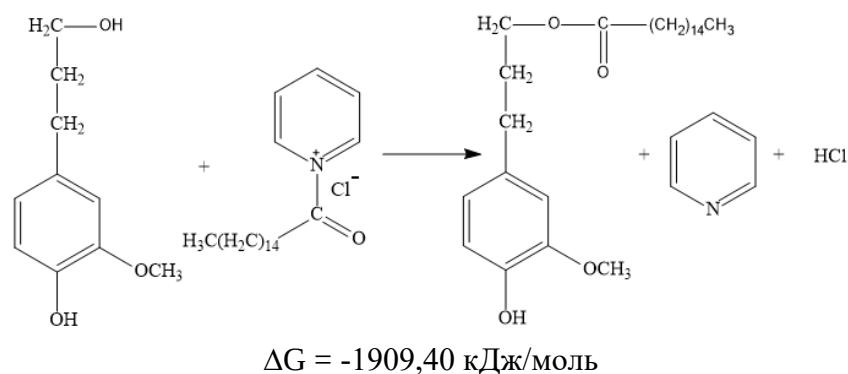


Рис. 1. Схема химической реакции структурной гваяцилпропановой единицы лигнина с ацилиевой солью пальмитиновой кислоты

На основании полученных расчетов было установлено, что реакция наиболее вероятна в γ -положении ФПЕ, так как данные единицы являются концевыми, менее подвержены стерическим факторам, т.е. более доступны для ацилирующего агента. В целом это соответствует теоретическим представлениям, так как фенольные единицы наименее доступны, ОН-группы в β -положении участвуют в образовании связи С-О-С в сетчатой структуре лигнина, а ОН-группы в α -положении находятся в сопряженном состоянии.

В качестве практической реализации применяемой системы было проведено ацилирование модельного соединения лигнина на примере ванилинового спирта (рис. 2).

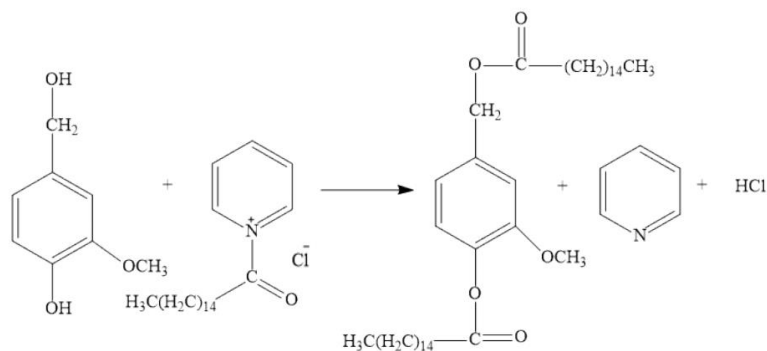


Рис. 2. Схема химической реакции ванилинового спирта с ацилиевой солью пальмитиновой кислоты

Строение ацилированного ванилинового спирта было подтверждено методом ИК-спектроскопии, где отчетливо видно значительное повышение силы интенсивности полос в области 1740 см^{-1} (валентные колебания группы С=О остатка пальмитиновой кислоты в сложноэфирной связи). Также наблюдалось уменьшение интенсивности пропускания и незначительные изменения симметрии полосы поглощения в области $3600\text{--}3000 \text{ см}^{-1}$ (валентное колебание ОН-групп) (рис. 3).

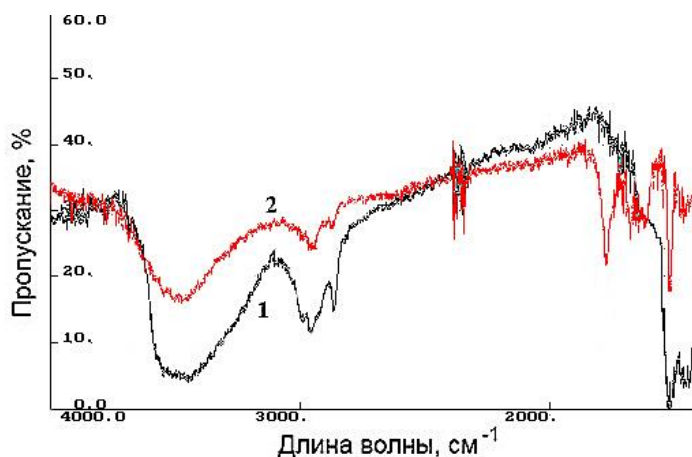


Рис. 3. ИК-спектры исходного (1) и ацилированного пальмитиновой кислотой (2) ванилинового спирта

Проверив эффективность выбранной ацилирующей системы при работе с модельным соединением, была проведена серия синтезов для получения ацилированных продуктов сульфатного лигнина по схеме, представленной на рисунке 4.

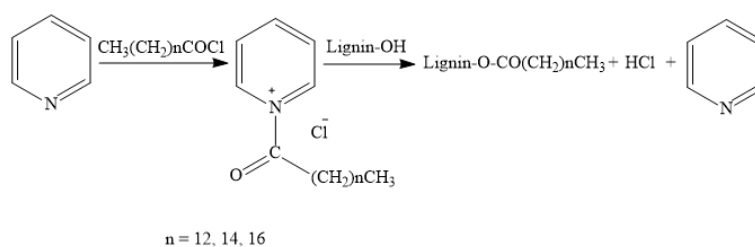


Рис. 4. Реакция ацилирования сульфатного лигнина высшими карбоновыми кислотами в среде пиридина

Для синтеза продуктов были предложены следующие условия: продолжительность от 1 до 5 часов, температура процесса соответствует температуре плавления карбоновой кислоты (миристиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот, соответственно равны 54,4 °C, 62,9 °C, 69,3 °C), так как при более низких температурах смесь не гомогенизируется, а повышение температуры синтеза приводило к активному испарению тионилхлорида, что приводило к снижению выхода ацилиевой соли карбоновой кислоты и эффективности процесса в целом.

Полученные продукты высаживали в воду для удаления непрореагировавшего тионилхлорида, промывали дистиллированной водой на фильтре Шотта для удаления пиридина, после чего высушивали до воздушно-сухого состояния. Далее он подвергался экстрагированию в аппарате Сокслета диэтиловым эфиром на протяжении 8 часов.

Готовый продукт высушивался сначала на открытом воздухе, а затем в эксикаторе над хлоридом кальция. Внешне продукт представляет собой порошок от темно-коричневого до кремового цвета.

Ацилированный сульфатный лигнин исследовали методом химического анализа, установили содержание связанной миристиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот и количество прореагировавших ОН-групп (табл. 1–3).

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что даже при относительно небольшой продолжительности синтеза (1–3 часа) в реакцию ацилирования вступают фактически 6070 % алифатических ОН-групп лигнина, а увеличение времени синтеза свыше 4 часов нецелесообразно, так как дальнейший рост связанной карбоновой кислоты находится в пределах погрешности.

Таблица 1

Результаты химического анализа ацилированных продуктов сульфатного лигнина с миристиновой кислотой (время синтеза – 1–5 часов, температура 54,4 °С)

Продолжительность синтеза, ч	Количество связанной карбоновой кислоты, %	Количество прореагировавших ОН-групп, %	Степень превращения, %
1	50,4 ± 0,5	3,3 ± 0,3	0,30
2	50,9 ± 0,5	7,4 ± 0,3	0,68
3	52,7 ± 0,5	7,6 ± 0,3	0,70
4	55,0 ± 0,5	7,8 ± 0,3	0,72
5	42,4 ± 0,5	6,3 ± 0,3	0,58

Таблица 2

Результаты химического анализа ацилированных продуктов сульфатного лигнина с пальмитиновой кислотой (время синтеза – 1–5 часов, температура 62,9 °С)

Продолжительность синтеза, ч	Количество связанной карбоновой кислоты, %	Количество прореагировавших ОН-групп, %	Степень превращения, %
1	42,1 ± 0,5	6,2 ± 0,3	0,57
2	52,8 ± 0,5	6,5 ± 0,3	0,60
3	54,5 ± 0,5	8,0 ± 0,3	0,73
4	55,2 ± 0,5	8,1 ± 0,3	0,74
5	61,8 ± 0,5	9,1 ± 0,3	0,83

Таблица 3

Результаты химического анализа ацилированных продуктов сульфатного лигнина со стеариновой кислотой (время синтеза – 1–5 часов, температура 69,3 °С)

Продолжительность синтеза, ч	Количество связанной карбоновой кислоты, %	Количество прореагировавших ОН-групп, %	Степень превращения, %
1	46,9 ± 0,5	6,9 ± 0,3	0,63
2	47,9 ± 0,5	7,4 ± 0,3	0,68
3	53,0 ± 0,5	7,8 ± 0,3	0,72
4	54,1 ± 0,5	8,0 ± 0,3	0,73
5	54,1 ± 0,5	8,0 ± 0,3	0,73

Анализ методом ИК-спектроскопии (рис. 5) показал, что в области $3600\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ наблюдается снижение интенсивности пропускания и изменение симметрии полосы поглощения (валентное колебание ОН-групп).

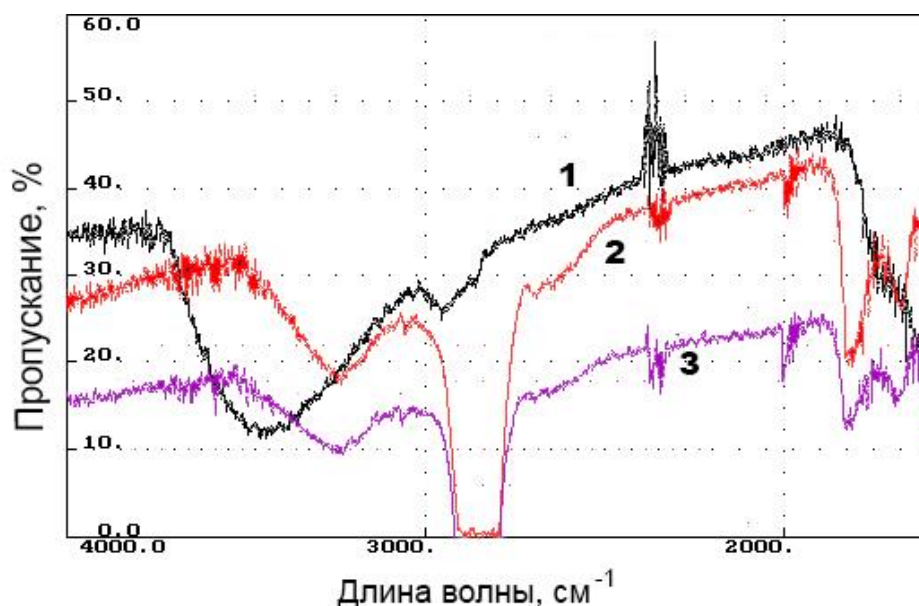


Рис. 5. ИК-спектр исходного сульфатного лигнина (1), сульфатного лигнина, ацилированного миристиновой кислотой (2) и сульфатного лигнина, ацилированного пальмитиновой кислотой (3)

В области 1740 см^{-1} наблюдается увеличение интенсивности полос (валентные колебания группы $\text{C}=\text{O}$ остатка карбоновой кислоты в сложноэфирной связи), что свидетельствует о наличии ацильных групп в исследуемом образце.

Таким образом, применение системы «пиридин – хлорангидрид высшей карбоновой кислоты» для ацилирования технических лигнинов является возможным. Дальнейшие исследования позволят подробнее изучить и усовершенствовать процесс синтеза, а также подробно изучить свойства полученных продуктов.

Библиографический список

1. Ефрюшин Д.Д., Корнев Д.В., Андреева А.С. Исследование реакции ацилирования сульфатного лигнина системой «пиридин – ацетилхлорид» // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VII Всероссийской конференции. 5–9 октября 2020 г. / под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. Барнаул, 2020. С. 246–247.
2. Джоуль Дж., Миллс К. Химия гетероциклических соединений. М., 2004. 728 с.
3. Granovsky A. A. Introduction to the Firefly. Electronic text data. Liverpool, 1994-2011. Mode of access: [www: http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html](http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html). Title from screen.

УДК 676.168

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ОТ СТЕПЕНИ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ЦЕЛЛЮЛОЗ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е.И. Кащеева, Ю.А. Гисматулина, Е.К. Гладышева, Г.Ф. Миронова

*Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения
Российской академии наук, Бийск, Россия*

В данной работе изучалась зависимость ферментативного гидролиза от степени полимеризации образцов целлюлозы различного происхождения, а именно бактериальной целлюлозы, синтетической целлюлозы и трех видов растительной целлюлозы (из мискантуса, соломы льна-межеумка и тростника обыкновенного). Наибольший выход редуцирующих веществ (82–90%) был получен при гидролизе образцов бактериальной целлюлозы и целлюлозы из мискантуса и тростника, которые характеризуются различными значениями степени полимеризации целлюлозы: 2010, 1030 и 400 соответственно. Показано, что степень полимеризации целлюлозы не является свойством, определяющим эффективность ферментативного гидролиза.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, степень полимеризации целлюлозы, бактериальная целлюлоза, синтетическая целлюлоза, мискантус, солома льна-межеумка, тростник обыкновенный.

Эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы в биомассе в основном обусловлена природными структурными особенностями биомассы, которые можно разделить на химические или физические. К химическим особенностям биомассы относится её компонентный состав, к физическим – доступная площадь поверхности биомассы, кристалличность целлюлозы и степень полимеризации, объем пор, размер частиц биомассы, физическое распределение лигнина и гемицеллюлозы, а также их связь с целлюлозой в матрице биомассы. Согласно работе [1] высокая степень полимеризации целлюлозы в предобработанной биомассе препятствует её эффективному разрушению целлюлазами, а снижение степени полимеризации целлюлозы существенно улучшает ее гидролиз целлюлазами, поскольку возрастает количество доступных концевых групп целлюлозной цепи и ослабляются водородные связи. В работе [2] подтверждено высокое влияние степени полимеризации на ферментативный гидролиз целлюлозы из мискантуса. Некоторые авторы сообщали о незначительном или косвенном влиянии снижения степени полимеризации целлюлозы на скорость ферментативного гидролиза [3-4].

Целью данной работы является изучение зависимости ферментативного гидролиза от степени полимеризации образцов целлюлозы различного происхождения.

В качестве объектов исследования в работе использовали образцы целлюлозы различного происхождения, а именно бактериальную целлюлозу, синтетическую целлюлозу и три вида растительной целлюлозы.

Биосинтез бактериальной целлюлозы проводили на ферментативном гидролизате технической целлюлозы шелухи овса [5–6] в ранее выявленных оптимальных условиях [7]. Образец синтетической целлюлозы был предоставлен генеральным директором ООО «Мастер-бренд» (Москва) С.М. Воинским. Метод получения образца подробно описан в работе [8]. Образцы растительной целлюлозы были получены из трех видов сырья: мискантуса, соломы

льна-межеумка и тростника обыкновенного. Целлюлозу из данных источников сырья получали комбинированным способом [6].

Характеристики образцов целлюлозы определяли по общепринятым способам, регламентируемым ГОСТами, и специальным методам для анализа растительного сырья. Оценку реакционной способности к ферментативному гидролизу проводили в соответствии с авторской методикой [9] с использованием ферментных препаратов «Целлолюкс-А» и «Ультрафло Коре». Работу выполняли при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, Бийск).

На рисунке 1 представлены фотографии образцов целлюлозы, исследуемых в данной работе.

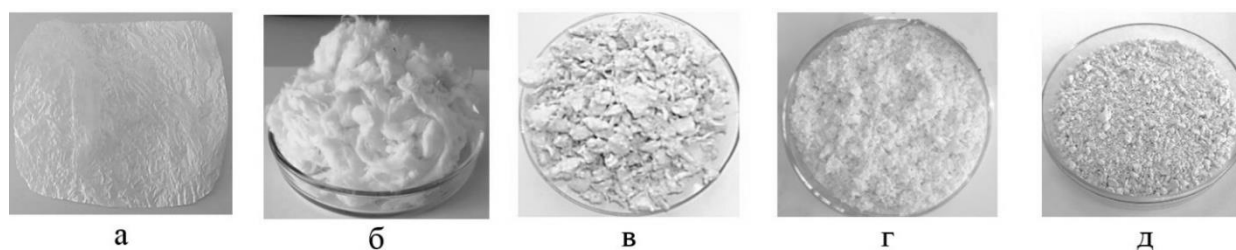


Рис. 1. Фотографии образцов целлюлозы: а) бактериальная целлюлоза; б) синтетическая целлюлоза; в) целлюлоза из мискантуса; г) целлюлоза из соломы льна-межеумка; д) целлюлоза из тростника

Образец бактериальной целлюлозы (а) принципиально отличается от остальных образцов и представляет собой тонкую полупрозрачную пленку. Образец синтетической целлюлозы (б) представляет собой мягкую, рыхлую волокнистую массу белого цвета, напоминающую по структуре вату. Образцы из растительной целлюлозы (в–д) внешне очень похожи и представляют собой хрупкие, жесткие, короткие отдельные волокна и смесь волокон, переплетенных в комочки разного диаметра.

В таблице 1 представлены свойства образцов целлюлозы.

Таблица 1

Свойства образцов целлюлозы

Образец целлюлозы	Массовая доля, %				Степень полимеризации
	α -целлюлозы	лигнина	зола	пентозанов	
Бактериальная целлюлоза	99,9	0	0	0	2010
Синтетическая целлюлоза	99,4	0	0	0	3140
Целлюлоза из мискантуса	91,5	1,4	0,7	6,4	1030
Целлюлоза из соломы льна-межеумка	70,0	0,7	0,8	0,8	430
Целлюлоза из тростника	76,6	3,5	0,5	2,1	400

Сравнивая степень полимеризации пяти образцов целлюлозы между собой нами установлено, что лидерами по степени полимеризации являются образцы синтетической и бактериальной целлюлозы со следующими показателями: 3140 и 2010, соответственно. Образцы растительной целлюлозы из мискантуса, соломы льна-межеумка и тростника уступают

по степени полимеризации синтетической целлюлозе в 3 раза, 7,3 раза и 7,8 раз соответственно, а бактериальной целлюлозе в 1,9 раза, 4,7 раза и 5 раз соответственно.

Результаты ферментативного гидролиза образцов целлюлозы представлены на рисунке 2 в виде зависимости концентрации редуцирующих веществ (РВ) от продолжительности процесса. В таблице 2 приведены результаты исследования фильтратов, полученных через 72 часа гидролиза.

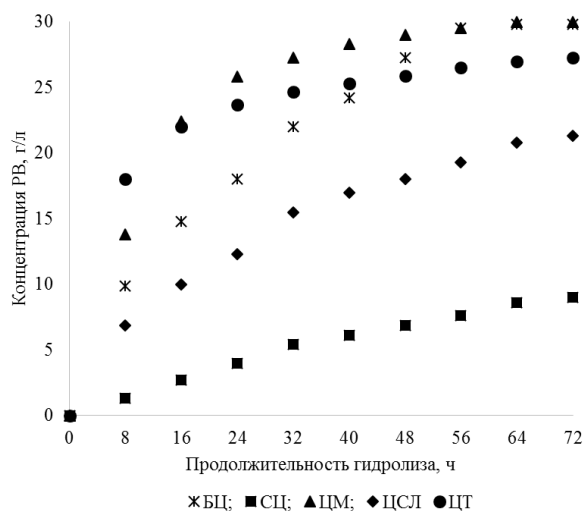


Рис. 2. Зависимость концентрации РВ от продолжительности ферментативного гидролиза образцов целлюлозы (БЦ – бактериальная целлюлоза, СЦ – синтетическая целлюлоза, ЦМ – целлюлоза из мискантуса, ЦСЛ – целлюлоза из соломы льна-межеумка, ЦТ – целлюлоза из тростника)

Наименьшей реакционной способностью обладает образец синтетической целлюлозы. Гидролиз данного субстрата характеризуется самой низкой скоростью. Прирост концентрации РВ происходит медленно на протяжении 72 часов и достигает максимального значения 9 г/л (выход РВ 27%). Следует отметить, что образец синтетической целлюлозы характеризуется самым высоким значением степени полимеризации (3140). Образец бактериальной целлюлозы со степенью полимеризации 2010 в первые 8 часов процесса имеет скорость гидролиза в 7,6 раз большую по сравнению с образцом синтетической целлюлозы. Оба субстрата характеризуются высокими значениями степени полимеризации и м.д. α -целлюлозы 99,4–99,9%. Выход РВ в гидролизате образца бактериальной целлюлозы через 72 ч составляет 89,4%, что в 3,3 раза больше по сравнению с выходом РВ для образца синтетической целлюлозы. Высокая эффективность гидролиза связана с отличительным свойством бактериальной целлюлозы – высокопористой развитой сетчатой поверхностью, которая увеличивает количество доступных ферментам центров субстрата.

Образцы целлюлозы, полученные комбинированным способом из трех видов сырья, обладают различными реакционными способностями к ферментативному гидролизу. При этом образцы целлюлозы из мискантуса (степень полимеризации 1030) и тростника (степень полимеризации 400) демонстрируют схожий характер кинетических зависимостей: резкий прирост концентрации РВ в первые 24 часа гидролиза, а затем замедление процесса. Образец целлюлозы из тростника через 8 часов имеет максимальную скорость гидролиза среди всех субстратов, концентрация РВ составляет 17 г/л (выход РВ 51 %). Концентрация

РВ в гидролизате образца целлюлозы из мискантуса через 8 часо составляет 14 г/л (выход РВ 42%). Через 16 часов кинетические зависимости этих субстратов пересекаются при значении концентрации РВ 22 г/л, затем образец целлюлозы из тростника уступает образцу целлюлозы из мискантуса. Через 72 часа концентрация РВ в гидролизатах образцов целлюлозы из мискантуса и тростника составляют 30,0 г/л и 27,3 г/л, что соответствует выходу РВ 90 и 82% соответственно. Другой характер кинетической зависимости наблюдается при гидролизе образца целлюлозы из соломы льна-межеумка (степень полимеризации 430): постепенный прирост концентрации РВ на протяжении всего процесса. Через 72 ч гидролиза достигаются значения концентрации РВ 21,3 г/л и выхода РВ 64%.

Таблица 2

Результаты ферментативного гидролиза образцов целлюлозы

Образец целлюлозы	Концентрация РВ, г/л	Выход РВ, %
Бактериальная целлюлоза	29,8±0,1	89,4±1,4
Синтетическая целлюлоза	9,0±0,1	27,0±1,4
Целлюлоза из мискантуса	30,0±0,1	90,0±1,4
Целлюлоза из соломы льна-межеумка	21,3±0,1	63,9±1,4
Целлюлоза из тростника	27,3±0,1	81,9±1,4

Установлено, что степень полимеризации целлюлозы не является главным свойством, определяющим эффективность ее ферментативного гидролиза. Наибольший выход РВ при гидролизе (82-90 %) характерен для образцов бактериальной целлюлозы и целлюлозы из мискантуса и тростника, которые имеют степень полимеризации целлюлозы 2010, 1030 и 400 соответственно.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания для Института проблем химических и энергетических технологий (проект 121061500030-3)

Библиографический список

1. Hallac B.B., Ragauskas A.J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol // *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2011. Vol. 5. P. 215–225. DOI:10.1002/bbb.269.
2. Zhang W., Yi Z., Huang J. et al. Three lignocellulose features that distinctively affect biomass enzymatic digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in Miscanthus // *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 130. P. 30-37. DOI:10.1016/j.biortech.2012.12.029.
3. Hu F., Ragauskas A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry / F. Hu, A. Ragauskas // *Bioenergy Research*. 2012. № 5. P. 1043-1066. DOI:10.1007/s12155-012-9208-0.
4. Wu S., Jiang X., Jiang H. et al. Impacts of cotton linter pulp characteristics on the processivity of glycoside hydrolase family 5 endoglucanase from *Volvariella Volvacea* // *Cellulose*. 2021. Vol. 28. P. 1947–1959. DOI:10.1007/s10570-020-03665-x.
5. Budaeva V.V., Makarova E.I., Gismatulina Yu.A. Integrated flowsheet for conversion of nonwoody biomass into polyfunctional materials // *Key Engineering Materials*. 2016. Vol. 670. P. 202–206. DOI:10.4028/www.scientific.net/KEM.670.202.

6. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of Non-Woody Cellulosic Feedstocks for Bacterial Cellulose Synthesis // *Polymers*. 2019. Vol. 11(10). № 1645.
7. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. Vol. 54(2). P. 179–187. DOI: 10.1134/S0003683818020035.
8. Пат. 2663434 Российская Федерация, МПК C08B15/00. Способ получения синтетической целлюлозы / Терехов А.К., Радин С.А.; заявитель и патентообладатель Открытое акционерное общество «ИНФОТЭК ГРУП». № 2017141160; заявл. 27.11.2017; опубл. 06.08.2018, Бюл. № 22.
9. Кашеева Е.И., Будаева В.В. Определение реакционной способности к ферментативному гидролизу целлюлозосодержащих субстратов // *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2018. Т. 84. № 10. С. 5–11.

УДК 547.992.3

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ АЦИЛИРОВАНИЯ ЛИГНИНА КАПРОЛАКТАМОМ В СРЕДЕ ТОЛУОЛА

П.В. Комаров, Т.В. Никитина, А.И. Шалимова, А.В. Протопопов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

В статье рассмотрены закономерности взаимодействия лигнина с капролактамом в среде толуола и муравьиной кислоты, изучены кинетические закономерности реакции ацилирования. В ходе работы получены сложные эфиры лигнина с аминокaproновой кислотой с содержанием связанных гидроксильных групп 10,5. Кинетика процесса ацилирования рассчитана с применением Ерофеева-Колмогорова. На основании полученных констант скорости были определены параметры переходного комплекса. Энтропия активации составляет $-291,15 \text{ Дж/моль} \cdot \text{К}$, энтальпия активации $9,7 \text{ кДж/моль}$. При сопоставлении рассчитанной энтальпии активации с энергией активацией, рассчитанной с применением уравнения Аррениуса, $12,3 \text{ кДж/моль}$, наблюдаем более низкое значение при использовании теории переходного комплекса, что может свидетельствовать о сложном характере протекающей реакции. Образование сложных эфиров подтверждено методом ИК-спектроскопии.

Ключевые слова: ацилирование, аминокaproнаты целлюлозы, сложные эфиры целлюлозы.

В последние годы значительно возрос интерес к переработке отходов деревоперерабатывающей промышленности. К их числу относятся не только древесные опилки, стружка и кора, но и лигносульфонаты, гидролизные щёлоки, а также различные виды технических лигнинов. С каждым годом возрастает количество исследований, направленных на модификацию лигнина, придание ему новых химических и физико-механических свойств.

Несмотря на широкую область применения лигнина, как в исходной форме, так и в модифицированной, до сих пор остаётся проблематичной крупнотоннажная переработка и утилизация технических лигнинов. Зачастую, основной трудностью переработки больших количеств лигнина является энергоёмкость методов, а также высокая стоимость различных реагентов, применяемых для химической модификации технических лигнинов. Поэтому в на-

стоящее время исследования в области утилизации отходов деревоперерабатывающей промышленности связаны с поиском новых, более дешевых и менее энергоёмких способов переработки лигнина, а также новых областей применения этого материала как в первоначальной, так и изменённой формах [1, с. 1280].

Получение сложных эфиров лигнина с аминокислотами является перспективным направлением переработки лигнинов. Получаемые модифицированные лигнины обладают биологически-активными и фармакологическими свойствами и в то же время являются прекрасным адсорбентом. Лигнины связывают различные микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, токсины экзогенной и эндогенной природы, аллергены, ксенобиотики, тяжелые металлы, радиоактивные изотопы, аммиак, двухвалентные катионы и способствуют их выведению через ЖКТ. Они оказывают энтеросорбирующее, дезинтоксикационное, противодиарейное, антиоксидантное, гиполипидемическое и комплексообразующее действие, компенсируют недостаток естественных пищевых волокон в пище человека, положительно влияя на микрофлору толстого кишечника и неспецифический иммунитет. В отличие от антибактериальных ЛС лигнин не приводит к развитию дисбиоза [2, с. 133].

В ходе проделанной работы нами были проведены опыты по синтезу сложных эфиров лигнина с аминокaproновой кислотой.

Взаимодействие лигнина с капролактамом проводили в среде толуола с муравьиной кислотой. Для этого навеску лигнина помещали в толуол при заданной температуре для предварительного набухания и добавляли муравьиную кислоту для предварительной активации гидроксильных групп лигнина. Впоследствии добавляли капролактam и выдерживали заданное время при данной температуре. Полученные продукты анализировали на содержание аминокaproновой кислоты.

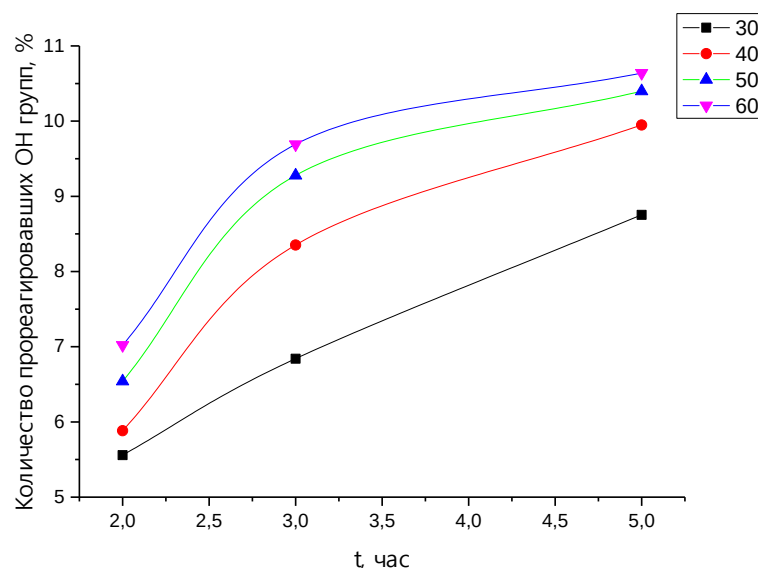


Рис. 1. Количество связанных гидроксильных групп в лигнине

В этом случае наблюдается более глубокая степень превращения, взаимодействуют не только алифатические группы лигнина, но и ароматические. Очевидно, в данном случае муравьиная кислота не только раскрывает цикл капролактама, делая его реакционноспособным, но и взаимодействует с гидроксилами лигнина, предварительно активируя их.

Также полученные продукты анализировали методом ИК-спектроскопии (рис. 2).

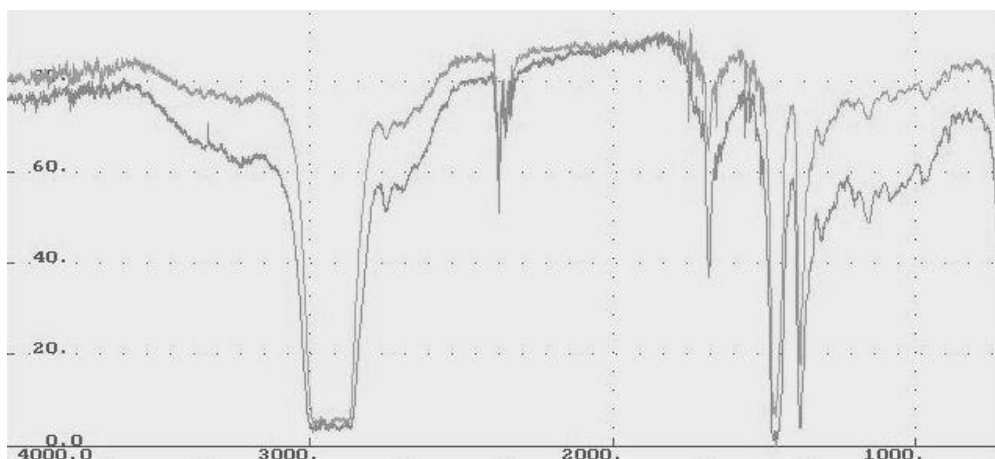


Рис. 2. ИК-спектр продуктов взаимодействия лигнина с капролактамом

Как свидетельствует полученный ИК-спектр, происходит взаимодействие аминокaproновой кислоты с гидроксилами лигнина, появляются полосы поглощения в области 1730 см^{-1} и 1280 см^{-1} , ответственные за колебания сложноэфирной связи, что подтверждает образование модифицированного аминокaproновой кислотой лигнина.

Влияние температуры на скорость реакции проявляется в увеличении константы скорости. Поскольку реакция ацилирования лигнина в толуоле является гетерогенным процессом, расчет кинетических закономерностей проводился с применением уравнения Ерофеева-Колмогорова, хорошо зарекомендовавшего себя для реакций растительного сырья.

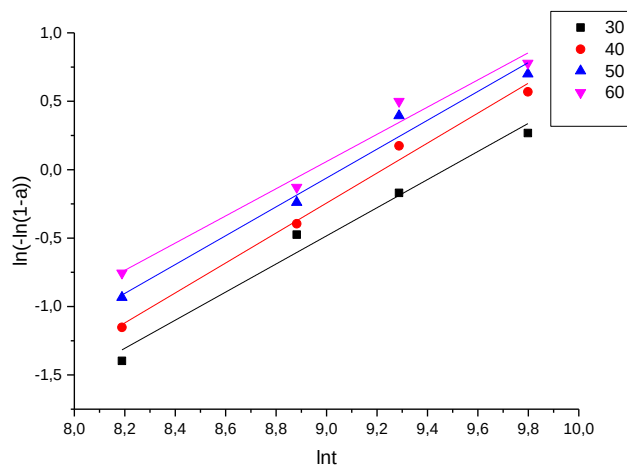


Рис. 3. Кинетические анаморфозы ацилирования лигнина капролактамом

Из построенных кинетических анаморфоз (рис. 3) были рассчитаны константы скорости реакции ацилирования лигнина и, впоследствии, кинетические параметры ацилирования с применением уравнения Эйринга. Энтропия активации составляет $-291,15\text{ Дж/моль}\cdot\text{К}$, энтальпия активации $9,7\text{ кДж/моль}$. При сопоставлении рассчитанной энтальпии активации с энергией активацией, рассчитанной с применением уравнения Аррениуса, $12,3\text{ кДж/моль}$, наблюдаем более низкое значение при использовании теории переходного комплекса, что может свидетельствовать о сложном характере протекающей реакции.

Таким образом, в ходе проведенной работы нами были получены аминокислотные производные лигнина на основе капролактама. Образование сложноэфирной связи лигнина с аминокислотой подтверждено методом ИК-спектроскопии. Расчет кинетических параметров реакции ацилирования показал ее протекание по сложному механизму с образованием переходного комплекса, а также выявлено влияние стерических факторов, приводящих реакцию в диффузионную область, на основании вычисленной энтропии активации.

Библиографический список

1. Jiang L., Li S., Li X., et al. Preparation of Aminolignin from Paper Mill Sludge and Its Discolouring Flocculant // Asian J. Chem. ,2013. №. 25(3). P. 1279–1284.
2. Ten E., Vermerris W. Recent developments in polymers derived from industrial lignin // Inc. J. Appl. Polym. Sci. 2015. P. 132.

УДК 664.3.033

К ВОПРОСУ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ

Т.И. Котова, А.Г. Хантургаев, В.А. Хантургаева, В.А. Цыцыков, Н.А. Хантургаева

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,

Улан-Удэ, Россия

В Байкальском регионе ежегодный урожай плодов облепихи составляет до 600–900 тонн. Существующие способы переработки плодов облепихи обладают рядом существенных недостатков. Цель настоящей работы – научное обоснование разработки инновационного способа комплексной переработки плодов облепихи с применением ЭМП СВЧ (электромагнитного поля сверхвысоких частот). Объектом исследований служили замороженные и свежие плоды облепихи, сушеная облепиха, сок, масло из мякоти, масло из косточек. При проведении экспериментальных исследований использовали стандартные методики. Определенные экспериментальным путем оптимальные параметры основных технологических операций: дефростации и обезвоживания, отделения мякоти от косточек, прессования позволили произвести подбор оборудования и разработать технологию комплексной переработки плодов облепихи, практическая реализация которой была проведена на базе ООО «МИП «БайкалЭкоПродукт». Установлено, что предлагаемая технология обеспечивает высокое качество получаемых продуктов и значительно сокращает продолжительность технологического процесса. В результате исследований разработан инновационный способ комплексной переработки плодов облепихи, позволяющий получить 12 продуктов. Подана заявка на патент на изобретение.

Ключевые слова: облепиха, безотходная технология, электромагнитное поле сверхвысоких частот, показатели качества, оптимальные параметры.

Введение. В Байкальском регионе промышленной плодово-ягодной культурой является облепиха, известная уникальным химическим составом и содержанием ценных биологически активных веществ. Площади, занимаемые облепихой только в Республике Бурятия, составляют более 650 га, а потенциальные возможности имеющихся садов ежегодно позволяют выращивать и собирать до 600–900 тонн плодов облепихи [1].

Существующие технологии и способы переработки плодов облепихи обладают рядом существенных недостатков: энерго-, металлоемкость и сложность оборудования, снижаю-

щие экономические показатели производства; продолжительность технологического процесса, неравномерность сушки, длительное воздействие высоких температур, ведущие к значительным потерям биологически активных веществ, ухудшению органолептических и физико-химических показателей, что в целом отрицательно сказывается на качестве готовой продукции [2–7].

Так как в последние годы для интенсификации процессов переработки растительного сырья все чаще используют ЭМП СВЧ [8, 9], научный интерес представляет изучение использования ЭМП СВЧ при комплексной переработке плодов облепихи.

В связи с вышесказанным актуальным является создание нового способа комплексной переработки плодов облепихи с использованием ЭМП СВЧ, позволяющего минимизировать отходы производства и сократить продолжительность технологического процесса наряду с повышением качества продукции и расширением ассортимента.

Целью настоящей работы явилось научное обоснование разработки инновационного способа комплексной переработки плодов облепихи с применением ЭМП СВЧ.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) выявить оптимальные параметры основных технологических операций переработки плодов облепихи, проводимых с применением ЭМП СВЧ;
- 2) разработать технологическую схему комплексной переработки плодов облепихи;
- 3) определить показатели качества основных продуктов, получаемых при переработке плодов облепихи согласно разработанной технологии.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований использовали плоды облепихи свежие осеннего сбора и замороженные плоды облепихи зимнего сбора (заморожены естественным путем на кусту при постепенном понижении температуры окружающего воздуха до минус 25 °С) урожая 2019 г селенгинского экотипа Республики Бурятия, а также основные виды продукции, получаемой при комплексной переработке плодов облепихи с применением ЭМП СВЧ: облепиха сушеная, сок, масло из мякоти, масло из косточек.

При промышленной апробации технологии использовали российское и импортное стандартное универсальное, частично-специализированное и инновационное технологическое оборудование.

Показатели качества сырья и готовой продукции определяли по стандартным общепринятым методикам.

Обработку результатов исследований проводили с использованием программных пакетов Statistica и Excel. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее измеряемых величин, m – стандартная ошибка, $n = 5$.

Результаты исследования. На первом этапе экспериментальных исследований определяли оптимальные параметры основных технологических операций переработки плодов облепихи с применением ЭМП СВЧ: дефростации, обезвоживания и прессования.

Проведенные авторами предварительные эксперименты показали, что обезвоживание плодов облепихи в ЭМП СВЧ целесообразно проводить до содержания влаги 25–30%, а впоследствии досушивать другим способом до влажности 4–6% для отделения мякоти от косточек. В связи с чем вначале стояла задача достичь влажности плодов облепихи 25–30% посредством обезвоживания свежих плодов и предварительной дефростацией и последующем обезвоживании замороженных плодов облепихи. Дефростацию и обезвоживание проводили в микроволновой вакуумной установке «Муссон-2» при следующих параметрах: температура от 35 до 55 °С, давление от 8,2 до 9,4 кПа, удельная СВЧ-мощность от 100 до 500 Вт/кг, продолжительность обезвоживания свежих плодов от 65 до 85 мин, продолжительность дефростации от 10 до 20 мин.

станции замороженных плодов от 4 до 12 мин, продолжительность обезвоживания плодов после дефростации от 63 до 83 мин. Все опыты проводили в пяти повторностях, средние значения результатов исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1

Оптимальные параметры дефростации и обезвоживания

Параметры	№ опыта				
	1	2	3	4	5
Дефростация и обезвоживание в аппарате с СВЧ-энергоподводом и вакуумом					
Температура, °C	35	40	45	50	55
Давление, кПа	8,2	8,5	8,8	9,1	9,4
Удельная СВЧ-мощность, Вт/кг	100	200	300	400	500
Продолжительность обезвоживания свежих плодов, мин	85	80	75	70	65
Продолжительность дефростации замороженных плодов, мин	12	10	8	6	4
Продолжительность обезвоживания плодов после дефростации, мин	83	78	73	68	63
Влажность продукта (конечная), %	35	30	25	20	15

Полученные данные (табл. 1) свидетельствуют о том, что оптимальная продолжительность дефростации и обезвоживания замороженного сырья составляет 81–88 мин, продолжительность обезвоживания при переработке свежих плодов облепихи – 75–80 мин.

Обезвоженные плоды облепихи с влажностью 25–30% досушивали в инфракрасной сушилке до влажности 4–6%, направляли в мельницу на обрушение, затем в воздушный сепаратор для отделения мякоти от косточек. Полученные мякоть и косточки по отдельности направляли в устройство, разработанное авторами специально для реализации предлагаемой технологии для прессования с целью получения масла. Опыты по извлечению максимального количества масла из облепихового сырья проводили при следующих интервалах значений: температура от 35 до 55 °C, удельная СВЧ-мощность от 200 до 400 Вт/кг, продолжительность от 5 до 25 мин. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Оптимальные параметры прессования

Прессование	№ опыта				
	1	2	3	4	5
Температура, °C	35	40	45	50	55
Удельная СВЧ-мощность, Вт/кг	200	250	300	350	400
Продолжительность, мин	25	20	15	10	5
Выход масла, %					
– из мякоти	80	80	80	75	75
– из косточек	70	70	70	65	65

Анализ данных (табл. 2) свидетельствует о том, что в опытах № 2 и № 3 получены наилучшие результаты прессования мякоти и косточек. Так как при температуре ниже 40°C и удельной СВЧ-мощности ниже 250 Вт/кг продолжительность прессования увеличивается, что ведет к дополнительным энергозатратам, при этом выход масла остается на уровне опытов № 2 и № 3.

Установленные экспериментальным путем оптимальные режимы основных технологических операций комплексной переработки плодов облепихи (дефростация и обезвоживание замороженных плодов облепихи, обезвоживание свежих плодов облепихи, отделение мякоти от косточек, прессование мякоти и косточек) позволили сформировать блок основного оборудования, который включает микроволновую вакуумную установку «Муссон-2», устройство для получения масла с применением ЭМП СВЧ, инфракрасную сушилку, мельницу, воздушный сепаратор, экстрактор и блок дополнительного оборудования (инспекционный транспортер, моечная ванна с барботером, дозатор жидкости поршневой, розливочно-укупорочные аппараты и др.). В результате определения оптимальных параметров процесса и подбора оборудования была разработана технологическая схема безотходной переработки плодов облепихи (рис. 1).

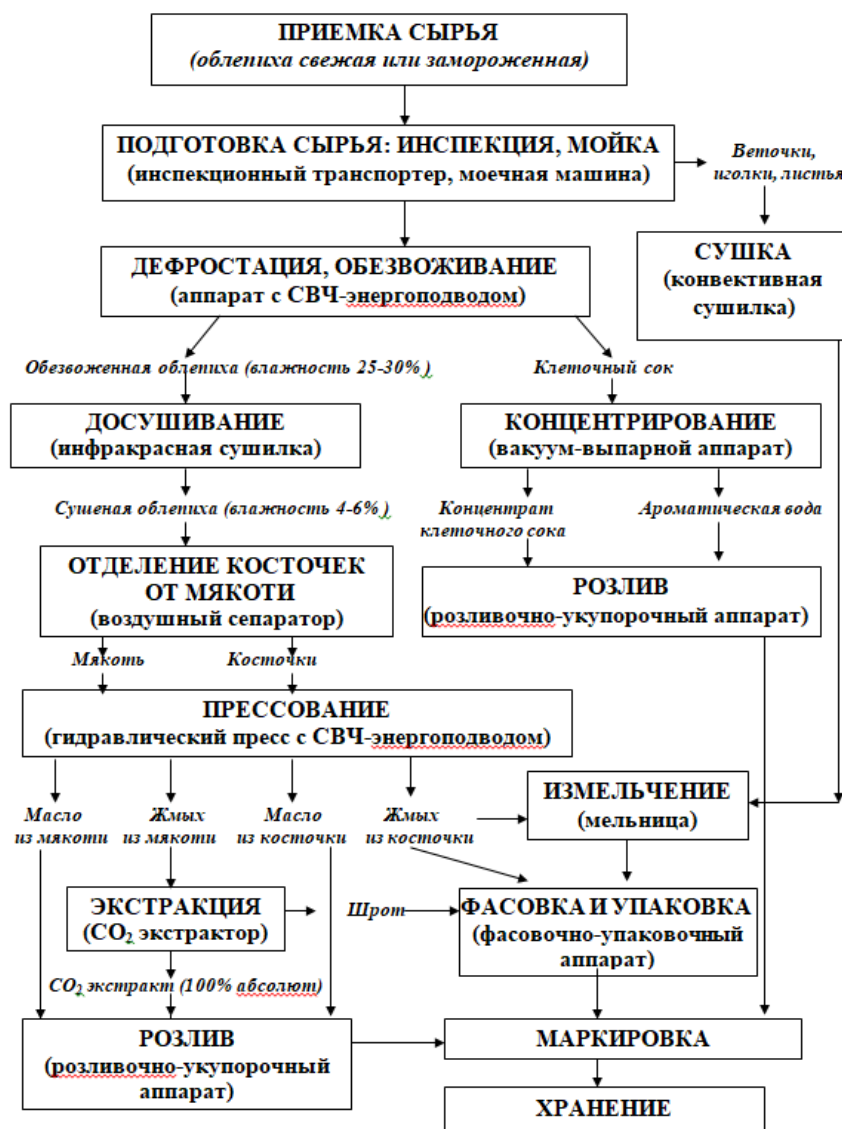


Рис.1. Технологическая схема комплексной переработки плодов облепихи

Согласно разработанной технологической схеме была проведена промышленная апробация предлагаемой технологии комплексной переработки плодов облепихи на базе ООО МИП «БайкалЭкоПродукт». Технологический процесс осуществляли как на серийно

выпускаемом пищевом оборудовании и устройствах, так и с использованием специального инновационного оборудования, разработанного сотрудниками Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления [10]. В результате испытаний, согласно разработанной технологии, было получено 12 видов продукции, четыре из которых являются основными: сушеная цельная облепиха с влажностью 4–6%; клеточный сок; масло облепиховое из мякоти; масло облепиховое из косточек; и сопутствующими, к которым относятся: растительная кормовая добавка из веточек, иголок и листьев; CO₂-экстракт (100% абсолюте); концентрированный клеточный сок; ароматическая вода; сушеная мякоть облепихи; облепиховые косточки; жмых из косточек; шрот из мякоти.

На следующем этапе исследований были изучены показатели качества сушеной облепихи, масла из мякоти, масла из косточек плодов облепихи и клеточного сока – основных продуктов, полученных в результате промышленной апробации технологии комплексной переработки плодов облепихи с применением ЭМП СВЧ. Исследовались органолептические показатели, физико-химические показатели, показатели безопасности. Экспериментальные исследования показателей качества продукции из облепихи показали, что качество основных продуктов, получаемых при комплексной переработке замороженных или свежих плодов облепихи, является высоким и соответствует требованиям нормативных документов [11–15]. По результатам проведенных исследований подана заявка на патент на изобретение «Способ комплексной переработки плодов облепихи».

Проведенные исследования доказали возможность использования ЭМП СВЧ при комплексной переработке плодов облепихи не только в качестве вспомогательного воздействия, но и на основных этапах технологического процесса: дефростации, обезвоживания, прессования мякоти и косточек, что значительно сокращает продолжительность всего технологического процесса и положительно влияет на качество получаемой продукции.

Подобранные в результате экспериментальных исследований оптимальные режимы СВЧ-обработки облепихового сырья обеспечивают не только высокое качество получаемых продуктов, но и позволяют в разы сократить продолжительность дефростации и обезвоживания облепихового сырья, а также улучшают структурно-механические характеристики плодов облепихи, что облегчает последующее отделение мякоти от косточек на мельнице, значительно сокращая продолжительность отделения до 9-11 мин. Исследованиями установлено, что под воздействием электромагнитного поля СВЧ значительно интенсифицируется процесс извлечения масла из мякоти и из косточек за счет нагрева и разжижения, что повышает выход чистого масла, тогда как для традиционного извлечения ценного масла согласно литературным данным используются диффузионные методы, основанные на экстракции дешевым растительным маслом, либо с применением в качестве растворителей химических реагентов (гексан, петролейный эфир), удаление которых является продолжительным и неполным, что, во-первых, не способствует полному извлечению масла, во-вторых возникает проблема утилизации масляного жмыха.

Выводы. В результате проведенных исследований представлено научное обоснование разработки инновационного способа комплексной переработки плодов облепихи с применением ЭМП СВЧ.

Установлено, что использование ЭМП СВЧ на отдельных технологических этапах при комплексной переработке плодов облепихи является целесообразным, так как позволяет сократить общую продолжительность технологического процесса и снизить температуру обработки термолабильного облепихового сырья.

Определены оптимальные параметры основных технологических операций переработки плодов облепихи, проводимых с применением ЭМП СВЧ. Доказано, что именно заявляемая совокупность экспериментально определенных режимов ЭМП СВЧ обеспечивает высокое качество получаемой продукции.

Разработана технологическая схема комплексной переработки плодов облепихи, включающая стандартное и инновационное оборудование, позволяющая получать широкий ассортимент продукции – 12 наименований.

Исследованы показатели качества основных видов продукции: сушеной облепихи, масла из мякоти, масла из косточек, сока – ярко выражены цвет, вкус, аромат. Установлено, что показатели качества основных видов продукции соответствуют требованиям нормативных актов Российской Федерации и Таможенного союза.

Разработанная технология апробирована и внедрена в производство на ООО «Байкал-ЭкоПродукт». Налажен серийный выпуск продукции. Разработана нормативно-техническая документация, что позволяет осуществлять успешную реализацию готовой продукции и получать прибыль предприятию-производителю.

Таким образом, научно обоснована возможность комплексной переработки плодов облепихи с применением ЭМП СВЧ, минимизирующей отходы производства, являющейся энерго- и ресурсосберегающей, что позволяет не только получать продукцию с низкой себестоимостью, но и обеспечивает рациональное использование и сохранение видового биоразнообразия дикоросов в регионе.

Библиографический список

1. Итоги всероссийской сельскохозяйственной переписи 2016 г. Т. 4: Посевные площади сельскохозяйственных культур и площади многолетних насаждений и ягодных культур. Книга 1. Площади сельскохозяйственных культур многолетних насаждений. Улан-Удэ. 2016. URL: https://burstat.gks.ru/storage/mediabank/vskhp2016_4-1.pdf
2. Малахова Т.В. Комплексная переработка плодов облепихи // Научное творчество молодежи – лесному комплексу России : материалы VIII Всерос. науч.-техн. конф. студентов и аспирантов и конкурса по программе «Умник». Екатеринбург, 2012. Ч. 2. С. 249–251.
3. Мустафаева К.К., Касьянов Г. И., Джаруллаев Д.С. Технология переработки плодов облепихи с использованием ЭМП СВЧ и CO₂-экстракции: монография. Махачкала, 2011. 100 с.
4. Первышина Г.Г., Никифоров Е. Г., Гоголева О. В. Комплексная переработка дикорастущей облепихи крушиновидной как средство сохранения биоразнообразия дикоросов в Красноярском крае // Региональная молодежная научно-практическая школа-конференция, посвященная Всемирному дню охраны окружающей среды, сборник материалов. Красноярск, 2008.
5. Способ переработки ягод облепихи (RU № 2262864 C2, МПК A23L 1/00, опубл. 27.10.2005).
6. Технологическая линия безотходной переработки облепихи (RU № 2520992 C1 МПК C11B 1/00, опубл. 27.04.2014).
7. Способ переработки плодов облепихи (RU № 2490916 C1, МПК A23B 7/08, A23L 2/02, A23L 2/7054, опубл. 27.08.2013).
8. Котова Т.И., Хантургаева Г.И., Хантургаев А.Г. и др. Способ сушки плодово-ягодного сырья, преимущественно замороженного / Патент на изобретение № 2322067, опубл. 20.04.2008.

9. Джаруллаев Д. С. Научно-технические принципы создания интенсивных технологий переработки плодово-ягодного сырья с использованием электромагнитного поля сверхвысокой частоты : дис. ... д-ра техн. наук. Махачкала, 2005. 243 с.
10. Протасов Г.И., Хантургаев А.Г., Котова Т.И. Устройство для получения облепихового масла и сока. Патент на полезную модель № 187479, приоритет от 13.12.2018.
11. ТР ТС 021/2011 Технический регламент таможенного союза «О безопасности пищевой продукции».
12. ТР ТС 023/2011 Технический регламент таможенного союза на соковую продукцию из фруктов и овощей.
13. ТУ 10.39.25-002-66510843-2019 «Ягоды сушеные».
14. ТУ 10.41.29-001-66510843-2019 «Масло облепиховое».
15. ТУ 10.32.18-003-66510843-2019 «Соки ягодные».

УДК 636.087.7

БИОРЕФАЙНИНГ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

***В.В. Коньшин¹, В.А. Крахмалев¹, Л.А. Кориунов¹, А.Н. Афаньков¹,
И.Н. Гришаева², Н.В. Шаньшин²***

¹*Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия*

²*Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул, Россия*

Проведено исследование возможности использования продуктов взрывного автогидролиза растительного происхождения в качестве кормовой добавки телят. Показано, что продукты взрывного автогидролиза, полученные из лузги овса посевного, *Avena Sativa*, обеспечивают повышение зоотехнических показателей. При этом получаемые по технологии взрывного автогидролиза кормовые добавки не уступают по зоотехническим показателям традиционным кормовым добавкам на основе побочных продуктов растительного происхождения.

Ключевые слова: взрывной автогидролиз, кормовые добавки, зоотехнические показатели.

Биорефайнинг отходов растительного происхождения деревообработки и сельского хозяйства является одним из перспективных направлений при производстве наукоемкой продукции на территории Алтайского края. Для этого используются различные методы как химической обработки, так и физико-химического воздействия на растительный комплекс. Одним из перспективных методов воздействия на растительную биомассу является взрывной автогидролиз [1, 2].

С применением технологии взрывного автогидролиза из побочных продуктов растительного происхождения нами были получены и исследованы композиционные строительные материалы [3, 4], стимуляторы роста растений [5, 6].

Предварительные исследования показали, что продукты взрывного автогидролиза на основе данных компонентного состава и питательности могут быть использованы также для получения кормовых добавок сельскохозяйственных животных [7].

В работе в качестве кормовой добавки использованы продукты обработки лузги овса посевного, *Avena Sativa*, полученные обработкой в аппарате взрывного автогидролиза в течение 10 минут при давлении водяного пара 1,2 МПа. Методика получения кормовой добавки приведена в работе [7].

Объектом данного исследования служили телята в возрасте одного месяца ПЗ «Комсомольское» Павловского района Алтайского края, отделение Урожайное. В исследованиях было сформировано три группы животных: одна контрольная и две опытные, по 10 голов в каждой, согласно схеме, представленной в таблице 1.

Таблица 1

Схема проведения физиологических исследований кормовых добавок

Группа телят	Количество голов	Продолж. опыта, сутки	Характеристика кормления
Контрольная	10	45	Основной рацион
Опытная группа 1	10	45	Основной рацион и кормовая добавка, полученная из измельченной соломы пшеницы, предварительно обработанной водным раствором соляной кислоты
Опытная группа 2	10	45	Основной рацион и кормовая добавка, полученная из обработанных по технологии взрывного автогидролиза оболочек овса

Телята контрольной группы получали основной хозяйственный рацион; опытной группы – основной рацион вместе с кормовой добавкой.

Для первой опытной группы в качестве кормовой добавки использовали кормовую добавку, полученную из измельченной соломы пшеницы, предварительно обработанной водным раствором соляной кислоты [8]. Для второй опытной группы в качестве прикормки использовали кормовую добавку, полученную нами из обработанных по технологии взрывного автогидролиза оболочек овса. Животные контрольной и опытных групп находились в одинаковых условиях содержания. Кормление их осуществлялось по распорядку дня, принятому в хозяйстве. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2

Сравнение зоотехнических показателей контрольной и опытных групп кормления телят

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа 1	Опытная группа 2
Сохранность, т.е. жизненность, молодняка, %	100	100	100
Расход кормовой добавки на кг массы тела, г/кг	-	0,1	0,1
30 суток			
Прирост живой массы, абсолютный, г	993	1043	1206
Прирост живой массы, относительный, %	21,4	21,8	22,5
45 суток			
Прирост живой массы, абсолютный, г	893	901	924
Прирост живой массы, относительный, %	41,2	41,3	41,9

Как видно из результатов исследований, представленных в таблицах, кормовая добавка, полученная из обработанных по технологии взрывного автогидролиза оболочек овса посевного, способствует увеличению прироста живой массы телят по сравнению с использованием традиционных кормов в среднем на 22,5 % по сравнению с 21,4 % при продолжительности кормления 30 суток, на 41,9 % по сравнению с 41,2 % при продолжительности кормления 45 суток, а также по сравнению с использованием кормовой добавки, полученной из соломы пшеницы, в среднем на 22,5 % по сравнению с 21,8 % при продолжительности кормления 30 суток и на 41,9 % по сравнению с 41,3 % при продолжительности кормления 45 суток.

Таким образом, с использованием технологии взрывного автогидролиза можно получать экологически безопасную кормовую добавку для животных без использования дополнительных химических компонентов за более короткий промежуток времени, и обеспечивающую при применении в животноводстве повышение зоотехнических показателей.

Библиографический список

1. Asada C., Sasaki C., Uto Y., Sakafuji J., Nakamura Y. Effect of steam explosion pretreatment with ultra-high temperature and pressure on effective utilization of softwood biomass // *Biochemical Engineering Journal*. 2012. Vol. 60. P. 25–29. DOI:10.1016/j.bej.2011.09.013.
2. Гравитис Я.А. Теоретические и прикладные аспекты метода взрывного автогидролиза растительной биомассы // *Химия древесины*, 1987. №5. С. 321.
3. Ефанов М.В., Коньшин В.В., Сеницын А.А. Получение композиционных материалов из торфа и древесины методом взрывного автогидролиза // *Журнал прикладной химии*. 2019. Т. 92. Вып. 1. С. 49–53. DOI: 10.1134/S0044461819010067.
4. Беушев А.А., Скурыдин Ю.Г., Скурыдина Е.М. и др. Химическая модификация оболочек овса посевного, *Avena Sativa*, методом взрывного автогидролиза // *Ползуновский вестник*. 2016. №2. С. 177–180.
5. Феллер Е.Ю., Копылова О.И., Авдеева Д.А. и др. Зависимость ростостимулирующих свойств от химического состава оболочек овса, лузги подсолнечника и торфа // *Ползуновский вестник*. 2019. №1. С. 128–131. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2019.01.023.
6. Коньшин В.В., Феллер Е.Ю. Получение удобрений, стимуляторов роста и кормовых добавок на основе отходов сельского хозяйства, деревообработки // *От биопродуктов к биоэкономике : материалы II межрегиональной научно-практической конференции*. 2018. С. 113–116.
7. Коньшин В.В., Крахмалев В.А., Афаньков А.Н. и др. Кормовые добавки из лузги овса и подсолнечника, полученные с использованием метода взрывного автогидролиза // *Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья : материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием*. Барнаул, 2020. С. 317–318.
8. Способ переработки грубого растительного сырья на корм: пат. 2292158 Российская Федерация, МПК А23К1/12, опубл. 27.01.2007 / Шекуров В.Н. Бюл. № 3.

УДК 661.728.855

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА АЦИЛИРОВАНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ КАПРОЛАКТАМОМ

Т.В. Никитина, П.В. Комаров, А.И. Шалимова, А.В. Протопопов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

В статье рассмотрены закономерности взаимодействия целлюлозы с капролактамом в среде толуола и муравьиной кислоты, изучены кинетические закономерности реакции ацилирования. В ходе работы получены сложные эфиры целлюлозы с аминокaproновой кислотой со степенью замещения, близкой к 2,5. Кинетика процесса ацилирования рассчитана с применением уравнения Ерофеева-Колмогорова. На основании полученных констант скорости были определены параметры переходного комплекса. Энтропия активации составляет $-229,5$ Дж/моль $\cdot$ К, энтальпия активации $28,4$ кДж/моль. Образование сложных эфиров подтверждено методом ИК-спектроскопии.

Ключевые слова: ацилирование, аминокaproнаты целлюлозы, сложные эфиры целлюлозы.

Сложные эфиры целлюлозы до настоящего времени не потеряли своей актуальности и находят широкое применение в промышленности. Только за последние десятилетия появилась большая группа сложных эфиров целлюлозы, при получении которых были реализованы различные подходы, что позволило создать новые практически значимые сорбционно-активные материалы; материалы медицинского назначения с пролонгированным эффектом действия лекарственных препаратов; волокна – биокатализаторы, содержащие иммобилизованные ферменты; различные добавки для строительных смесей, повышающие показатели готовых материалов; текстильные материалы из целлюлозных волокон с высокими эластическими характеристиками.

Наряду с этим, анализ литературных данных свидетельствует о перспективности синтеза сложных эфиров целлюлозы непосредственно из древесины. Преимущества такого подхода связаны с упрощением процесса производства сложных эфиров целлюлозы путём исключения стадии получения целлюлозы из древесины. Данное обстоятельство позволит уменьшить выброс в окружающую среду вредных отходов варочного производства, а также минимизировать потери растительного сырья.

Целлюлоза является уникальным исходным материалом для химической модификации гидроксильных групп и соседнего атома углерода. Доказано, что аминокеллюлозы являются предпочтительным модифицируемым полимером для биофункциональности поверхностей материалов. Аминокеллюлозы обладают самосборными свойствами и могут образовывать однослойные композиты на различных материалах подложки.

Аминокеллюлозы представляют собой полусинтетические производные полисахаридов, функционализированные аминокгруппами. Этот класс полимеров на биологической основе обладает рядом интересных свойств для передовых применений, таких как потенциальная антимикробная активность и выраженное сродство поверхности к различным материалам.

В ходе проведенной работы нами изучен процесс ацилирования целлюлозы капролактамом с целью получения производных целлюлозы с аминокaproновой кислотой. Реакцию проводили в гетерогенной среде толуола при $30\text{--}60$ °С.

В ходе проделанных работ было проведено взаимодействие целлюлозы с капролактамом в среде толуола и муравьиной кислоты, при этом кислота играет роль протонного рас-

творителя, а толуол – инертная среда. На первом этапе проводили набухание целлюлозы в толуоле и впоследствии добавляли муравьиную кислоту и капролактамы.

Муравьиная кислота способствует активации целлюлозы, а также воздействует на капролактамы и разрушает его циклическую структуру с образованием радикала аминокaproновой кислоты. В дальнейшем полученный радикал аминокaproновой кислоты реагирует с гидроксильными группами целлюлозы с образованием сложных эфиров. Полученные продукты высушивались в сушильном шкафу до постоянной массы, отмывались от непрореагировавших остатков капролактама и снова высушивались до постоянной массы. Впоследствии полученные продукты анализировались на содержание связанной кислоты с применением потенциометрического титрования и рассчитывали степень замещения в полученных сложных эфирах целлюлозы (рис. 1).

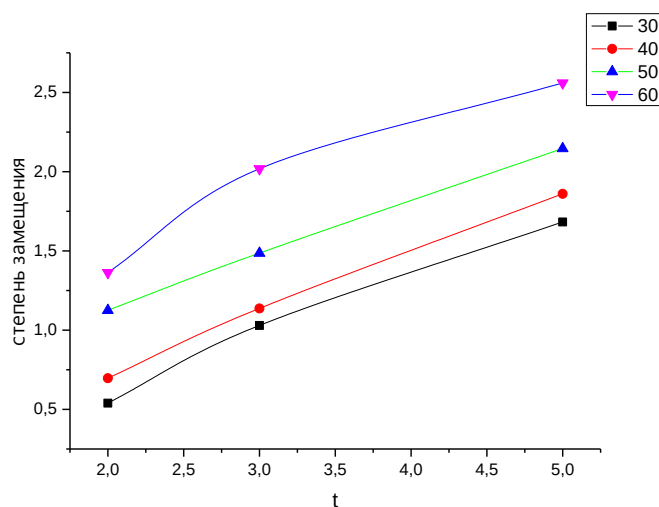


Рис. 1. Степень замещения в полученных продуктах при различных температурах в зависимости от продолжительности синтеза

С ростом температуры и продолжительности синтеза наблюдается увеличение степени замещения в целлюлозе. При максимальных времени и температуре синтеза получены практически полностью замещенные сложные эфиры целлюлозы.

Анализ полученных продуктов методом ИК-спектроскопии показал образование сложноэфирной связи, что подтверждает взаимодействие целлюлозы с капролактамом.

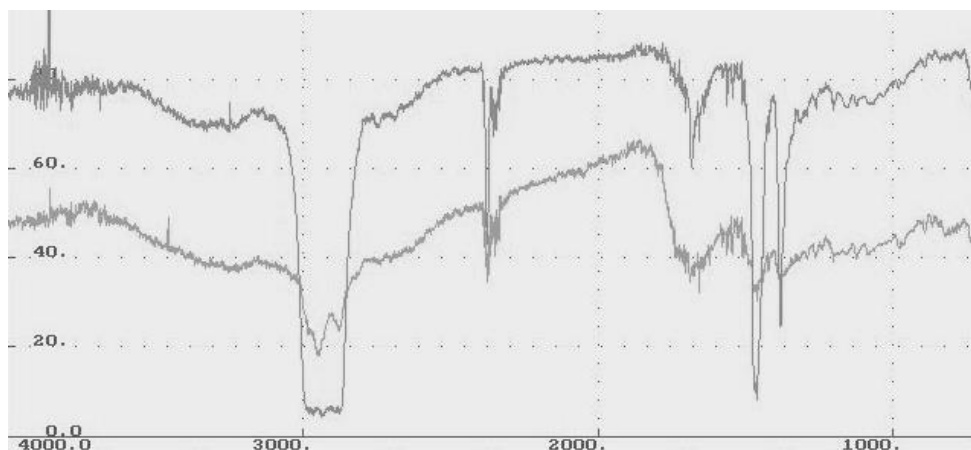


Рис. 2. ИК-спектр полученных продуктов

Влияние температуры на скорость реакции проявляется в увеличении константы скорости. Поскольку реакция ацилирования целлюлозы в толуоле является гетерогенным процессом, расчет кинетических закономерностей проводился с применением уравнения Ерофеева-Колмогорова, хорошо зарекомендовавшем себя для реакций растительного сырья.

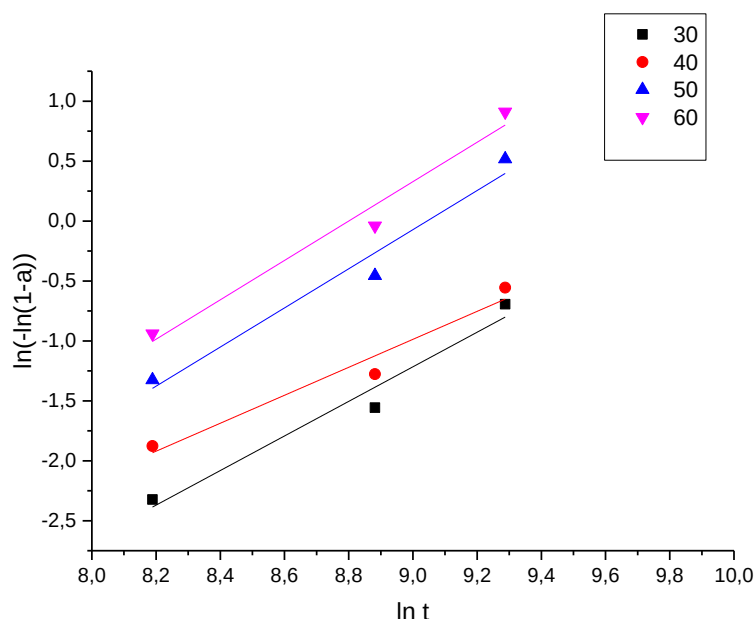


Рис. 3. Кинетические анаморфозы ацилирования целлюлозы капролактамом

Из построенных кинетических анаморфоз (рис. 3) были рассчитаны константы скорости реакции ацилирования целлюлозы и, впоследствии, рассчитаны кинетические параметры ацилирования с применением уравнения Эйринга. Энтропия активации составляет -229,5 Дж/моль*К, энтальпия активации 28,4 кДж/моль.

Проведенные исследования показали возможность активации капролактама муравьиной кислотой в среде толуола для взаимодействия с целлюлозой с получением сложных эфиров. Полученные кинетические закономерности выявили влияние диффузии на процесс ацилирования в большей степени, по сравнению со скоростью образования сложноэфирной связи.

Библиографический список

1. Никитина Т.В., Шалимова А.И., Протопопов А.В. Ацилирование целлюлозы капролактамом при различных температурах // Приднепровский научный вестник. 2020. Vol. 3. № 11. С. 17–19.
2. Никитина Т.В., Протопопов А.В. Изучение взаимодействия целлюлозы с капролактамом // Материалы XVI Международной научно-практической конференции «Наука и инновация – 2020». 2020. Вып. 6. С. 37–39.
3. Никитина Т.В., Протопопов А.В. Получение производных целлюлозы с капролактамом // Сборник материалов XVIII Международной научно-практической конференции. Кемерово, 2020.

УДК 66.083.3:66.014

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА БИОМАССЫ ШЕЛУХИ ОВСА С ПОМОЩЬЮ АВТОГИДРОЛИЗА

И.Н. Павлов, Г.Ф. Миронова

*Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения
Российской академии наук, Бийск, Россия*

Проведена предварительная обработка автогидролизом биомассы шелухи овса при изменении температуры процесса в интервале 160–220 °С, времени обработки в диапазоне 5–60 мин и гидромодуле обработки 1:10. Изменение жесткости условий обработки при росте температуры и увеличении времени обработки хорошо коррелируется с изменением химического состава твердой фазы и накоплением редуцирующих веществ после ферментативного гидролиза. С ростом температуры обработки до 180 °С наблюдается снижение концентрации гемицеллюлоз в твердой фазе до 5,3%. Удаление большей части гемицеллюлоз при температуре обработки 180 °С и времени обработки 25 мин обеспечивает доступ ферментных препаратов к поверхности целлюлозы и достижение максимального накопления редуцирующих веществ до 55,3% в результате ферментативного гидролиз. Повышение температуры и времени обработки приводит к повторной полимеризации лигнина на поверхности целлюлозы и повышением его концентрации в твердой фазе. В результате действие ферментов ограничивается, что и приводит к снижению выхода редуцирующих веществ до уровня 44,5%.

Ключевые слова: шелуха овса, предварительная обработка, автогидролиз, гидротермическая обработка, целлюлоза, ферментативный гидролиз.

Введение. Лигноцеллюлозная сельскохозяйственная биомасса является перспективным возобновляемым ресурсом для организации производств биотоплива и химической продукции на основе целлюлозы [1–3]. К преимуществам использования в качестве сырья отходов сельского хозяйства, например, шелухи овса, можно отнести ещё низкую стоимость [4, 5]. Целлюлоза и гемицеллюлозы, входящие в состав шелухи, в результате гидролиза образуют сахара, которые могут использоваться для синтеза ценных продуктов. Среди технологий, доступных для производства сахаров из лигноцеллюлозной биомассы, наиболее перспективным для крупномасштабного применения является ферментативный гидролиз. Для повышения эффективности ферментативного гидролиза необходимо использовать процесс предварительной обработки сырья, способный разрушать или разрыхлять лигноцеллюлозную структуру биомассы [6–8]. В данной работе в качестве способа предварительной обработки биомассы шелухи овса рассматривается метод гидротермической обработки (автогидролиза). В условиях обработки вода действует как растворитель и катализатор, обеспечивающий высвобождение органических кислот из биомассы, которые разрушают структуру.

Изучено влияния температуры обработки и времени выдержки на изменение состава твердых фракций биомассы. По результатам ферментативного гидролиза твердой фракции обработанной биомассы проведена сравнительная оценка по накоплению редуцирующих веществ с гидролизом необработанной биомассы шелухи овса.

Описание методов и методик проводимого исследования. Шелуха овса однородна по составу и имеет размер частиц до 10 мм, химический состав: 49,3% целлюлозы, 31,8% гемицеллюлоз и 16,3% лигнина. Предварительная обработка проводится на универсальной термобарической установке [9]. Шелуха овса смешивалась с подготовленной очищенной во-

дой в соотношении жидкость-твердое тело 10:1 и помещалась в реактор. Создавалось избыточное давление 30 бар в атмосфере CO₂ для поддержания воды в жидком состоянии при высоких температурах. Биомасса шелухи овса подвергалась обработке в температурном диапазоне 160–220 °С с варьированием времени пребывания от 5 до 60 мин. После реактор охлаждался до температуры менее 100 °С, и реакционная масса разделялась на жидкую и твердую фракции. Промытая твердая фракция сушилась до влажности 7–10%.

Химический состав образцов сырья и субстратов определялся по общепринятым, регламентируемым ГОСТами, и специальным методам для анализа растительного сырья. Массовая доля целлюлозы по Кюршнеру оценена согласно методике [10], массовая доля гемицеллюлоз определена спектрофотометрическим методом с использованием раствора орсиана [11], кислотонерастворимого лигнина в соответствии с методикой [12], зольность определена путем сжигания субстрата при 600 °С в течение трех часов [13].

Для гидролиза использовались ферментные препараты «Целлолюкс-А» (ООО ПО «Сиббиофарм», Россия) и «УльтрафлоКоре» («Novozymes A/S», Дания) [14]. Ферментативный гидролиз проводился в конических колбах объемом 0,5 л с использованием горизонтального перемешивающего устройства ЭКРОС ПЭ-6410 с нагревом («Экохим», Россия) при следующих условиях: среда – 0,1 М ацетатный буферный раствор; концентрация субстрата в среде 30 г/л; концентрация Целлолюкс-А 0,054 г/г субстрата, Ультрафло Коре 0,165 г/г субстрата; объем реакционной массы 0,150 л; активная кислотность буферного раствора 4,78 ед. pH; постоянное перемешивание 120–100 об/мин; температурный режим 46±2 °С; продолжительность процесса – 72 ч.

Для анализа сахаров образцы гидролизатов центрифугировались с помощью центрифуги MiniSpin 5452 («Eppendorf A.G.», Германия) 5 мин при 10000 об/мин. Концентрация редуцирующих веществ (РВ) в супернатанте определялась в пересчете на глюкозу с помощью спектрофотометра Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США) при длине волны 530 нм с применением реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания) [15].

По результатам анализа рассчитывался конечный выход РВ от массы субстрата по формуле:

$$\eta_c = \frac{C_K}{C_C} \cdot 0,9 \cdot 100,$$

где η_c – выход РВ от массы субстрата, %; C_K – концентрация РВ в гидролизате, г/л; C_C – концентрация субстрата для ферментативного гидролиза, г/л; 0,90 – коэффициент, обусловленный присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате гидролиза.

Исследования проводились при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, Бийск).

Полученные результаты и их обсуждение. Изменение состава твердых фракций шелухи овса после обработки в зависимости от температуры и времени обработки показано на рисунке 1. С ростом температуры происходит увеличение содержания ионов воды в растворе, в результате чего вода действует как слабый полярный растворитель. Поэтому повышение температуры обработки, в первую очередь, обеспечивает удаление гемицеллюлоз, что отражается на снижении выхода биомассы при среднем времени обработки 25 мин от 66,0% при 160 °С до 38,5% при температуре 220 °С. Концентрация гемицеллюлоз после обработки при 160 °С и выдержке 5 мин сокращается в 2,4 раза относительно начального содержания в нативной биомассе и составляет 13,2%. Значительное снижение концентрации гемицеллюлоз наблюдается при увеличении температуры до 180 °С и времени обработки

до 60 мин и составляет 5,3%. С ростом температуры до 200°C и продолжительности обработки до 60 мин происходит практически полное удаление гемицеллюлоз. При начальной температуре 160 °C происходит незначительное снижение концентрации лигнина до 15,9% относительно исходного содержания лигнина в нативной шелухе овса – 16,3%. С повышением температуры и времени обработки происходит рост концентрации лигнина в твердой фракции. Это связано с протеканием реакции конденсации лигнина на поверхности твердой фракции.

Целлюлоза в меньшей степени подвержена воздействию при гидротермической обработке. В условиях обработки в диапазоне температур 160–180°C ее концентрация в твердой фазе увеличивается относительно снижения концентрации гемицеллюлоз (рис. 1). Повышение температуры свыше 200°C и времени обработки приводит к снижению содержания целлюлозы в твердой фазе до минимального значения, что свидетельствует о гидролизе целлюлозы при ужесточении условий обработки.

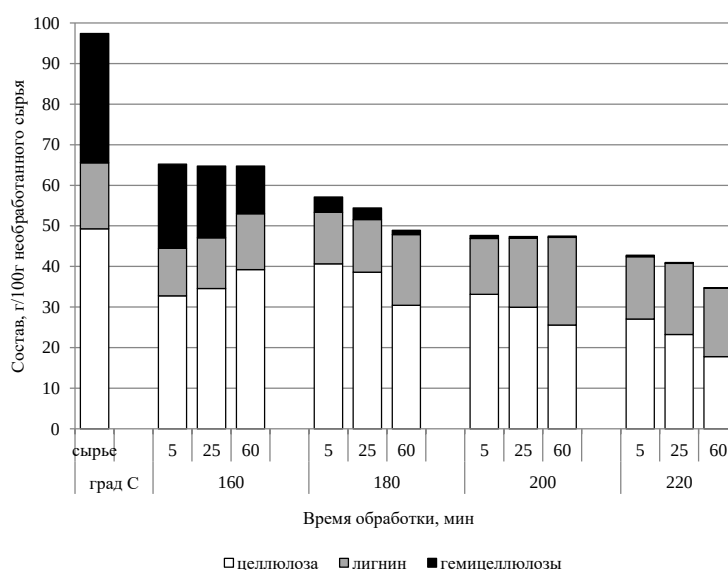


Рис. 1. Состав твердых фракций после предварительной обработки биомассы шелухи овса

Оценку эффективности проведенной обработки проводили по изменению накопления РВ после ферментативного гидролиза твердой фракции. Результаты гидролиза обработанной биомассы сравнивали с результатами гидролиза необработанной биомассы шелухи овса. На рисунке 2 показано изменение выхода РВ в гидролизате в ходе ферментативного гидролиза после обработки биомассы шелухи овса при температурах от 160°C до 220°C при среднем времени выдержки 25 мин.

После обработки при температуре 160 °C в твердом остатке сохраняется большая концентрация гемицеллюлоз (рис. 1), что препятствует доступности поверхности для ферментов. Лигнин сохраняется в полном объеме в твердом остатке, что также препятствует действию ферментов. В результате достигается невысокий выход РВ – 30,5%. Максимальное накопление РВ после ферментативного гидролиза достигается при гидролизе твердого остатка, обработанного при температуре 180°C и времени обработки 25 мин. Накопление РВ составляет 55,3% после 72 ч гидролиза. При этих условиях происходит снижение уровня рН до значения 3,34 и удаление большего количества гемицеллюлоз (рис. 1), что обеспечивает доступность поверхности целлюлозы для комплекса ферментов. Такой рост выхода РВ объясняется уве-

личением доступности целлюлозы при удалении гемицеллюлоз и части лигнина, способствующим повышению пористости биомассы.

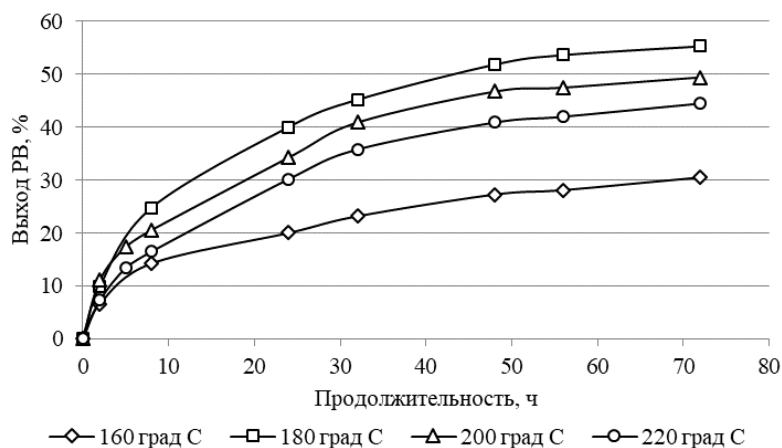


Рис. 2. Изменение выхода редуцирующих веществ в ходе ферментативного гидролиза обработанной биомассы при времени выдержки 25 мин

Повышение температуры с 200 °С до 220 °С, приводит к росту концентрации лигнина в сравнении с обработкой при 180 °С. Увеличение температуры обработки до 220 °С дает значительной накопление лигнина в результате повторной полимеризации лигнина. Этот факт ограничивает действие ферментов и приводит к снижению выхода редуцирующих веществ до уровня 49,4% и 44,5% при гидролизе твердых фракций, обработанных при температурах 200°С и 220°С соответственно. Наилучший результат по накоплению РВ после ферментативного гидролиза получен после обработки биомассы шелухи овса при 180°С при выбранном времени обработки 25 мин. Повышение времени обработки до 60 мин не дает желаемого повышения накопления уровня РВ после гидролиза (рис. 3).

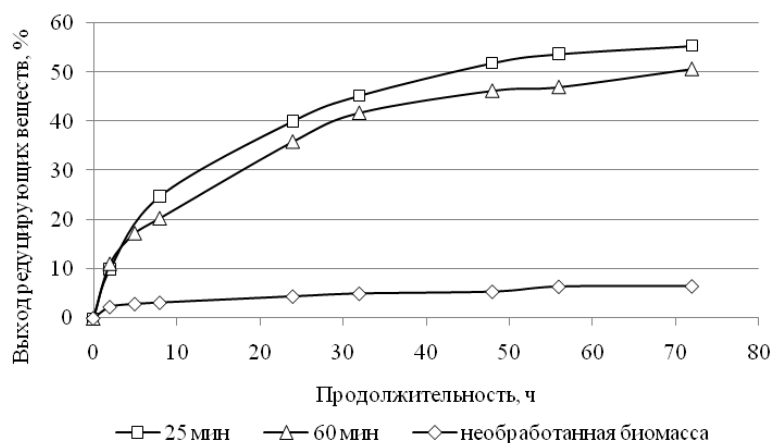


Рис. 3. Изменение выхода РВ в ходе ферментативного гидролиза необработанной биомассы и обработанной при температуре 180°С

Выход РВ снизился до 50,8% в сравнении с выходом 55,3% после обработки в течение 25 мин. На рисунке 3 также приведен график накопления РВ при гидролизе необработанной биомассы шелухи овса. Уровень накопления РВ после 72 ч гидролиза достиг 6,5%. Проведенная гидротермическая обработка биомассы шелухи овса при температуре 180°С и време-

ни выдержки 25 мин позволяет добиться увеличения выхода РВ после ферментативного гидролиза в 8,5 раз по сравнению с гидролизом необработанной биомассы шелухи овса.

Заключение. Рост температуры реакционной массы и времени обработки способствует повышению жесткости условий обработки, в результате чего достигается полное удаление гемицеллюлоз и частичное удаление лигнина. Ферментативный гидролиз твердого остатка после обработки при температуре 180 °С обеспечивает максимальный выход редуцирующих веществ 55,3%, что превышает выход после ферментации необработанной биомассы шелухи овса в 8,5 раза. Повышение температуры свыше 180 °С и времени обработки до 60 мин приводит к ухудшению условий для проведения ферментативного гидролиза. Причиной является снижение доступности поверхности целлюлозы для действия ферментов вследствие протекания реакции конденсации лигнина и осаждения его на поверхность волокна целлюлозы. Этот факт ограничивает действие ферментов и приводит к снижению выхода редуцирующих веществ до уровня 49,4% и 44,5% при гидролизе твердых фракций, обработанных при температурах 200 °С и 220 °С соответственно.

Исследование выполнено в рамках госзадания ИПХЭТ СО РАН «Фундаментальные основы создания интегрированной технологии переработки легковозобновляемого непищевого растительного сырья в востребованные экономикой РФ продукты» с номером госрегистрации проекта 121061500030-3

Библиографический список

1. Skiba E.A., Budaeva V.V., Baibakova O.V., et al. Dilute nitric-acid pretreatment of oat hulls for ethanol production // Biochemical Engineering Journal. 2017. Vol. 126. P. 118–125. DOI: 10.1016/j.bej.2016.09.003.
2. Hu F., Ragauskas A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry // Bioenergy Research. 2012. N. 5. P. 1043–1066.
3. Миронова Г.Ф., Павлов И.Н., Кащеева Е.И. Исследование возможности повышения выхода биоэтанола из продукта щелочной делигнификации плодовых оболочек овса с применением метода подпитки // Ползуновский вестник. 2018. № 1. С. 111–116. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.01.021.
4. Demirel F., Germec M., Coban H.B., et al. Optimization of dilute acid pretreatment of barley husk and oat husk and determination of their chemical composition // Cellulose. 2018. Vol. 25. N 11. P. 6377–6393. DOI: 10.1007/s10570-018-2022-x.
5. Yadav M.P., Hicks K.B., Johnston D.B., et al. Production of bio-based fiber gums from the waste streams resulting from the commercial processing of corn bran and oat hulls // Food Hydrocolloids. 2016. Vol. 53. P. 125–133. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.02.017.
6. Wei-Chien Tu, Jason P. Hallett. Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass // Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry. 2019. Vol. 20. P. 11–17. DOI: 10.1016/j.cogsc.2019.07.004.
7. Makarova E.I., Budaeva V.V. Bioconversion of non-food cellulosic biomass. Part 1 // Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiyai Biotekhnologiya [Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology]. 2016. Vol. 6. N. 2. P. 43–50. DOI: 10.21285/2227-2925-2016-6-2-43-50 (in Russian).
8. Baig K.S., Wu J., Turcotte G. Future prospects of delignification pretreatments for the lignocellulosic materials to produce second generation bioethanol // International Journal of Energy Research. 2019. Vol. 43. P. 1411–1427. DOI: 10.1002/er.4292.

9. Pavlov I.N., Denisova M.N., Makarova E.I., et al. Versatile thermobaric setup and production of hydrotropic cellulose therein // Cellulose Chemistry and Technology. 2015. Vol. 49(9-10). P. 847–852.
10. Kurschner K., Hoffer A. Cellulose and cellulose derivative // Fresenius Journal of Analytical Chemistry. 1993. Vol. 92. № 3. P. 145–154.
11. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М., 1991. 320 с.
12. TAPPI method T222 om-83. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. In: Test methods 1998—1999. Atlanta. TAPPI Press, 1999.
13. TAPPI method T211 om-85. Ash in wood, pulp, paper, and paperboard. In: Test methods. Atlanta. TAPPI Press, 1985.
14. Mironova G.F., Skiba E.A., Kukhlenko A.A. Preparing Nutrient Media from Lignocellulose: Optimizing the Composition of a Multienzyme Compound // Catalysis in Industry. 2020. Vol. 12. № 2. P. 162–168. DOI: 10.1134/S2070050420020063.
15. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Analytical Chemistry, 1959. Vol. 31. N 3. P. 426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.

УДК 661.728.855

КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ АЦИЛИРОВАНИЯ ДРЕВЕСИНЫ АДИПИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

А.В. Протопопов, Д.Е. Штепенко, А.Н. Гречко

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

В статье рассмотрены закономерности ацилирования древесины адипиновой кислотой и изучены кинетические закономерности реакции ацилирования адипиновой кислотой. В ходе работы получены адипинаты целлюлозы из древесины осины со степенью замещения 2. Кинетика процесса ацилирования рассчитана с применением Ерофеева-Колмогорова. На основании полученных констант скорости были определены параметры переходного комплекса. Энтропия активации составляет $-394,25 \text{ Дж/моль} \cdot \text{К}$, энтальпия активации $23,0 \text{ кДж/моль}$. Сравнение с энергией активации, вычисленной с применением уравнения Аррениуса, которая составляет $20,4 \text{ кДж/моль}$, показывает, что реакция протекает практически по простому механизму и влияние переходного комплекса на скорость процесса незначительно. Образование сложных эфиров подтверждено методом ИК-спектроскопии.

Ключевые слова: ацилирование, древесина, адипинаты целлюлозы, сложные эфиры целлюлозы.

Рынок биопластика и биодобавок, безусловно, перспективен и быстро развивается в последнее время. Это связано с растущей осведомленностью о негативном влиянии пластика на окружающую среду, что повышает спрос на рынке на различные продукты, произведенные из биопластика. Снижение уровня выброса двуокиси углерода в атмосферу, нормализация динамики экосистем и сокращения отходов являются главным преимуществом пластмасс биологического происхождения. В связи с этим актуальным является вопрос развития технологии получения биопластмасс путем модификации целлюлозы и целлюлозо-лигнинсодержащих отходов [1].

Древесные материалы, которые являются наиболее распространенным источником целлюлозы, имеют прочную сеть микрофибрилл, которая придает целлюлозе ее естественную прочность и реакционную способность [2]. Однако чистая целлюлоза не поддается прямой переработке при литье под давлением. Одно из уникальных свойств целлюлозы заключается в том, что она химически адаптирована для выполнения необходимых функций, а также обладает термопластичностью. Поведение термопласта целлюлозы может быть улучшено, например, путем использования длинноцепочечной этерификации. Длинноцепочечные эфиры целлюлозы с длиной цепи жирных заместителей $\geq C6$ (гексаноат целлюлозы) представляют собой материалы на биологической основе из возобновляемых материалов. Более того, уже имеются коммерчески доступные ацетат целлюлозы с более короткой длиной цепи (CA), пропионат ацетата целлюлозы (CAP) и бутират ацетата целлюлозы (CAB), которые можно подвергать термопластической переработке [3].

В ходе проведенной работы нами было исследовано взаимодействие древесины осины с адипиновой кислотой в среде толуола. Реакцию проводили в течении 1–5 часов при температурах 30–60 °C.

В качестве ацилирующего агента была выбрана адипиновая кислота, которая является двухосновной карбоновой кислотой. Продукты взаимодействия с данной кислотой являются перспективными материалами с сетчатой структурой или, в зависимости от степени взаимодействия, сложными эфирами с свободной ионной группой. По завершению процесса были получены продукты, плохо смачиваемые водой и хорошо взаимодействующие с толуолом.

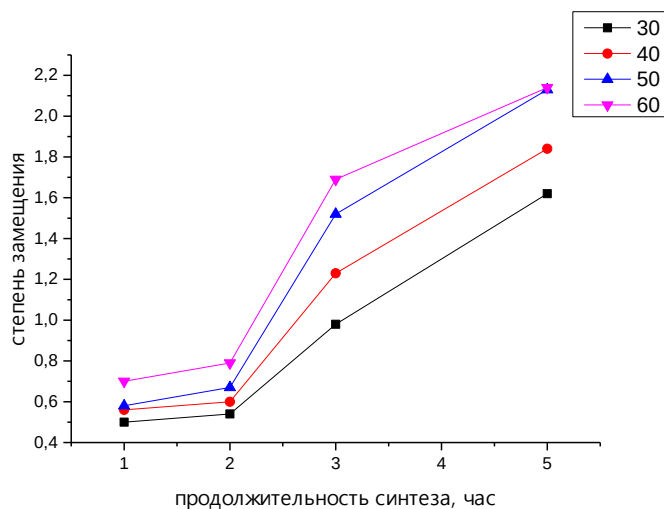


Рис. 1. Степень замещения в полученных продуктах при различных температурах

Исследование полученных продуктов методом ИК-спектроскопии (рис. 2) показало образование сложноэфирных связей, при этом в продукте взаимодействия наблюдается уменьшение полосы поглощения в области 3600 см^{-1} в результате уменьшения количества свободных гидроксильных групп и увеличение полосы поглощения в области 1740 см^{-1} , характерной для колебаний сложноэфирной группы, что также свидетельствует о протекающем взаимодействии.

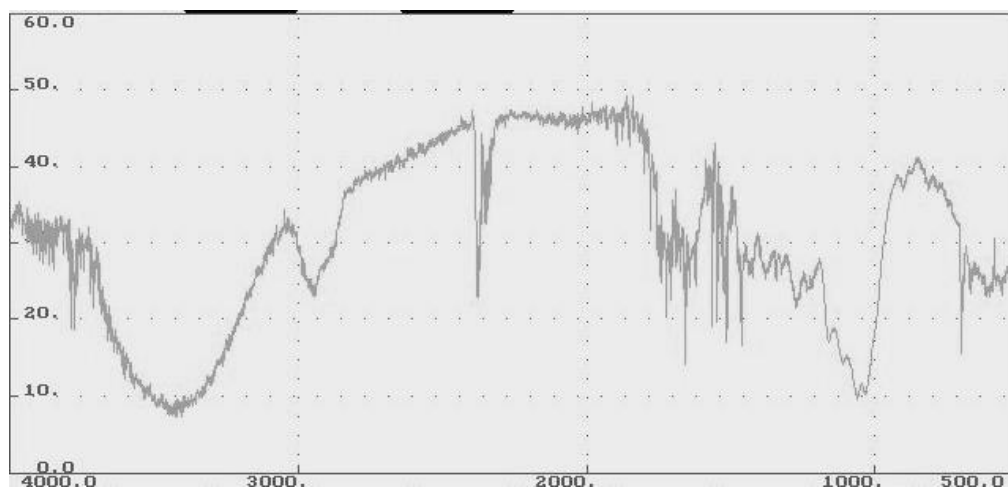


Рис. 2. ИК-спектр продуктов взаимодействия древесины при 60 °С

Влияние температуры на скорость реакции проявляется в увеличении константы скорости. Поскольку реакция ацилирования древесины адипиновой кислотой в толуоле является гетерогенным процессом, расчет кинетических закономерностей проводился с применением уравнения Ерофеева-Колмогорова, хорошо зарекомендовавшем себя для реакций растительного сырья.

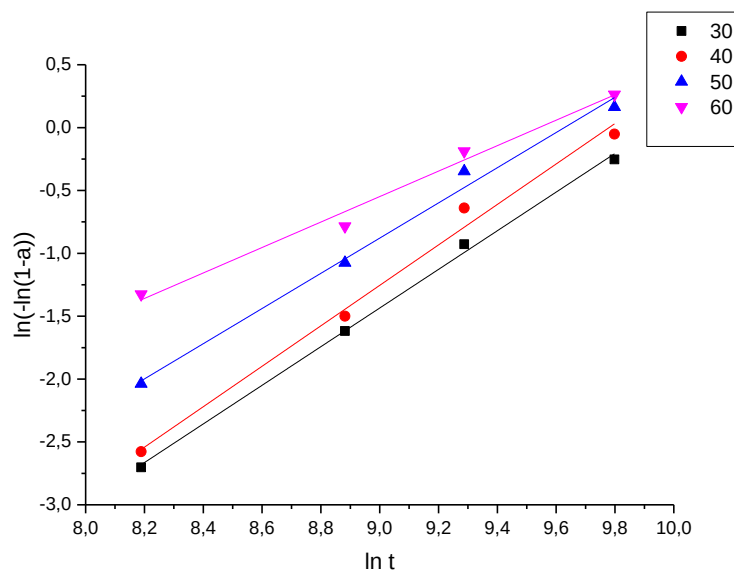


Рис. 3. Кинетические анаморфозы ацилирования древесины адипиновой кислотой

Из построенных кинетических анаморфоз (рис. 3) были рассчитаны константы скорости реакции ацилирования древесины и впоследствии рассчитаны кинетические параметры ацилирования с применением уравнения Эйринга. Энтропия активации составляет -394,25 Дж/моль*К, энтальпия активации 23,0 кДж/моль. Сравнение с энергией активации, вычисленной с применением уравнения Аррениуса, которая составляет 20,4 кДж/моль, показывает, что реакция протекает практически по простому механизму, а влияние переходного комплекса на скорость процесса незначительно.

Полученные данные показывают возможность взаимодействия древесины с дикарбоновыми кислотами. Полученные продукты обладают термопластичностью и высокими гидро-

фобными свойствами. Образование сложных эфиров подтверждено методом ИК-спектроскопии. Расчет кинетических закономерностей реакции ацилирования показал ее протекание по сложному механизму с образованием промежуточных продуктов, а также большее влияние диффузии компонентов, в частности реакционных групп, по сравнению со скоростью процесса ацилирования.

Библиографический список

1. Vaca-Garcia L.C., Borredon M.E. Solvent-free fatty acylation of cellulose and lignocellulosic wastes. Part 2: reactions with fatty acids // *Bioresource Technology*. 1999. Vol. 70. Iss. 2. P. 135–142.
2. Babu R.P., OConnor K., Seeram R. Current progress on bio-based polymers and their future trends // *Prog. Biomater.* 2013. № 2. P. 2–16. DOI: 10.1186/2194-0517-2-8.
3. Edgar K.J., Buchanan C.M., Debenham J.S., Rundquist P.A., Seiler B.D., Shelton M.C., Tindall D. Advances in cellulose ester performance and application // *Prog. Polym. Sci.* 2001. №. 26. P. 1605–1688. DOI: 10.1016/S0079-6700(01)00027-2.

УДК 664.959.5

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ДЕТОКСИКАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ ПРИ БИОКОНВЕРСИИ

Н.А. Сидорова, Н.А. Чечкова, М.Э. Бадалов

Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

В статье представлены результаты оценки степени детоксикации мясокостных отходов глубокой переработки рыбы при биоконверсии. С использованием аттестованных методов биотестирования выполнено определение фитотоксичности исходного фильтрационного осадка/шлама и продуктов его биоконверсии: протеиноминеральной и жиросодержащей фракций. В качестве тест-организмов использованы томат *Solanum lycopersicum* и лук *Allium cepa*. Степень фитотоксичности фильтрационного осадка изменялась в диапазоне от 64.49 до 100%. Протеиноминеральная и жиросодержащая фракции не обладали эффектом фитотоксичности, а вызвали стимуляцию развития тест-растений.

Ключевые слова: токсичность, биотестирование, биоконверсия, детоксикация, фильтрационный осадок, *Solanum lycopersicum*, *Allium cepa*.

Введение. Новые тренды в биотехнологии во многом связаны с решением кризисных экологических и экономических ситуаций, исключая направленную утилизацию ценных неиспользованных или недоиспользованных органических отходов. В рыбной отрасли это вторичное производственное сырьё, которое после рекуперации превращается в фильтрационные осадки, или шламы. Учитывая ценность продуктов глубокой переработки мясокостных рыбных отходов, актуальными считаются технологии микробиологической трансформации фильтрационных осадков для направленного обогащения их белковыми или жиросодержащими фракциями с последующим использованием в производстве продуктов фармацевтики и косметики, кормов, кормовых и пищевых добавок или органоминеральных

удобрений для сельскохозяйственных культур. Необходимость в постоянной оптимизации технологий биоконверсии акцентируется в правовых документах (Федеральный закон № 89-ФЗ «Об отходах производства и потребления»), где регламентируется их повторное применение по прямому назначению (рециклинг), возврат в производственный цикл после специальной обработки (регенерация), извлечение компонентов с полезными свойствами для целевого назначения (рекуперация). В этом контексте отходы рыбоводства являются уникальными натуральными продуктами и представляют интерес из-за содержания большого спектра питательных веществ, в том числе витаминов А и D, омега-3, эйкозапентаеновой (ЕРА) и докозагексаспировой (DHA) жирных кислот [1, 7], белковых продуктов (аминокислот, ди-, три-, и полипептидов), гормонов (инсулина, кортизола), коллагена, желатина и других жизненно необходимых соединений [4]. Перечисленные продукты имеют мировое признание и широкое практическое применение в различных отраслях промышленности.

Фильтрационные осадки и шламы образуются после сепарации вторичного рыбного мясокостного сырья. По агрегатному состоянию они представляют собой пасты и, как правило, используются в зависимости от источников образования и направления применения. При их накоплении в почве и последующем разложении часто формируются интермедиаты микробного происхождения, вредные контаминанты, содержащие токсичные азотсодержащие соединения сложного химического состава, соли тяжелых металлов и др., способные при определенных условиях вызывать необратимые изменения качества окружающей среды [5]. Необходимо отметить, что комплексные методы химикоаналитического контроля и регламентированные санитарно-гигиенические нормативы (ПДК – предельно допустимые концентрации и ОДК – ориентировочно допустимые концентрации) не всегда показывают истинное присутствие и количество подобных загрязнителей, что не позволяет объективно оценить реальную угрозу токсичных компонентов в составе органических отходов и продуктов их глубокой переработки. Так, при сравнительной оценке показатели нормативов ОДК и ПДК могут не совпадать, что объясняют, например, связыванием ориентировочно допустимых концентрацией ингредиентов в почве с ее типом или кислотностью [8]. В то же время для пространственного и временного экологического контроля продолжают разрабатываться и активно используются в практике мониторинга различные методы биотестирования, позволяющие получить интегральную токсикологическую оценку зон влияния отходов на природные объекты.

С целью оценки степени детоксикации продуктов сепарации рыбного мясокостного сырья при биоконверсии выполнена серия экспериментов по биотестированию фильтрационного осадка, протеиновоминеральной и жиросодержащей фракций исходного сырья.

Методика исследований. В качестве тест – организмов использованы томаты *Solanum lycopersicum* и лук *Allium cepa*. Токсичность исследуемого жиросодержащего сырья оценивали с помощью экспресс-метода фитоиндикации, который позволяет точно и быстро определить неблагоприятное воздействие исследуемого фактора на основе учета реакции растений на ранних стадиях онтогенеза (корня, проростка) на исследуемый фактор [2, 3]. Эксперименты проведены до и после биоконверсии фильтрационных осадков глубокой переработки рыбы; процесс биоконверсии выполняли под строгим контролем специально разработанной ассоциации микроорганизмов с протеолитической и липолитической ферментативной активностью. Фитотоксичность рассматривали как свойство исследуемого фактора подавлять прорастание семян, рост и развитие высших растений. Фитотоксичными считали факторы, которые ингибируют прорастание семян, развитие проростков и корней на 20% по сравнению с контрольными семенами или проростками и корнями или стимулируют прорастание семян и развитие растений на 30% по сравнению с контролем [6]. Для определения фитотоксичности использовали по 30 семян испытываемых растений: сорт томата «Изобильный F1» раннего срока со-

зрелания – *Solanum lycopersicum* однолетнее или многолетнее травянистое растение, вид рода Паслён *Solanum* семейства Паслёновые *Solanaceae*; лук сорт «Одинцовец» – многолетнее травянистое растение, вид рода Лук *Allium*, семейства Луковые *Alliaceae*. Перечисленные сорта растений относятся к модельным тест-объектам поскольку обладают повышенной чувствительностью к изменению факторов окружающей среды и позволяют за короткий срок по специфическим тест-откликам оценить факт фитотоксичности в условиях лабораторного эксперимента. Оценку всхожести семян выполняли согласно методическим указаниям Межгосударственного стандарта семян сельскохозяйственных культур; Методы определения всхожести /Agricultural seeds. methods for determination of germination. Для изучения токсического эффекта, исследуемого субстрата отбирали по 30 семян каждого вида растения. Оценку степени прорастания и развития семян в условиях эксперимента выполняли в стерильных условиях во влажной камере, в которой растение изолировано от внешней среды и посторонних микроорганизмов (рис. 1).



Рис. 1. Эксперимент по фитотоксичности фильтрационных осадков во влажной камере

Фитотоксичность испытывали на нативном субстрате, без разбавления и с разбавлением дистиллированной водой в соотношении 1:1, 1:5, 1:9. В качестве контроля использовали семена томата и лука, обработанные стерильной дистиллированной водой.

Степень фитотоксичности рассчитывали по изменению длины 3-дневных корешков и 6-дневных проростков тест-растения по отношению к контролю, выраженную в процентах. Для расчета фитотоксичности (Ф) использовали формулу:

$$\Phi = \frac{\text{длина ростка в контроле} - \text{длина ростка в опыте}}{\text{длина ростка в контроле}} \times 100, \%$$

Расчет выполняли по средним данным измерений через 3, 6 и 9 суток. Полученные данные интерпретировали согласно оценке фитотоксичности по 4 группам: <20% – фитотоксичность не проявляется; 20–40% – слабая фитотоксичность; 40–60% – средняя фитотоксичность; 60% – сильная фитотоксичность.

Обсуждение результатов. Результаты экспериментов по фитотоксичности исходного фильтрационного осадка представлены на гистограммах с группировкой, предназначенных для сравнения значений по нескольким категориям (рис. 2, 3). Во всех вариантах эксперимента до биоконверсии выявлено сильное ингибирование развития растений в присутствии исследуемого субстрата. Подавление развития корней и стеблей лука и томата в опыте превышало 60% (64.49 – 100%) по сравнению с контрольными растениями. При разведении исходного сырья в 5 и 9 раз эффект угнетения несколько снижался и в варианте с томатом полученные результаты можно интерпретировать как «слабое угнетение» и «среднее угнетение».

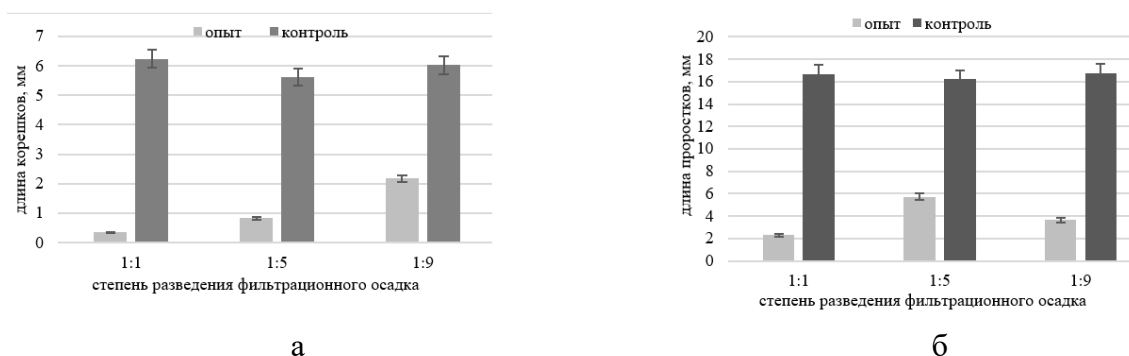


Рис. 2. Изменение длины корешков (а) и проростков (б) *Allium cepa* в опыте и контроле до биоконверсии фильтрационного осадка

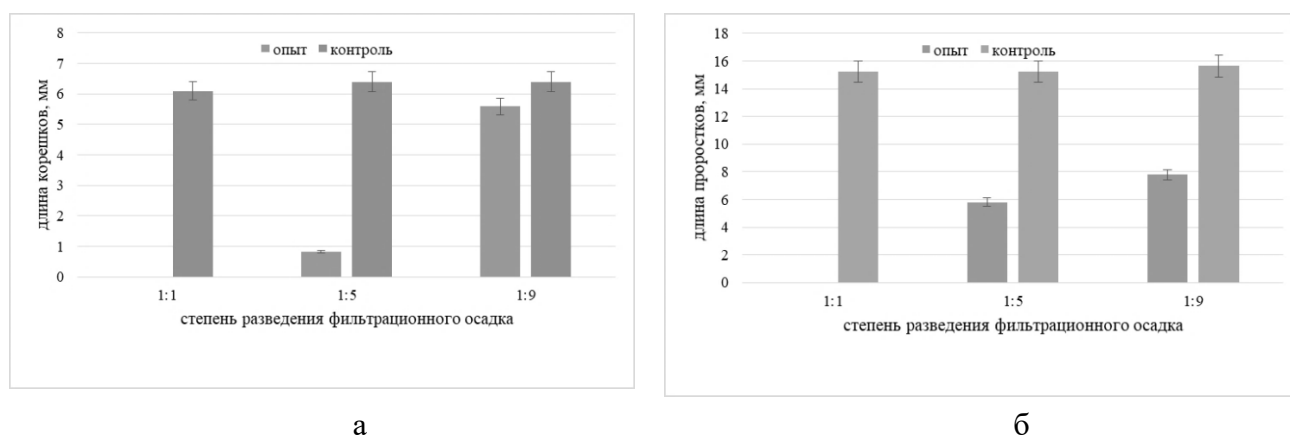


Рис. 3. Изменение длины корешков (а) и проростков (б) *Solanum lycopersicum* в опыте и контроле до биоконверсии фильтрационного осадка

Микробную биоконверсию фильтрационного осадка выполняли в присутствии протеолитических и липолитических бактерий родов *Bacillus*, *Clostridium* и *Serratia*. Оценку технологической значимости выделенных культур проводили заранее по метаболической активности и ростовым характеристикам. Установлено, что выбранные для биоконверсии культуры обладают высокой удельной скоростью роста в среде культивирования и способны достигать высоких значений оптической плотности культурального раствора (OD – 1.14 е.о.п.) обладают также сродством к углеродным энергетическим субстратам; устойчивы к собственным продуктам метаболизма и условиям культивирования; имеют свойства фильтруемости и се-

парируемости, факторы вирулентности (токсигенность, ферменты агрессии) не содержат. В результате выполненной биоконверсии фильтрационного осадка получены два продукта – протеиноминеральная фракция (ПМФ) и жирнокислотная фракция (ЖКФ). Результаты экспериментов по фитотоксичности продуктов биоконверсии фильтрационного осадка представлены на гистограммах (рис. 4, 5).

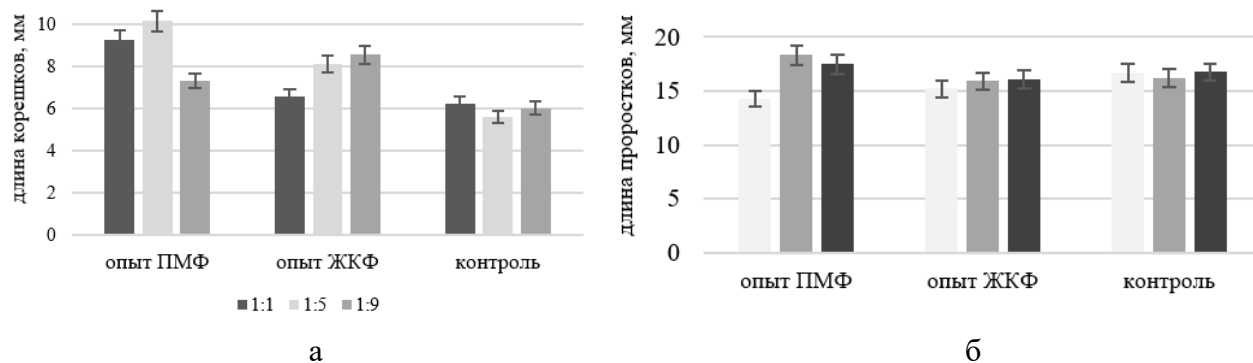


Рис. 4. Изменение длины корешков (а) и проростков (б) *Allium cepa* в опыте и контроле после биоконверсии фильтрационного осадка

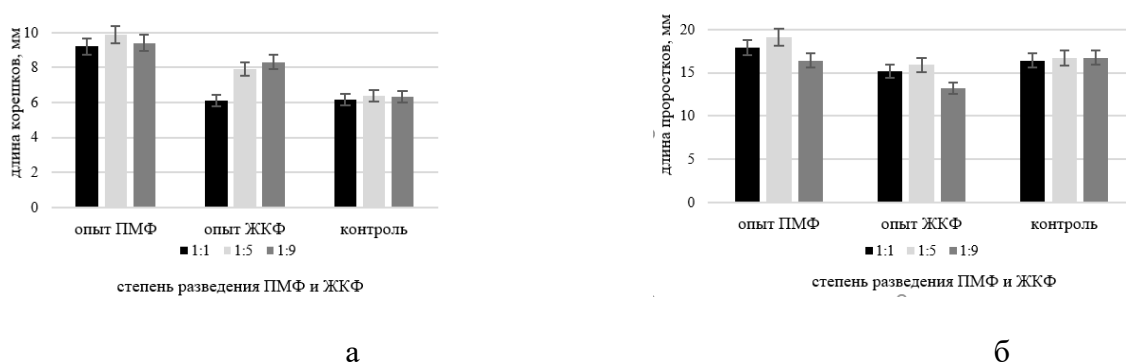


Рис. 5. Изменение длины корешков (а) и проростков (б) *Solanum lycopersicum* в опыте и контроле после биоконверсии фильтрационного осадка

Практически во всех сериях эксперимента с использованием выбранных тест-объектов не было обнаружено феномена фитотоксичности. В вариантах опыта с использованием семян лука и томата при добавлении протеиноминеральной и жирнокислотной фракций в разведениях от 1:1 до 1:9 удалось достичь стимуляцию всхожести и высоты проростков, в среднем, в 1.5–2 раза по сравнению с контрольными вариантами растений. Максимальная стимуляция корневой системы обнаружена в отношении лука, обработанного протеиноминеральной фракцией, взятой в соотношении 1:5. В этом случае, средняя длина корней тестируемого растения достигала 10.14 мм, по сравнению с контролем, где средняя длина корней составила всего 5.61 мм. Небольшое угнетение развития тестируемых растений обнаружено в варианте с использованием жирнокислотного продукта биоконверсии. При этом рассчи-

танные значения фитотоксичности находились на уровне от 8.87 до 14.32%, что составляет меньше 20% и оценивается как отсутствие токсического эффекта.

Заключение. В условиях модельного эксперимента установлена фитотоксичность жиродержащего продукта или фильтрационного осадка, полученного при высокотемпературной обработке мясокостных рыбных отходов. При контактном действии фильтрационного осадка на тест-растения *Allium cepa* и *Solanum lycopersicum* обнаружено ингибирование роста и развития корней и проростков с достижением эффекта фитотоксичности в диапазоне от 64.49 до 100%. С целью детоксикации компонентов фильтрационного осадка выполнена его микробная биоконверсия и получены протеиновоминеральная и жирнокислотная фракции. В эксперименте по фитотоксичности продуктов биоконверсии фильтрационного осадка выраженного угнетения тестируемых растений не обнаружено, зафиксированный в опыте эффект оценен как стимуляция развития корней и проростков тест-растений по сравнению с контрольными параметрами.

Субстратное или контактное биотестирование с использованием тест-растений *Allium cepa* и *Solanum lycopersicum* является чувствительным способом оценки степени детоксикации органических отходов и позволяет довольно объективно оценить уровень воздействия компонентов отходов глубокой переработки рыбы на природные объекты.

Библиографический список

1. Боева Н.П., Бредихина О.В., Петрова М.С., Баскакова Ю.Л. Технология жиров из водных биологических ресурсов: монография. М., 2016. 107 с.
2. Гончарук Е. И., Сидоренко Г. И. Гигиеническое нормирование химических веществ в почве: руководство. М., 1986. 360 с.
3. Григорян К.В. Влияние загрязненных промышленными отходами оросительных вод на физические, физико-химические свойства и биологическую активность почв : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1980. 25 с.
4. Дубровская Т.А. Отходы переработки гидробионтов как источник ценных побочных продуктов // Информационный пакет «Обработка рыбы и морепродуктов». Новости отечественной и зарубежной рыбообработки. М., 2001. № 3. С 11–14.
5. Иванкин А. Н., Неклюдов А. Д., Тарасов С. М., Жилин Ю. Н. Переработка органических отходов : учебное пособие. М., 2016. 400 с.
6. Максимова Н.Б., Морковкин Г.Г., Лаврентьева А.В. Оценка токсичности и загрязненности почв методом фитоиндикации // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2003. № 2. С. 106–112.
7. Артюхова С.А., Баранов В.В., Бражная И.Э. и др. Технологии рыбы и рыбных продуктов / под ред. А.М. Ершова. М., 2010. 1064 с.
8. Сазонова О. В., Сухачева И. Ф., Березин И. И., Орлова Л. Е., Дроздова Н. И. Репрезентативность результатов эколого-гигиенической оценки почвы и риски здоровью населения Самарской области // Социально-гигиенический мониторинг. 2012. Т. 14. №5(3). С. 633–637.

УДК 54.056:547.814.5

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ВЫДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ СЫРЬЯ *SALSOLA COLLINA* PALL.

Д.М. Сыздыкова¹, Г.А. Яковенко¹, Г.М. Байсаров¹, Е.Г. Толоконников²,
И.А. Хабаров¹, С.М. Адекенов¹

¹Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия»,

Караганда Казахстан

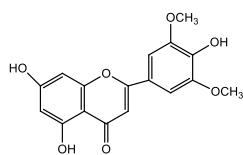
²Карагандинский фармацевтический завод, Караганда, Казахстан

В статье представлены результаты оптимизации экстрагирования лекарственного сырья солянки холмовой (*Salsola collina* Pall.). Проведена серия экспериментов и проанализированы технологические факторы экстракции и выделения суммы флавоноидов из надземной части растения. Выведена математическая модель метода экстракции с сравнительно эффективными параметрами, позволяющая достичь более высокой степени извлечения биологически активных веществ из растительного сырья. Проведенное исследование показало, что наиболее оптимальными параметрами для выделения суммы экстрактивных веществ из солянки холмовой является концентрация этилового спирта 70%, температура 65 °С и соотношении сырье : экстрагент 1:15.

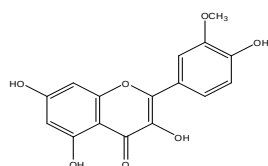
Ключевые слова: солянка холмовая, математическая модель, поверхностный отклик, регрессионный анализ, перколятор, флавоноиды, оптимизация экстракции.

Введение. В настоящее время лекарственные растения, содержащие флавоноиды, наиболее интенсивно изучаются в плане создания новых гепатопротекторных, антиоксидантных, желчегонных и других препаратов. В медицинской практике для лечения заболеваний гепатобилиарной системы широко используются флавоноидные препараты Силимарин, Силибор, Карсил, Ликвиритон, Аскорутин, которые влияют на митотическую активность в печеночных клетках после резекции печени, что обусловлено его мембраностабилизирующим и метаболическим действием (стимуляция биосинтеза белка, ускорение регенерации поврежденных гепатоцитов) [1, 2]. Одним из перспективных источников биологически активных флавоноидов с гепатопротекторным действием является солянка холмовая (*Salsola collina* Pall) – однолетнее растение, которое легко культивируется в промышленных масштабах, а также имеет эксплуатационные запасы в степной зоне Казахстана и считается практически доступным возобновляемым сырьем. Солянка холмовая культивируется в опытно-промышленном хозяйстве Березняки Карагандинского фармацевтического завода в Бухар-Жырауском районе Карагандинской области Республики Казахстан на площади 7,35 га с урожайностью 4 т с гектара [3, 4].

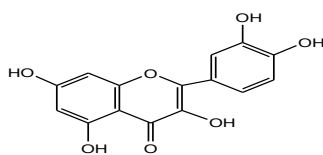
Основными фармакологически активными флавоноидами солянки холмовой являются трицин (1), изорамнетин (2), кверцетин (3) и рутин (4) [3-5]. В АО Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» на основе суммы флавоноидов солянки холмовой разработан гепатопротекторный препарат «Салсоколлин» [6]. Клинические исследования подтверждают высокую терапевтическую активность салсоколлина при заболеваниях гепатобилиарной системы. Химическое изучение *Salsola collina* Pall подтвердило идентичность компонентного состава дикорастущего растения и выращенного на культивируемом участке.



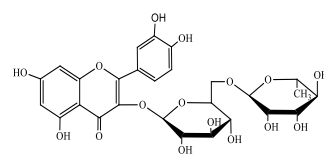
(1)



(2)



(3)



(4)

Одним из наиболее перспективных направлений развития технологии лекарств является совершенствование технологии экстрагирования растительного сырья. Этот процесс напрямую зависит от технологических свойств экстрагируемого сырья и применяемой аппаратуры. Свойства исходного растительного сырья оказывают решающую роль на качество получаемого продукта [7]. Существующие методы оптимизации экстракции в основном направлены на изменение аппаратного составляющего и оптимизации растворителя. С целью усовершенствования процесса экстрагирования сырья солянки холмовой предложен метод математического моделирования, построенный на методологии поверхностного отклика, что, в свою очередь, не требует изменения вышеуказанных параметров.

Материалы и методы. Объектом исследования является надземная часть солянки холмовой, возделываемая на участке опытно-промышленного хозяйства «Березняки» Карагандинского фармацевтического завода в Бухар-Жырауском районе Карагандинской области Республики Казахстан. Для оптимизации метода экстракции лекарственного сырья солянки холмовой на перколяторе построена трехфакторная матрица эксперимента. Рассмотрены следующие параметры: температура, концентрация экстрагента и соотношение сырье: экстрагент (табл. 1).

Таблица 1

Матрица планирования трехфакторного эксперимента экстракции сырья солянки холмовой

№ экстракции	Температура, °C	Концентрация экстрагента, %	Соотношение сырье:экстрагент
1	55	70	1:10
2	55	80	1:12
3	55	96	1:15
4	60	70	1:12
5	60	80	1:15
6	60	96	1:10
7	65	70	1:15
8	65	80	1:10
9	65	96	1:12

Количественное определение флавоноидов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Hewlett Packard Agilent 1100 Series в изократическом режиме.

Статистическая обработка. Проведена статистическая обработка количественных показателей экспериментальных данных. Статистическую значимость различий в сравниваемых выборках оценивали по t-критерию Стьюдента, статистически достоверными считали различия при $p \leq 0.05$. Накопление базы данных и ее информационно-аналитическую переработку, вычислительные операции и графическое изображение результатов исследований осуществляли на компьютере с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2016.

Математическую модель процесса экстракции солянки холмовой рассчитывали по методу поверхностного отклика.

Результаты и обсуждение. При переработке лекарственного сырья одной из основных проблем является его рациональное использование путем комплексной переработки с максимально полным извлечением всех ценных компонентов.

Для оптимизации процесса экстракции сырья солянки холмовой проведен ряд экспериментов по изучению влияния технологических параметров на выход суммы экстрактивных веществ (табл. 2).

Таблица 2

Выход суммы экстрактивных веществ солянки холмовой

№	Концентрация экстрагента, %	Температура, °С	Соотношение сырья:экстрагента	Масса сырья, г	Масса экстракта, г
1	2	3	4	5	6
1	2	3	4	5	6
1	2	3	4	5	6
1	96	60	1:10	6000	350
2	96	65	1:12	5000	300
3	96	55	1:15	4000	280
4	80	60	1:15	4000	500
5	80	65	1:10	6000	490
6	80	55	1:12	5000	520
7	70	55	1:10	6000	480
8	70	60	1:12	5000	547
9	70	65	1:15	4000	640

На основании полученных данных проведен регрессионный анализ и рассчитана математическая модель (1) зависимости выхода суммы экстрактивных веществ в граммах:

$$1032,89 - 969,38 \cdot X + 5,00 \cdot Y + 20,00 \cdot 10^8 \cdot Z - 333,35 \cdot H, \quad (1)$$

где X – концентрация; Y – температура; Z – соотношение сырья: экстрагента; H – масса сырья.

Уравнение зависимости выхода суммы экстрактивных веществ выраженная в процентах имеет следующий вид:

$$1,62 + 3,34 \cdot X + 0,03 \cdot Y + 88,96 \cdot 10^6 \cdot Z - 148,26 \cdot H + 0,03 \cdot G, \quad (2)$$

где X – концентрация; Y – температура; Z – соотношение сырья: экстрагента; H – масса сырья; G – масса экстракта.

Как видно из уравнений 1 и 2, основными факторами, влияющими на выход суммы экстрактивных веществ солянки холмовой, являются концентрация (X), температура (Y) и соотношение сырье : экстрагент (Z).

В таблице 3 представлено сравнение экспериментальных и рассчитанных данных (уравнение 1 и 2). Сходимость результатов наблюдается в экспериментах № 4, 8 и 9. Следовательно, количественное извлечение суммы экстрактивных веществ достигается при температуре 65 °С, концентрации экстрагента 70% и соотношении сырье : экстрагент = 1 : 15.

Таблица 3

Сравнение экспериментального и рассчитанного выхода суммы экстрактивных веществ солянки холмовой

№	Выход экстракта (%), экспериментальный	Рассчитанный выход экстракта (%), уравнение 1	Рассчитанный выход экстракта (%), уравнение 2
1	5,83	5,53	5,07
2	6,00	5,82	6,90
3	7,00	7,26	7,82
4	12,50	12,44	12,32
5	8,17	8,69	8,07
6	10,40	10,50	9,00
7	8,00	7,78	8,86
8	10,94	11,02	11,44
9	16,00	15,80	15,37

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, расчетные данные, полученные с использованием уравнения 1, имеют большую сходимость с экспериментальными данными (рис. 1).

Методом ВЭЖХ установлено, что содержание флавоноидов трицина (1) и рутина (4) в сумме экстрактивных веществ солянки холмовой составляет 0,58 и 0,02% соответственно.



Рис. 1. Сравнение экспериментальных и расчетных данных выхода экстракта солянки холмовой (%)

Заключение. В плане комплексной переработки сырья солянки холмовой для количественного извлечения фармакологически ценных компонентов проведена оптимизация экстракции. Установлено, что наибольшее влияние на выход суммы экстрактивных веществ оказывали такие параметры, как температура экстракции, концентрация экстрагента и соотношении сырье: экстрагент.

В результате оптимизации технологических режимов экстракции солянки холмовой установлено, что количественный выход суммы экстрактивных веществ достигается при концентрации этилового спирта 70%, температуре 65 °С и соотношении сырье : экстра-

гент = 1:15. При этом содержание флавоноидов трицина (1) и рутина (4) в сумме экстрактивных веществ солянки холмовой составляет 0,58 и 0,02% соответственно.

Работа выполнена по инновационному проекту «Внедрение инновационной технологии в производство пеллетированных форм фитопрепаратов», финансируемого АО «Национальное агентство по развитию инноваций QazInnovations» (договор № 237 от 29.10.2018 г.)

Библиографический список

1. Фитопрепараты ВИЛАР / под ред. Т.А. Сокольской. М., 2009. 256 с.
2. Куркина А.В. Флавоноиды фармакопейных растений. Самара, 2012. 290 с.
3. Итжанова Х.И. Технология оригинальных лекарственных препаратов на основе растительных экстрактов *Salsola collina* Pall., *Saussurea salsa* Spreng. и *Serratula coronata* L. и их стандартизация: дис. д-ра фарм. наук. Караганда, 2009. 223 с.
4. Кульмагамбетова Э.А. Флавоноиды *Artemisia*, *Populus*, *Salsola*, их химическая модификация и биологическая активность : дис. ... канд. хим. наук. Караганда, 2001. 109 с.
5. Jin Y.-S., Du J.-L., Yang Y., Jin L., Song Y., Zhang W., Chen, H.-S. Chemical and biologically active constituents of *Salsola collina* // Chemistry of Natural Compounds. 2011. Vol. 47. P. 257–260.
6. Адекенов С.М. Евразийский патент № 011072 от 30.12.2008. «Способ получения цитопротекторного средства». Заявл. 14.11.2005. Опубл. 30.12.2008.
7. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья. М., 1976. 202 с.

УДК 602

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА ИЗ *HERMETIA ILLUCENS*

М.С. Талан¹, М.С. Гаевский², А.А. Володин³, И.С. Докучаева¹, Р.М. Папаев²

¹Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

²Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, Казань, Россия

³Казанский федеральный университет, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Казань, Россия

Биодизельное топливо позволит уменьшить выбросы парниковых газов в 3,5–4,6 раза; снизить ущерб окружающей среде на 15–16%; уменьшить затраты с учетом экологического ущерба на 40%. На данный момент в мире образуется огромное количество пищевых отходов, существует проблема в их экологичной утилизации, для минимизации выделения вредных парниковых газов. Насекомые *Hermetia Illucens* можно использовать для биоконверсии пищевых отходов, при этом выбросы парниковых газов будут минимальны. Нами было проведен эксперимент по кормлению личинок мух *Hermetia Illucens* с использованием адаптогена в исследуемых диетах. В результате заметили, что адаптоген оказывает благоприятное воздействие на набор массы личинок.

Ключевые слова: биоконверсия, личинки, *Hermetia Illucens*, биодизельное топливо, адаптоген.

Биодизельное топливо обычно является компонентом смешения с нефтяным дизтопливом. Широко распространено введение до 20% компонента. Обладая примерно одинаковым с дизельным топливом энергетическим потенциалом, биодизель имеет ряд существенных преимуществ, как экологического характера, так и в техническом отношении: не токсичен, практически не содержит серы и канцерогенного бензола; при попадании в воду не причиняет вреда растениям и животным; разлагается в естественных условиях (примерно так же, как сахар); обеспечивает значительное снижение вредных выбросов в атмосферу при сжигании, как в двигателях внутреннего сгорания, так и в технологических агрегатах; увеличивает цетановое число топлива и его смазывающую способность, что существенно увеличивает ресурс двигателя; имеет высокую температуру воспламенения, что делает его использование относительно безопасным; его источником являются возобновляемые ресурсы; биодизель может использоваться в обычных двигателях внутреннего сгорания, как самостоятельно, так и в смеси с обычным дизтопливом, без внесения изменений в конструкцию двигателя.

Биодизельное топливо позволит уменьшить выбросы парниковых газов в 3,5–4,6 раза; снизить ущерб окружающей среде на 15–16%; уменьшить затраты с учетом экологического ущерба на 40% [1].

В мире образуется значительное количество пищевых отходов, источники их образования включают домашние хозяйства, рестораны, сельскохозяйственную и пищевую промышленность. В настоящее время пищевые отходы утилизируются методами компостирования или захоронения. При захоронении пищевых отходов образуются парниковые газы, что пагубно сказывается на климате. Кроме того, установка свалки требует больших капитальных затрат и больших площадей.

Насекомые хранят энергию в форме триглицеридов (липидов) и гликогена в основной клетке своего тела. Учитывая, что пищевые отходы являются кормом для насекомых, различные химические компоненты пищевых отходов могут превращаться в липиды в клетках жирового тела насекомых в результате их метаболизма. Липиды являются основным сырьем для производства биодизельного топлива посредством хорошо зарекомендовавшей себя в промышленности химической реакции, называемой переэтерификацией. Высокая скорость размножения насекомых может ускорить превращение пищевых отходов в липиды. Помимо жиров, из насекомых можно получать белок, заменяя рыбную муку в комбикормах [4].

Среди насекомых значительное внимание уделяется обработке пищевых отходов с использованием личинок черной мухи (*Hermetia illucens*). Известно, что личинки мухи биодеградируют органические отходы с помощью ротового аппарата и ферментов [3].

Методика выполнения работы *Условия содержания личинок мух.* Создан инсектарий на базе Казанской государственной ветеринарной медицинской академии насекомых. Для насекомых использовались соответствующие культиваторы, условия содержания и кормления, специфичны физиологии мухи чёрной львинки.

Чёрную львинку содержали в клетках размером 60х60х70 см с индивидуальным обогревом и контролем температуры в пределах 26 ± 1 °C и влажности не ниже 70%. Кроме того, яйца выращивали в специализированных инкубаторах, с контролем температуры и влажности. Яйца мух инкубировали ежедневно и создавали группы одного возраста для удобства проведения эксперимента.

Исследования влияния различных диет на личинок мухи чёрной львинки. Эксперимент проводился с личинками чёрной львинки двухдневного возраста, они были засеяны на диеты № 1, 2, 3, затем кормление и взвешивание проводилось в течение 10-ти дней. Пшеничные отруби были взяты массой 25 г, воду добавляли в объёме 50 мл, с предварительно растворённой в ней антиоксидантной кислотой.

Для эксперимента нами было протестировано 3 диеты (табл. 1): диета № 1 – пшеничные отруби 100% + раствор янтарной кислоты, разведённый до концентрации 0,15%; диета № 2 – пшеничные отруби 100% + раствор янтарной кислоты, разведённый до концентрации 0,3%; диета №3 – пшеничные отруби 100%.

Таблица 1

Суточный прирост опарышей мухи чёрной львинки

Дни	Диета 1 Пш. отруби + 0,15% янт. к-та, г	Диета 2 Пш. отруби + 0,3% янт. к-та, г	Диета 3 Пш. Отруби, г
	Группы		
	1	2	3 контроль
	Суточный прирост 10 личинок, г		
1	0,05	0,04	0,07
2	0,09	0,11	0,09
3	0,12	0,12	0,12
4	0,14	0,2	0,1
5	0,08	0,15	0,11
6	0,25	0,2	0,05
7	0,17	0,16	0,07
8	0,13	0,16	0,11
9	0,23	0,25	0,21
10	0,06	0,17	0,15
Средний прирост за 10 дней, г	0,132	0,156	0,108

Для получения биодизеля выделенную из сырья липидную фракцию, содержащую преимущественно триацилглицерины (ТАГ), подвергают химической переработке. В основе этого процесса лежит реакция переэтерификации, т.е. взаимодействие ТАГ и иных сложных липидов со спиртами, протекающая при нагревании и в присутствии катализатора. Переэтерифицирующим агентом является какой-либо спирт. Наиболее часто используют метанол ввиду его низкой стоимости по сравнению с другими спиртами [2].

В эксперименте рассматривались три диеты, в первых двух из них применяли янтарную кислоту в двух разных разведениях. По результатам эксперимента в диете № 2 с применением янтарной кислоты в концентрации 0,3% прирост массы получился больше, чем в диете № 1 с концентрацией янтарной кислоты 0,15% и контрольной диетой (рис. 1).

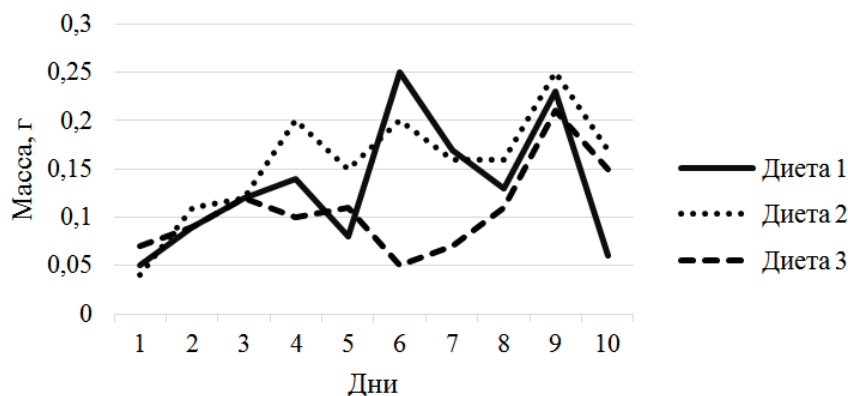


Рис. 1. Суточный прирост личинок мухи чёрной львинки на диетах эксперимента

По результатам эксперимента можно сделать заключение, что добавление янтарной кислоты позволяет опарышам набирать массу быстрее, тем самым возможно повысить рентабельность производства. Тем не менее, необходимо детально выяснить влияние янтарной кислоты на физиологию опарышей, главным моментом является влияние янтарной кислоты на изменение жирно-кислотного профиля опарышей, а также микро- и макроэлементного состава личинок мухи чёрной львинки.

Результаты данного исследования можно использовать в практике для оптимизации биооконверсии личинками пищевых отходов.

Исследования необходимо продолжить для выявления дополнительных факторов воздействия на развитие личинок мух чёрной львинки, таких как pH субстрата, плотность посадки, влияние микрофлоры на усвояемость личинками пищевых отходов.

Выводы. Инсектарий собран на базе КГАВМ. Получена стабильная популяция мух чёрной львинки, в частности, получены личинки мух двухдневного возраста. В эксперименте с диетой № 1 (пш. отруби + 0,15% янт. к-та) видно увеличение прироста массы на 0,24, а с диетой № 2 (пш. отруби + 0,3% янт. к-та) на 0,48 грамма по сравнению с контролем диета №3 (пш. отруби 100%). Это может свидетельствовать о положительном эффекте добавления адаптогена в концентрации 0,3% увеличивает скорость набора массы у личинок мух чёрной львинки и может положительно сказаться на рентабельности производства. Выращенных на данных диетах личинок возможно использовать для получения биодизельного топлива.

Библиографический список

1. Гафуров Н.М., Хисматуллин Р.Ф. Преимущества биодизельного топлива // Инновационная наука. 2016. №5-2 (17). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/preimuschestva-biodizelnogo-topliva> (дата обращения: 17.10.2021).
2. Кучкина А.Ю., Сущик Н.Н. Источники сырья, методы и перспективы получения биодизельного топлива // Журнал СФУ. Биология. 2014. №1.
3. Kim C.-H., Ryu J., Lee J., Ko K., Lee J., Park K.Y., Chung H. Use of Black Soldier Fly Larvae for Food Waste Treatment and Energy Production in Asian Countries // A Review. Processes. 2021. V. 9. P. 161.
4. Hamish F., Tom Q., Clementine OC., United Nations Environment Program Food Waste Index Report. 2021. Nairobi. url: <https://www.unep.org/ru/resources/doklad/doklad-yunep-ob-indekse-pischevykh-otkhodov-za-2021-god>.

УДК 676.1:547.576

ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ МАССОПЕРЕНОСА НА ПРОЦЕСС КАТАЛИТИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ КОСТРЫ ЛЬНА В ВАНИЛИН И ЦЕЛЛЮЛОЗУ

В.Е. Тарабанько, Д.О. Вигуль, Ю.В. Челбина, К.Л. Кайгородов

Институт химии и химической технологии СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Процесс окисления костры льна в ванилин, сиреневый альдегид и целлюлозу в исследуемых условиях протекает как полностью контролируемый диффузией процесс. В зависимости от условий процесса он может лимитироваться стадиями переноса кислорода через границу раздела фаз газ-жид-

кость, а также переносом кислорода в объеме ньютоновской жидкой фазы и неньютоновской суспензии реакционной массы. Полученные результаты по влиянию скорости перемешивания и изменения объема реакционной массы на скорости потребления кислорода и накопления ванилина описываются простой известной моделью, связывающей интенсивность массопереноса с плотностью мощности перемешивания в объеме жидкой фазы. Полученные результаты показывают, что несмотря на четко контролируемые диффузией условия окисления костры льна кислородом выход ванилина может быть очень близок (вплоть до 100%) к теоретическому максимуму выхода ванилина в процессах окисления лигнина.

Ключевые слова: массоперенос, ванилин, сиреневый альдегид, целлюлоза, костра, лен, *Linum usitatissimum*.

Введение. Отходы аграрных производств – огромный возобновляемый ресурс лигно-целлюлозных материалов, малоиспользуемый для химической переработки. Производство льна в России достигает 600 тыс. тонн в год, причем до 70 мас.% составляет отход производства – костра. Костра – это одревесневшие части стебля льна, преимущественно в виде мелкой соломки, остающееся после стадии трепания льна [1]. Костра льна содержит 18–28% лигнина, а ее окисление нитробензолом дает 15–20 мас. % ванилина в расчете на лигнин [2].

Сведения о каталитическом окислении костры льна кислородом в литературе не найдены. Практически отсутствуют работы, в которых такое влияние изучено на количественном уровне [3]. Влияние интенсивности массопереноса реагентов, в первую очередь кислорода, на скорость и селективность каталитического окисления лигнинов количественно практически не изучено [4]. Цель настоящей работы заключается в изучении влияния интенсивности массопереноса на процесс каталитического окисления костры льна кислородом в ароматические альдегиды и целлюлозу.

Экспериментальная часть. Для экспериментов использовали воздушно-сухую порошкообразную (размер частиц менее 1 мм) льняную костру, полученную в Тверской области (ТК) и в Белоруссии (БК). Состав высушенной ТК определяли по известным методикам: 29,5 мас. % лигнина, 41,4 мас. % целлюлозы, 1,45 мас. % экстрактивных веществ. Предгидролиз костры соляной кислотой (23%, 10 мл на грамм костры) проводили при 20 °С в течение часа.

Реакционную массу готовили путем последовательного добавления в реактор необходимого количества костры, гидроксида натрия, воды и катализатора ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) при непрерывном перемешивании. Эксперименты проводили в автоклаве из нержавеющей стали (объем 1 л, внутренний диаметр 95 мм, высота 180 мм) при перемешивании магнитной мешалкой (100–700 об/мин, диаметр мешалки 10 мм, длина 60 мм), 160 °С и парциальном давлении кислорода 0,2 МПа. Кислород подавали в реактор из калиброванного буферного объема через клапан, поддерживая постоянное давление в реакторе. Количество потребляемого кислорода рассчитывали по изменению давления внутри буферного объема. Ванилин и сиреневый альдегид анализировали методом ГЖХ [5].

Результаты и обсуждение. *Окисление исходной твердой костры льна.* В отличие от ранее изученных процессов окисления древесины и лигносульфонатов [4], зависимости поглощения кислорода от времени при окислении исходной костры имеют ступенчатый плохо воспроизводимый характер (рис. 1), и эти проблемы проявляются тем сильнее, чем ниже интенсивность массообмена (скорость перемешивания, отношение объемов газа и жидкости в реакторе). Объемы поглощенного кислорода снижаются при увеличении объема жидкой фазы, т.е. при увеличении массы костры в реакторе.

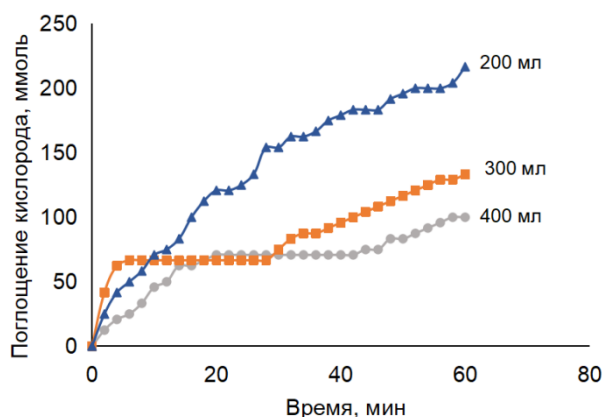


Рис. 1. Влияние объема реакционной массы в реакторе на зависимости поглощения кислорода от времени при скорости перемешивания 500 мин^{-1} . Условия процесса: загрузка сырья – 50 г/л; NaOH – 50 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 37,5 г/л; парциальное давление кислорода 0,2 МПа

Полученные результаты показывают, что в рассматриваемой реакционной системе наблюдаются три вида диффузионного торможения процесса поглощения кислорода компонентами жидкой фазы. Первый барьер может локализоваться на границе раздела фаз газ-жидкость в форме газонепроницаемых пленок, образующихся в результате окисления компонентов жидкой фазы или их концентрирования в результате испарения воды и разрушающихся случайным образом. Второй эффект диффузионного торможения обусловлен высокой вязкостью объема жидкой фазы. Третий эффект связан с переносом кислорода в объеме неньютоновской суспензии – реакционной массы жидкость-твердое и объясняет снижение поглощения кислорода при увеличении объема реакционной массы. Первый и третий барьеры в значительной мере преодолеваются в условиях максимальной интенсивности массообмена, при наибольшей скорости перемешивания и минимальном объеме жидкой фазы в реакторе (рис. 1).

Окисление предгидролизованной костры льна. В рассматриваемой системе химическая природа диффузионного барьера на границе раздела фаз может быть связана не с лигнином, а со слизями, характерными для льна и сконцентрированными в его семенах [6]. Структура слизей состоит из гемицеллюлоз и белковых фрагментов [6]. Слизь льна образует коллоидные растворы, и на поверхности раздела фаз в результате испарения воды или окисления кислородом могут происходить золь-гель переходы, формирующие непрочную, но газонепроницаемую пленку.

Хорошо известно, что межзвенные простые эфирные связи полисахаридов гидролизуются в кислой среде и вполне стабильны в растворах щелочей [5]. По этой причине для разрушения слизей и устранения диффузионного торможения нами использован кислотный предгидролиз костры льна с удалением растворимых продуктов гидролиза. В результате предгидролиза костра теряет 10% массы, в основном за счет растворения гемицеллюлоз.

Все рассматриваемые ниже результаты получены при использовании твердой костры, за исключением специально отмеченных данных. Полученные результаты по динамике поглощения кислорода при окислении исходной и предгидролизованной костры показывают, что ступени, наблюдаемые на кривых поглощения кислорода от времени при окислении исходной костры, практически отсутствуют на кривых окисления предгидролизованного сырья. Следовательно, предгидролиз и деструкция слизей исключают образование газонепроницаемых пленок на поверхности раздела фаз газ-жидкость и, таким образом устраняют этот барьер на пути массопереноса кислорода. В результате предгидролиза расход кислорода возрастает в десять

раз по сравнению с окислением исходной, негидролизованной костры при больших нагрузках реакционной массы (400 мл), а выход ванилина – почти вдвое.

Влияние скорости вращения мешалки на скорость поглощения кислорода. На рисунке 2 представлены результаты по влиянию скорости перемешивания и объема реакционной массы на кинетику поглощения кислорода в процессе окисления предгидролизованной костры льна. Скорость поглощения кислорода возрастает при увеличении скорости перемешивания (рис. 3А), и это соответствует простейшим классическим представлениям о кинетике процесса в диффузионном режиме. Количественно связь между скоростью вращения магнитной мешалки N и начальной скоростью поглощения кислорода W_{O_2} проявляется в логарифмических координатах (рис. 2), в которых эта зависимость удовлетворительно описывается линейным уравнением

$$\ln W_{O_2} = a_1 + a_2 \ln N \quad (1)$$

с тангенсом угла наклона $a_2 = 1,79 \pm 0,24$. Простейшая модель влияния интенсивности перемешивания на скорость массопереноса в газо-жидкостной системе утверждает, что последняя пропорциональна плотности мощности перемешивания в объеме жидкой фазы [7], т.е. определяется квадратом скорости вращения мешалки. Более точная модель массопереноса [8] описывается таким же уравнением со значением константы $a_2 = 1,85$, которая в пределах точности эксперимента совпадает с экспериментальной величиной.

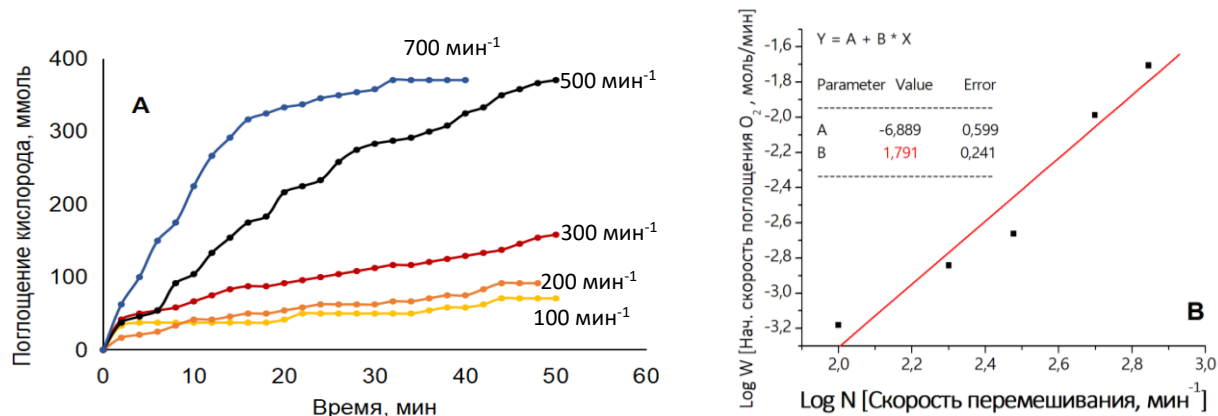


Рис. 2. Влияние скорости перемешивания на кинетику поглощения кислорода (А) при окислении предгидролизованной костры льна и логарифмическая зависимость начальной скорости поглощения кислорода от скорости вращения мешалки (В)

Изменение объема реакционной массы одного и того же состава не меняет скорости поглощения кислорода, так как мощность перемешивания и, следовательно, интенсивность массопереноса остаются неизменными.

Полученные результаты сопоставлены с процессом окисления образцов белорусской костры без примеси семени льна. В одинаковых условиях кривые поглощения кислорода предгидролизованными образцами тверской и белорусской костры, а также исходной белорусской костры монотонны и совпадают между собой. Таким образом, слизи семян льна в костре принципиально замедляют поглощение кислорода в процессе окисления, но удаление и разрушение слизей путем их кислотного предгидролиза позволяет практически полностью устранить эту проблему.

Выходы целлюлозы в твердом остатке процесса окисления негидролизованной костры составляют 77–78% в расчете на ее содержание в исходной костре и не зависят от природы образца; в результате предгидролиза выход целлюлозы после окисления снижается до 57–66%.

Влияние скорости вращения мешалки на динамику накопления ванилина. На рисунке 3 представлены данные по влиянию скорости перемешивания на динамику накопления ванилина в процессе окисления предгидролизованной костры. Кривые накопления ванилина имеют экстремальный характер, значение максимального выхода ванилина мало зависит от скорости перемешивания и меняется в пределах 8–10 мас. % в расчете на лигнин костры.

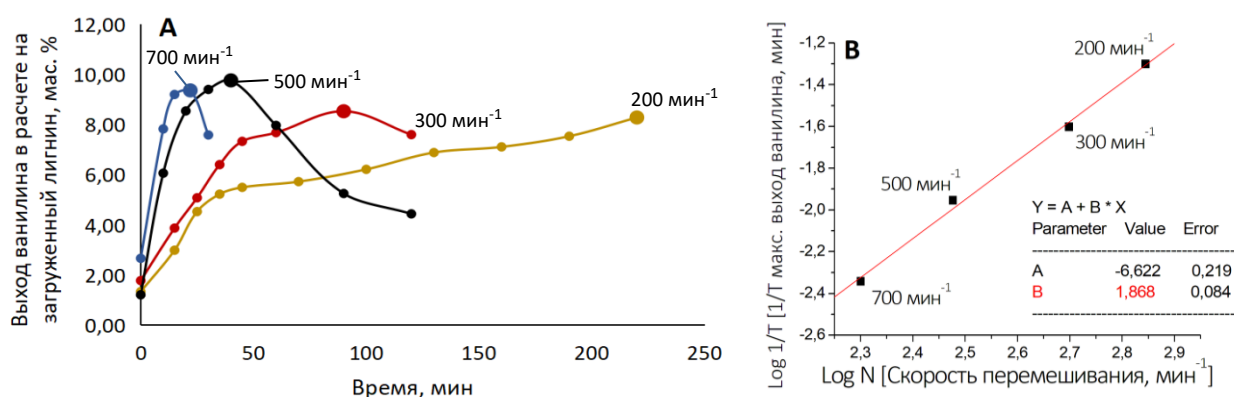


Рис. 3. Влияние скорости вращения мешалки на динамику накопления ванилина в линейных (А) и логарифмических (В) координатах (условия процесса см. рисунке 1)

Более существенно десятикратное смещение положения экстремума по времени. Именно таким смещением максимума выхода ванилина во времени в основном обусловлена наблюдавшаяся ранее экстремальная зависимость выхода ванилина от скорости перемешивания реакционной массы при постоянной продолжительности процесса [9].

Приняв в качестве характеристики скорости образования ванилина величину, обратную времени выхода концентрации ванилина на максимум $1/T_{max}$, можно построить аналогичную рисунку 2В логарифмическую зависимость времени выхода концентрации ванилина на максимум от скорости перемешивания (рис. 3В). Эта зависимость линейна и имеет тангенс угла наклона $\text{tg}\alpha = 1.86 \pm 0.08$, который в пределах точности эксперимента совпадает с тангенсами уравнений (1), (2) для скорости поглощения кислорода. Это показывает, что несмотря на сложность изученного химического процесса и скорость поглощения кислорода, и характер кривых накопления ванилина соответствуют модели интенсивности массопереноса (2) [7, 8].

Еще раз отметим, что интенсивность массообмена оказывает незначительное влияние на выход ванилина и сильно влияет на расход кислорода в процессе. В результате формируется возрастающая (до трех раз) зависимость расхода кислорода в расчете на образовавшийся ванилин от интенсивности массообмена. Эту зависимость можно использовать для сокращения расходов кислорода и, возможно, щелочи в процессах окисления лигнинов в ароматические альдегиды, используя диапазон умеренной интенсивности массообмена.

Сравнение процессов образования ванилина при окислении костры кислородом и нитробензолом. Хорошо известно, что селективность процесса по промежуточному продукту, в том числе ванилину, может снижаться при переходе от кинетического режима окисления к диффузионному [4, 8]. Вопрос о том, насколько велико такое снижение селективности на базе использованного реактора не может быть экспериментально решен переводом процесса в кинетический режим. Общеизвестно, что нитробензольное окисление лигнинов дает выходы ванилина, соответствующие теоретическому пределу селективности. Поэтому его

эффективность можно использовать в качестве оценки максимального выхода ванилина в кинетическом режиме окисления костры кислородом. Снижение выхода ванилина при переходе от окисления белорусской льняной костры нитробензолом (15,1 мас. % на лигнин) к окислению молекулярным кислородом в диффузионном режиме (12,5%) незначительно и находится на уровне на уровне 17% относительных. На наш взгляд, это неожиданно не-большое различие; оно показывает, что соотношение скоростей образования и окисления ванилина в реакционной среде весьма велико.

Заключение. Совокупность полученных результатов показывает, что изученный процесс окисления костры льна протекает в диффузионной области, т.е. скорость массопереноса кислорода в реакционной массе целиком и полностью лимитирует химический процесс окисления компонентов костры льна кислородом. В общем случае, включающем негидролизованную костру, массоперенос может лимитироваться одной из трех ступеней: 1) – перенос кислорода через поверхность раздела фаз газ-жидкость, скорость которого может замедляться слизями льна вплоть до нулевой; 2) – перенос кислорода в объеме ньютоновской жидкой фазы; 3) – перенос кислорода в объеме неньютоновской суспензии – реакционной массы жидкость-твердое.

При отсутствии или после устранения первого и третьего осложнений зависимости скорости поглощения кислорода и накопления ванилина от скорости вращения мешалки и от объема реакционной массы в реакторе соответствуют простой модели, связывающей интенсивность массопереноса с плотностью мощности перемешивания в двухфазной системе газ-жидкость: в логарифмических координатах обе эти зависимости линейны с совпадающими в пределах ошибки тангенсами угла наклона ($\text{tg}\varphi = 1.79 \pm 0.24$). Эти значения тангенсов экспериментальных зависимостей совпадают с тангенсом уравнения, следующего из модели интенсивности массопереноса в системе жидкость-газ, определяемой плотностью мощности перемешивания в объеме жидкой фазы.

Несмотря на очевидно диффузионный режим изученного процесса, максимальные выходы ванилина в расчете на лигнин в процессах окисления костры нитробензолом (15–16%) – и кислородом (11–12,5%) различаются на 17–30% относительных. По нашему мнению, это неожиданно малые различия, и их можно интерпретировать как снижение селективности процесса окисления кислородом при переходе от кинетического режима к диффузионному.

В работе [5], проведенной в таком же реакторе и, следовательно, в диффузионном режиме, достигнуты выходы ванилина, еще более близкие к результатам нитробензольного окисления, вплоть до 100%. Это показывает, что в диффузионном режиме удастся получать максимальные выходы ванилина, совпадающие в пределах точности эксперимента с теоретическим пределом выхода, т.е. с максимальным выходом в кинетическом режиме.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда
№ 20-63-47109*

Библиографический список

1. Линь А.А., Михайлов В.М. Поляков А.В. Льновод и льноводство – между прошлым и будущим // Аграрная Россия. 2016. № 12. С. 32–35.
2. Ross K., Mazza G. Characteristics of Lignin from Flax Shives as Affected by Extraction Conditions // International Journal of Molecular Sciences. 2010. Vol. 11(10). P. 4035–4050.
3. Pacek A. W., Ding P., Garrett M., et al. Catalytic Conversion of Sodium Lignosulfonate to Vanillin: Engineering Aspects. Part 1. Effects of Processing Conditions on Vanillin Yield and Selectivity // Ind. Eng. Chem. Res. 2013. Vol. 52(25). P. 8361–8372.

4. Tarabanko V.E., Tarabanko N. Catalytic oxidation of lignins into the aromatic aldehydes: general process trends and development prospects // Int. J. Molecular Sciences. 2017. Vol. 18. P. 2421.
5. Tarabanko V.E., Kaygorodov K.L., Vigul D.O. et al. Influence of acid prehydrolysis on the process of wood oxidation into vanillin and pulp // J. Wood Chem. Techn. 2020. Vol. 40(6). P. 421–433.
6. Mazza G., Biliaderis C. G. Functional Properties of Flax Seed Mucilage // Journal of Food Science, 1989. Vol. 54(5). P. 1302–1305.
7. Perry J.H. Chemical Engineers. Handbook, 1963. Vol. 2. P. 93.
8. Joshi J. B., Pandit A. B., Sharma M. M. Mechanically agitated gas-liquid reactors // Chemical Engineering Science, 1982. Vol. 37(6). P. 813–844.
9. Zhu Y.T., Liao Y.H., Liu J. et al. Vanillin and Cellulose Production by Oxidation of Lignocellulose with Stirring Control // ACS Sust. Chem. & Eng. 2020. Vol. 8. P. 2361–2374.

УДК 615.322:633.12 (045)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФИТОМЕЛАНИНА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ЛУЗГИ ГРЕЧИХИ В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТА УФ-ЗАЩИТЫ

Я.В. Уразова

*Бийский технологический институт (филиал) Алтайского государственного
технического университета им. И.И. Ползунова, Бийск, Россия*

В статье рассматривается использование фитомеланина как компонента, используемого в косметической промышленности в качестве УФ-защитного фактора. Приводится актуальность исследования и способы получения природного пигмента.

Ключевые слова: вторичное сырье; лузга гречихи; фитомеланин; УФ-защита, SPF-фактор.

Одной из серьезных проблем окружающей среды является трудная экологическая обстановка. Поэтому отрасль биотехнологии серьезно направлена в сторону переработки вторичного сырья. Известно, что Россия занимает второе место по производству гречневой крупы после Китая. Ежегодно в России образуется в среднем около 62,7 тыс. тонн лузги гречихи, при этом лишь ничтожно малая часть этого количества находит свое применение. В то же время около 20 % от массы производства крупы составляет лузга [1, 2].

Наиболее перспективными методами переработки гречневой лузги могут служить выделение биологически активных веществ, содержащихся в отходах данной культуры. Одним из компонентов для выделения может служить меланин, так как гречневая лузга отличается высоким содержанием пищевого водорастворимого красителя. Меланин участвует в репарации ДНК, нейтрализует продукты перекисного окисления липидов, служит модулятором таких важных систем клеточного метаболизма, как фото – и радио-протекция. Механизм протекторного действия меланина – обеспечивать надежную защиту клеточных систем от факторов мутагенной и канцерогенной природы.

Меланины являются высокомолекулярными полимерами с нерегулярной структурой, относящиеся к классу конденсированных фенольных соединений. Благодаря широкому спектру фармакологической активности они находят применение в различных отраслях промыш-

ленности, таких как фармацевтика (мощный антиоксидант, активный сорбент тяжелых и трансурановых элементов), пищевая промышленность (натуральный коричневый краситель для окрашивания различных продуктов) и косметология (активный компонент кремов с УФ-защитой).

Меланин проявляет высокий интерес в биомедицине, благодаря своим физиологическим фотозащитным свойствам. Эумеланин обладает очень широким спектром поглощения в УФ-видимом диапазоне [3] и способен рассеивать до 90% поглощенной энергии солнечного излучения. Таким образом, меланин защищает кожу от вредного воздействия ультрафиолета. Многие эпидемиологические исследования показали более низкую заболеваемость раком кожи у лиц с высоким содержанием меланина в коже [4]. Кожа является наиболее распространенным местом возникновения рака у людей, особенно у людей с бледной кожей, а УФ-свет является основным фактором окружающей среды, ответственным за образование злокачественной меланомы и других видов рака кожи.

При заболеваниях кожи повышается развитие феомеланина, что в свою очередь способствует возникновению рака [5–7], этот фактор особенно актуален для лиц с бледной кожей. Таким образом, люди с высоким содержанием феомеланина в их светлой коже будут иметь больший риск развития рака кожи, с одной стороны, из-за свойств фотосенсибилизатора этого типа меланина после попадания солнечного излучения, с другой стороны, из-за независимых от УФ-факторов, которые все еще изучаются, но более важны для светлой кожи [8].

Помимо фотозащиты кожного меланина, следует учитывать множество других функций. Меланин, особенно эумеланин, является нерастворимым, устойчивым и стабильным биополимером, без значительной деградации, поэтому его иногда считают относительно инертным веществом. Меланины довольно реакционноспособны и обладают рядом сложных структурных и физико-химических свойств в дополнение к устойчивости и деградации [9, 10].

По статистическим данным об онкозаболеваниях кожи, за последние 5 лет идет активное развитие меланомы, в среднем за год на 1,83 %, что обуславливает применение меланина благодаря его способности экранировать и поглощать УФ-свет, частично превращая его в тепло и расходуя на фотохимические реакции. Таким образом, применение меланина в косметической промышленности в качестве природного УФ-фильтра является значимым.

Целью работы являлось выделение меланина из лузги гречихи посевной для дальнейшего использования в качестве биологически активной добавки в косметической промышленности (*Fagorýrumes culéntum*).

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлась лузга гречихи посевная (*Fagorýrumes culéntum*), взятая с крупяного предприятия Бийска (Россия, Алтайский край).

Уже исследованы способы выделения меланина посредством щелочной экстракции NaOH и осаждения HCl с использованием избыточного и атмосферного давления с выходами до 30 % на сухую массу сырья.

Для выделения меланина с целью использования в пищевой и косметической промышленности в круглодонную колбу помещают лузгу гречихи ($d = 3$ мм) и приливают 5% раствор NaHCO_3 с использованием гидромодуля 1:15 и экстрагируют на водяной бане в течение двух часов при температуре 95 °C. Далее полученный экстракт отфильтровывают и фильтрат осаждают концентрированной щавелевой кислотой до pH=2. После полученную массу фильтруют под вакуумом, фильтрат оставляют сушить при температуре 35 °C [11, 12].

Обсуждение результатов. После проведения экстракции NaHCO_3 получили кристаллическое вещество коричневого цвета с белыми кристаллами соли, с общим выходом 6,14 г,

что составило 40,9% от массы исходного вещества. Вкрапления кристаллов соли скорее всего обусловлены образованием оксалатов натрия, из-за неполной нейтрализации щавелевой кислоты.

Заключение. В ходе проведенных исследований установили возможность использования лузги гречихи для получения фитомеланинов в качестве биологически активной добавки в пищевой и косметической промышленности. При проведении щелочной экстракции с последующим осаждением меланина соляной кислотой получают меланин порядка 11–30% в зависимости от способа получения.

Главной проблемой получения меланина химическим путем с помощью гидроксида натрия является получение неводорастворимого пигмента. Поэтому стояла задача в поиске экстрагента, используемого в косметических и пищевых целях. При проведении экстракции NaHCO_3 с последующим осаждением щавелевой кислотой, кристаллическое вещество коричневого цвета с белыми кристаллами соли с общим выходом 40,9%. Вкрапления кристаллов соли, скорее всего, обусловлены образованием оксалатов натрия из-за неполной нейтрализации щавелевой кислоты.

На сегодняшний день стоит проблема подбора экстрагента с целью получения водорастворимого пигмента, применимого в косметической и пищевой промышленности.

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ (мнемокод 0611-2020- 013; номер темы FZMM-2020-0013, ГЗ № 075-00316-20-01)

Библиографический список

1. Высоцкий Д. Современное состояние и основные тенденции рынка гречихи // Нишевые культуры: новые возможности АПК Украины : материалы Первой Международной конференции (6–7 декабря 2012 г., Киев, Украина). URL: <http://www.apk-inform.eom/ru/exclusive/topic/1012951#.VUG1dtLtlBc>.
2. Каминский В.Д., Карунский А.И., Бабич М.Б. Гречневая лузга как кормовая добавка // Хранение и переработка зерна. 2000. № 5. С. 26–31.
3. Kollias N. The spectroscopy of human melanin pigmentation in Melanin / Its Role in Human Photoprotection. Valdenmar Publishing, 1995. P. 31–38.
4. Diffey B.L., Healy E., Thody A. J. Melanin, melanocytes, and melanoma // The Lancet, 1995. Vol. 346. №. 8991-8992. P. 1713.
5. Chedekel M. R. Photochemistry and photobiology of epidermal melanins // Photochemistry and Photobiology, 1982. Vol. 35. №. 6. P. 881–885.
6. Sealy R.C., Hyde J.S., Felix C.C., et al. Novel free radicals in synthetic and natural pheomelanins: distinction between dopa melanins and cysteinyl-dopa melanins by ESR spectroscopy // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1982. Vol. 79. №. 91. P. 2885–2889.
7. Hill H.Z., Hill G.J. UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma // Pigment Cell Research. 2000. Vol. 13. №. 8. P. 140–144.
8. Mitra D., Luo X., Morgan A. et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin // Nature. 2012. Vol. 491. P. 449–453.
10. Hill H.Z. The function of melanin or six blind people examine an elephant // BioEssays, 1992. Vol. 14. №. 1. P. 49–56.
11. Жеребин Ю.М., Лях Ю.М., Бондоренко Н.А. и др. Фармакологические свойства эномеланиновых пигментов // Доклады АН УССР, 1984. № 3. Серия 5. С. 64–67.

12. Пат. 2523414 Российская Федерация, МПК А61 К36/07, В01 D11/02. Способ получения меланина из чаги / Сысоева М.А., Хабибрахманова В.Р., Никитина С.А.- 201329227/15; заявл. 25.06.2013; опубл. 20.07.14, Бюл. № 20. 3 с.

13. Малама А.А., Бабицкая В.Г., Филимонова Т.В. и др. Характеристика меланинового комплекса, образуемого грибом *Alternaria alternata* (Fries) Keissler // Прикладная биохимия и микробиология, 1998. №4. С. 426–429.

УДК 54-41

ДИАЦЕТАТ ИОДОЗОБЕНЗОЛА – СЕЛЕКТИВНЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Т.В. Функ, Ю.В. Ануфриева, П.И. Сиянко

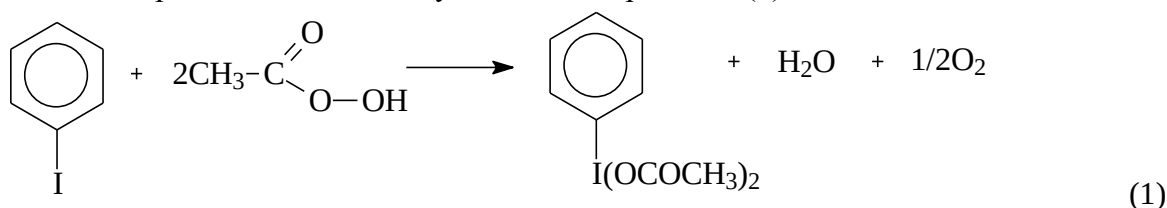
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

В работе изучен процесс окисления целлюлозы диацетатом иодозобензола в трифторуксусной кислоте, исследована зависимость степени окисления от условий проведения реакции. Содержание альдегидных групп идентифицировали методом ИК-спектроскопии.

Ключевые слова: диацетат иодозобензола, целлюлоза, окисление, диальдегидцеллюлозы.

Введение. Необходимость в окисленных продуктах целлюлозы существует в различных отраслях промышленности, медицины, косметологии. Окисление целлюлозы – одна из важнейших ее реакций, представляющая большой теоретический и практический интерес. Существует множество веществ, являющихся окислителями по отношению к целлюлозе, при взаимодействии с которыми получают различные продукты реакции [1]. Особый интерес представляют реагенты селективного действия, окисляющие гликольную группировку у второго и третьего углеродных атомов цикла до двух альдегидных групп, с разрывом пиранозного кольца и образованием диальдегидцеллюлозы (ДАЦ). Модификация целлюлозы до ДАЦ позволяет получать биологически активные текстильные материалы, которые успешно применяют в качестве антимикробного средства в раневых повязках [2]. Традиционные способы окисления иодной кислотой и периодатами являются длительными, а применение тетраацетата свинца еще и токсичны. Соединения поливалентного иода привлекают внимание исследователей из-за их низкой, по сравнению с соединениями тяжелых металлов токсичности, легкого получения и высокой реакционной способности [3]. Целью данной работы является изучение окисления целлюлозы с помощью мягкого нетоксичного селективного окислителя – диацетата иодозобензола (ДИБ).

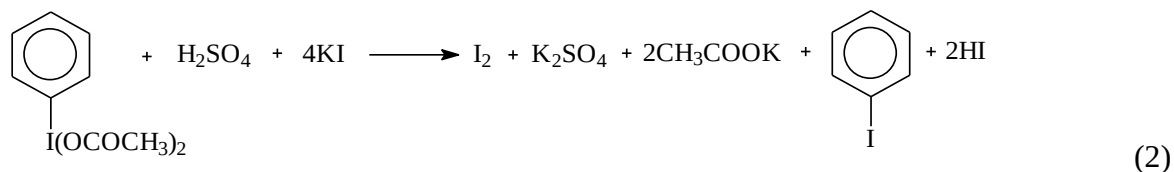
Методы и методики исследования. ДИБ получали по реакции иодбензола с надуксусной кислотой, протекающей по следующей схеме реакции (1):



В стакан помещали 20,4 г (0,1 моля) иодбензола и при интенсивном перемешивании при температуре бани 30°C добавляют по каплям в течение 30–40 минут 36 г (31 мл, 0,24 моль) 40% надуксусной кислоты. Перемешивание продолжают при той же до образования гомогенной среды. В этот период может начаться кристаллизация диацетат иодозобензола. Реакционный сосуд охлаждают в бане со льдом в течение одного часа. Кристаллический диацетат иодозобензола фильтровали на воронке Бюхнера, на фильтре промывают трижды холодной водой (порциями по 20 мл), продукт сушили в вакуумэксикаторе над хлористым кальцием. Выход диацетат иодозобензола 27,6 г (92 %). Т.пл. 158–159 °С. Чистоту продукта можно повысить до 99–100% путем перекристаллизации из 5М уксусной кислоты.

Окисление целлюлозы проводили по следующей методике: 1 г (0,006 моль) древесной порошковой целлюлозы помещают в коническую колбу емкостью 100 мл, заливают 50 мл трифторуксусной кислоты (ТФУК) и добавляют 0,0002 моль 96% серной кислоты. Затем ведут перемешивание на лабораторном шейкере до полного растворения целлюлозы. В полученный раствор вводят 2,2 г (0,0066 моль) ДИБ и продолжают перемешивание в течение определенного времени (от 3 до 4 суток). Образовавшийся продукт высаживают из раствора диэтиловым эфиром. Смесь отстаивают сутки и образовавшийся осадок фильтруют при слабом вакууме. Осадок промывают на фильтре небольшим количеством холодного диэтилового эфира. Полученный продукт досушивают в вакуумэксикаторе.

Контроль за расходом ДИБ в реакции окисления определяли по содержанию иодозоацетатных групп в отбираемых из реакционной смеси аликвотах. Анализ проводили иодометрическим методом путем восстановления ДИБ иодидом калия по схеме реакции (2) с последующим титрованием выделившегося иода тиосульфатом натрия по реакции (3).



Для определения готовили 0,1 н раствор тиосульфата натрия, 1% растворы иодистого калия и серной кислоты. Аликвоту 2 мл из реакционной колбы помещают в колбу для титрования, добавляют 10 мл серной кислоты (1%), 5 мл этилацетата. 20 мл иодида калия (1%), интенсивно перемешивают без доступа света 10–15 минут. Добавляют 1 мл крахмала, снова перемешивают и титруют 0,1 н раствором тиосульфата натрия. Для образцов диацетата йодозополистирола анализируемый раствор перед титрованием помещают на лабораторный шейкер и взбалтывают в течение от 30 минут до 6 часов в темноте. Поводили также холостой опыт без аликвоты. Расчеты производят по формулам (4, 5, 6):

$$m_{\text{ДИБ}} = \frac{N_{\text{В}} (V_{\text{В}} - V_{\text{Х}}) \mathcal{E}_{\text{ДИБ}} V_{\text{Р}}}{V_{\text{а}} \cdot 1000}, \quad (4)$$

где $m_{\text{ДИБ}}$ – масса ДИБ, пошедшая на окисление целлюлозы; $N_{\text{В}}$ – нормальность раствора тиосульфата натрия; $V_{\text{В}}$ – объем раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование;

$V_{\text{Х}}$ – объем раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование холостой пробы;

$V_{\text{Р}}$ – объем реакционной смеси; $V_{\text{а}}$ – объем аликвоты; $\mathcal{E}_{\text{ДИБ}}$ – грамм-эквивалент ДИБ (161 г-экв/моль).

$$m_{\text{ДАЦ}} = \frac{m_{\text{ДИБ}} \cdot Mr_{\text{ц}}}{Mr_{\text{ДИБ}}}, \quad (5)$$

где $m_{\text{ДАЦ}}$ – масса окисленных целлюлозных звеньев; $M_{\text{ДИБ}}$ – молекулярная масса ДИБ (322 г/моль); $M_{\text{Ц}}$ – молекулярная масса целлюлозного звена.

$$\%_{\text{ДАЦ}} = \frac{m_{\text{ДАЦ}}}{m_{\text{Ц}}} \cdot 100\% \quad (6)$$

где $m_{\text{Ц}}$ – масса целлюлозы, взятая для окисления; $\%_{\text{ДАЦ}}$ – количество окисленных целлюлозных звеньев.

Степень полимеризации целлюлозы определяли по вязкости ее раствора в кадоксене.

Результаты и их обсуждение. Для исследования окисления порошковой целлюлозы ДИБ в трифторуксусной кислоте поставили серию опытов, в которых варьировались продолжительность синтеза, количество окислителя и состав реакционной среды. Выход продуктов определили в процентах к теоретически возможному.

Условия и результаты окисления древесной порошковой целлюлозы ДИБ в среде ТФУК

ДИБ, моль	Продолжительность окисления, сутки	Выход продукта, %	Содержание окисленных целлюлозных звеньев	
			Контроль расхода окислителя, ($\Delta \pm 1,0$)%	Редуцирующая способ- ность по медному числу, ($\Delta \pm 1,6$)%
0,0066	3	93	12,3	20,3
0,0066	5	90	17,6	24,5
0,0066	7	91	19,2	27,4
0,0012	3	89	17,3	24,6
0,0012	5	76	19,6	29,3
0,0012	7	80	23,9	30,6
0,0018	3	93	18,4	26,7
0,0018	5	88	23,1	31,2
0,0018	7	85	29,6	34,8
0,0066 ¹	3	88	24,5	36,8
0,0066 ¹	5	79	32,7	44,3
0,0066 ¹	7	68	43,2	51,5
0,0066 ²	3	50	47,1	53,1
0,0066 ²	5	46	54,9	62,3
0,0066 ³	5	77	-	27,5
0,0066 ^{1,3}	5	79	-	29,4

¹ – в реакционную смесь после растворения целлюлозы (вместе с окислителем) внесены по 20 мл дитилового эфира;

² – в реакционную смесь после растворения целлюлозы (вместе с окислителем) внесены по 20 мл бензола, время коагуляции осадка один час, реакционную смесь высаживали в бензол;

³ – реакционную смесь высаживали в воду.

Из полученных данных, приведенных в таблице, следует, что выход продукта практически не зависит от условий реакции, но понижается при использовании бензола в качестве осадителя. Содержание окисленных целлюлозных звеньев увеличивается с увеличением времени окисления от трех до семи суток на 6–15%. Увеличение соотношения ДИБ и целлюлозы от 1:1 до 3:1 незначительно влияет на процесс окисления.

Отработанную методику применили для окисления хлопковой целлюлозы. При окислении в среде ТФУК, активированной 0,0002 моль серной кислоты, время растворения целлюлозы составило одни сутки. Для осаждения применяли диэтиловый эфир и ди-

стиллированную воду. В ИК-спектрах ДАЦ наблюдается характерная полоса поглощения для альдегидных групп, находящихся у второго и третьего атома углерода.

Выводы. В ходе работы разработана методика контроля содержания ДИБ в реакционной среде иодометрическим методом, что позволило контролировать протекание реакции окисления целлюлозы.

Изучено влияние на степень окисления целлюлозы следующих условий: соотношение целлюлозы и окислителя 1:1, 1:2, 1:3; времени окисления 3–7 суток; состава реакционной среды (добавление в ТФУК диметилсульфоксида, диэтилового эфира, бензола).

Выявлены оптимальные условия реакции: 1 г (0,0060 моль) целлюлозы окисляли 2,2 г (0,0066 моль) ДИБ в 50 мл ТФУК и 20 мл диэтилового эфира, продолжительность синтеза 7 суток, при 20 °С.

Продукты реакции индифицировали методом ИК-спектроскопии и методом нахождения редуцирующей способности по медному числу.

Выяснено, что диацетат иодозобензола в трифторуксусной кислоте является эффективным и селективным окислителем для древесной порошковой целлюлозы. Окисление в тех же условиях хлопковой целлюлозы протекает труднее.

Все исследования проводились на базе кафедры органической химии ИХ и ХФТ, расположенного по адресу: Россия, Алтайский край, Барнаул, пр. Красноармейский 90 (Russia, Altai Krai, Barnaul, Krasnoarmeysky Ave. 90)

Библиографический список

1. Геныш К.В., Базарнова Н.Г. Окисленная целлюлоза. Получение. Применение в медицине // Химия растительного сырья. 2013. №4. С. 13–20.
2. Пат. 2350356 Российская Федерация, МПК² А61L2/16. Антибактериальный текстильный волокнистый материал и способ его получения / Вишняков А.В., Манаева Т.В., Чашин В.А., Хотимский Д.В.; заявитель и патентообладатель Вишняков А.В., Манаева Т.В., Чашин В.А., Хотимский Д.В., заявл. 03.07.2007; опубл. 10.01.2009. Бюл.№1 – 7 с.
3. Togo H., Sakuratani K. Polymer-supported hypervalent iodine reagents // Synllet. 2002. V. 12. P. 1966–1975.

УДК 547.94:532.526:615.45

МОДЕЛИРОВАНИЕ СПОСОБА ВЫДЕЛЕНИЯ ГАРМИНА ИЗ СЫРЬЯ *PEGANUM HARMALA L.*

И.А. Хабаров¹, Б.С. Адекенов², М. Мустафин¹, А. Аманжан¹

¹Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан

²Школа инженерии и цифровых наук Назарбаев Университета, Нур-Султан, Казахстан

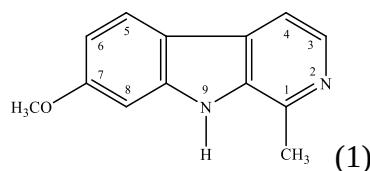
В статье рассмотрены технологические факторы, влияющие на эффективность извлечения суммы алкалоидов из корней *Peganum harmala L.* методом перколяции. Определены оптимальные параметры обработки и измельчения сырья корней гармалы обыкновенной, а также технологические параметры экстракции, обеспечивающие количественный выход суммы алкалоидов и мажорного компонента – гармина.

Разработана математическая модель экстракции сырья гармалы обыкновенной на основе полиномиального уравнения второго порядка, которая показала хорошую сходимость с экспериментальными данными.

Результаты расчетов по оптимизации технологических параметров и проведенных экспериментов свидетельствуют о перспективности применения метода перколяции и необходимости внедрения разработанной технологии извлечения алкалоидов *Peganum harmala* L. в производство субстанции нейротропного препарата «Гармина гидрохлорид».

Ключевые слова: гармалы обыкновенная, гармин, технология, перколяция, математическое моделирование, оптимизация.

Введение. Алкалоиды как перспективный класс природных соединений, обладающих широким спектром фармакологической активности, являются действующими веществами более 100 лекарственных препаратов [1]. В частности, на основе индольного алкалоида β -карболинового типа гармина (1), проявляющего цитостатическую и стимулирующую нервную систему активности, а также обладающего нейротропным действием, разработана субстанция «Гармина гидрохлорид» [2]. Сырьем для производства субстанции «Гармина гидрохлорид» являются корни *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*), содержание гармина в которых должно быть не менее 0,5%.



Гармала обыкновенная содержит еще ряд алкалоидов [3–5] и является перспективным сырьем для создания лекарственных препаратов, проявляющих антиоксидантную, противоопухолевую, противовоспалительную, антибактериальную, противовирусную виды активности [6–13].

Цель данной работы – моделирование и оптимизация технологии извлечения суммы экстрактивных веществ из сырья корней *Peganum harmala* L. методом перколяции.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования являются корни *Peganum harmala* L. Растительное сырье – корни *Peganum harmala* L., собрано в октябре 2017 г. в окрестностях пос. Акши (Алматинская область, Республика Казахстан). Гербарные образцы хранятся в коллекциях АО Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия». Сырье корней *Peganum harmala* L. сушили воздушно-теньевым способом и измельчали. Степень измельчения 2–5 мм, 7–10 мм. Содержание гармина 1,3%. Влажность сырья 9,45%.

Перколяцию проводили на экстракторе П-250 (производство компании «Артлайф», Томск, Россия). Воздушно-сухие, измельченные корни *Peganum harmala* L. до (после) подщелачивания одно-, двух-, трехкратно экстрагировали 96% этиловым спиртом в течение трех часов при перемешивании. Скорость перколирования 20 л/ч. Жидкие экстракты объединяли, упаривали на ротационном испарителе.

Переменными факторами, влияющими на выход экстрактивных веществ, явились: соотношение сырья и экстрагента, продолжительность одной экстракции, число экстракций и температура экстракции, для которых исходя из теоретических основ экстракции в равновесных условиях задали следующие ограничения на уровни: соотношение сырья и экстрагента (X_1)

от 1:10 до 1:20; температура (X_2) от 55 до 65 °C; число экстракций (X_3) от 1 до 3; степени измельчения сырья от 2 до 10 мм (X_4), предварительное подщелачивание сырья и без него (X_5).

Диапазон варьирования факторов процесса экстракции выбирали на основании предварительных экспериментов. Критерием оптимизации (Y) являлся выход суммы экстрактивных веществ.

Количественное определение гармина в экстрактах проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе «Agilent 1100» в изократическом режиме при следующих условиях: колонка размером 4.6 x 150 мм, заполненная сорбентом «Zorbax SB-C18», с размером частиц 5 мкм, подвижная фаза: ацетонитрил – 0.1 М водный раствор аммиака (1:1), скорость потока подвижной фазы: 0.5 мл/мин, детектирование при длине волны: 301 нм, температура колонки: комнатная, объем вводимой пробы: 20 мкл.

Статистическая обработка. Все измерения проведены в трехкратной повторности. Количественные результаты исследований были подвергнуты статистической обработке. Статистическую значимость различий в сравниваемых выборках оценивали при помощи t-критерия Стьюдента, статистически достоверными считали различия при $p \leq 0.05$. Накопление базы данных и ее информационно-аналитическую переработку, вычислительные операции и графическое изображение результатов исследований осуществляли на компьютере с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2003.

Результаты и их обсуждение. Ранее основу технологии извлечения суммы алкалоидов *Peganum harmala* L. для производства гармина (1) составляла экстракция методом мацерации, которая имела ряд недостатков, основным из недостатков – длительность процесса. Для оптимизации процесса извлечения составлена матрица планирования эксперимента с варьированием основных параметров экстракции (табл. 1). Диапазон варьирования факторов процесса экстракции выбирали на основании предварительных экспериментов. Критерием оптимизации (Y) являлся выход суммы экстрактивных веществ.

Таблица 1

Матрица планирования и результаты экспериментов

№	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	$Y_{\text{ср}}, \% (n=3)$
1	1:10	65	1	2-3	Подщелачивание	10,25
2	1:15	65	1	7-8	Подщелачивание	10,6
3	1:20	65	1	7-8	Подщелачивание	11,0
4	1:20	65	1	2-3	Подщелачивание	12,9
5	1:10	65	2	7-8	Подщелачивание	12,9
6	1:20	65	2	7-8	Без подщелачивания	9,55
7	1:20	60	2	7-8	Без подщелачивания	7,27
8	1:20	55	3	7-8	Без подщелачивания	7,22

Как видно из данных, приведенных в таблице 1, на выход суммы экстрактивных веществ значительное влияние оказывает предварительная обработка сырья насыщенным раствором карбоната натрия для перевода целевых веществ – алкалоидов в основания, при этом, даже увеличивая кратность экстракции до 3, при экстракции необработанного сырья выход суммы экстрактивных веществ не превышает 9,55%. Также ввиду плотной структуры корней *Peganum harmala* L. немаловажным фактором для экстракции является степень измельчения.

Так, при экстракции сырья с размером частиц 2–3 мм достигается количественный выход суммы экстрактивных веществ – 12,9% (в пересчете на воздушно-сухое сырье).

На основании экспериментальных данных рассчитаны три математические модели в виде полиномиальных уравнений второго порядка:

$$Y = -11.03 + 0.74X_1 + 0.456X_2 - 133.8X_3 + 0.7375X_4 + 2.995X_5 - 0.255 \cdot X_1 \cdot X_4 \quad (1)$$

$$Y = -21.6975 + 2.051X_1 + 0.456X_2 - 36.6X_3 + 0.7375X_4 + 3.905X_5 - 12.96 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0.225 \cdot X_1 \cdot X_4 \quad (2)$$

$$Y = -8.7375 + 0.755X_1 + 0.456X_2 - 166.2X_3 + 2.5025X_4 + 3.905X_5 - 0.225 \cdot X_1 \cdot X_4 + 32.4 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (3)$$

На основании рассчитанных моделей проведено сравнение экспериментальных и рассчитанных данных (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение экспериментальных и рассчитанных данных выходов суммы экстрактивных веществ *Peganum harmala* L.

Номер эксперимента	Экспериментальные значения, %	Математическая модель 1, %	Математическая модель 2, %	Математическая модель 3, %
1	10,25	10,25	10,25	10,25
2	10,6	10,6	10,6	10,6
3	11,0	10,925	11,0	11,0
4	12,9	12,825	12,9	12,9
5	12,9	15,06	12,9	12,9
6	9,55	9,395	9,55	9,55
7	7,27	7,115	7,27	7,27
8	7,22	7,065	7,22	7,22

Как видно из данных, приведенных в таблице 2, наибольшую сходимость с экспериментальными данными, по сравнению с моделью 1, имеют модели 2 и 3 (рис. 1), учитывающие дополнительные коэффициенты $+k \cdot X_1 \cdot X_3$ для модели 2 и $+k \cdot X_3 \cdot X_4$ для модели 3.

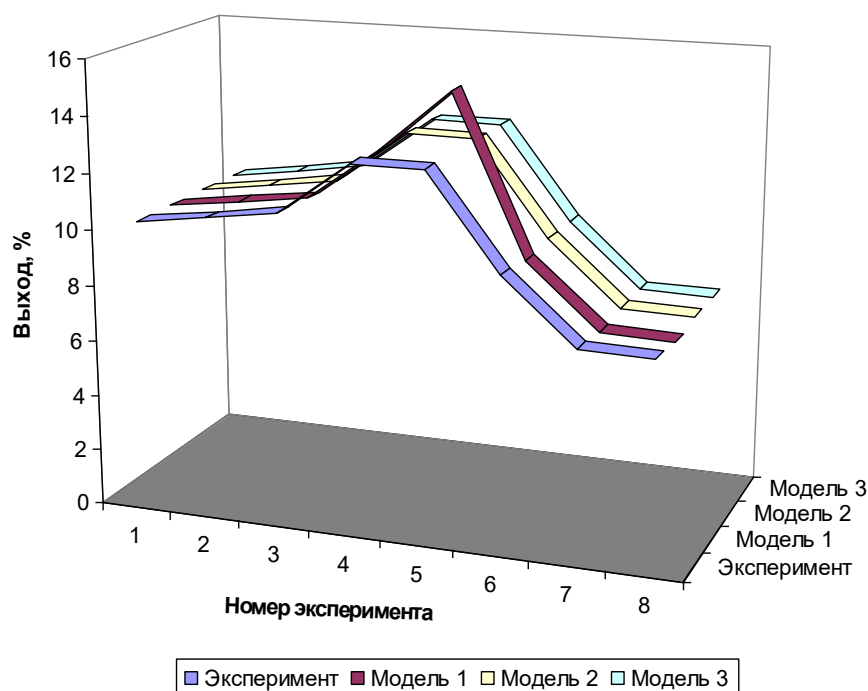


Рис. 1. Сравнение расчетных и экспериментальных данных

Таким образом, оптимальному режиму экстракции соответствуют условия экспериментов № 4 и № 5 (рис. 2).

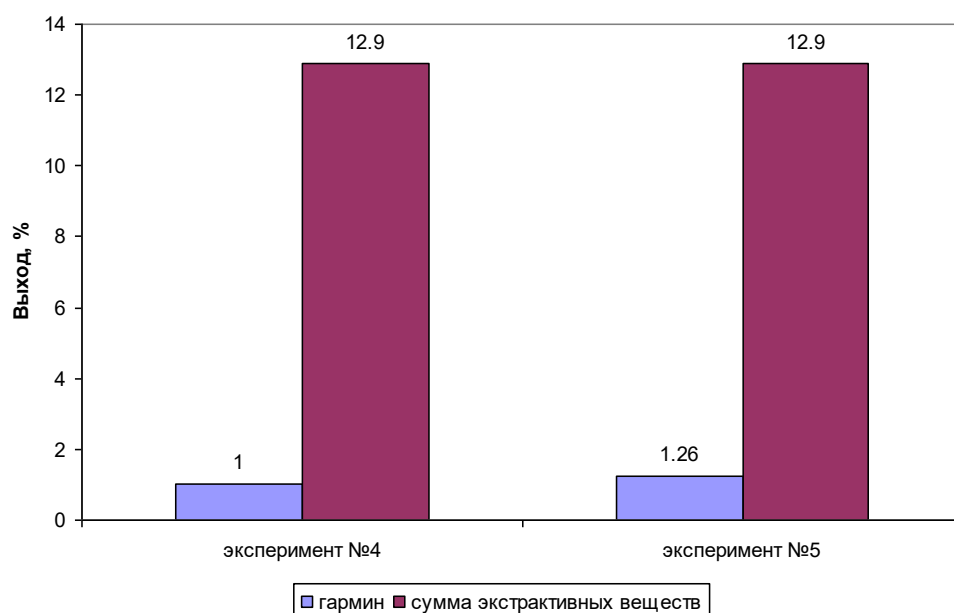


Рис. 2. Зависимость выхода гармина (1) и суммы экстрактивных веществ от метода экстракции

Как видно из данных, приведенных на рисунке 2, количественное извлечение гармина (1) (до 97 % от содержания в воздушно-сухом сырье), а также суммы экстрактивных веществ из корней *Peganum harmala* L. наблюдается при двукратной перколяции при температуре 65 °С в течение трех часов, степень измельчения сырья 2–3 мм, соотношение сырье : экстрагент 1:10 (эксперимент №5).

Заключение. Разработана математическая модель экстракции сырья гармалы обыкновенной на основе полиномиального уравнения второго порядка, которая показала хорошую сходимость с экспериментальными данными. Оптимизирована технология количественного извлечения суммы алкалоидов и мажорного компонента – гармина (степень извлечения до 97% от содержания в воздушно-сухом сырье) из корней *Peganum harmala* L. методом перколяции, при этом оптимальным режимом экстракции является степень измельчения сырья – 2–3 мм, двукратная экстракция с гидромодулем 1:10 при температуре 65 °С в течение трех часов. Результаты экспериментов свидетельствуют о перспективности применения метода перколяции и необходимости внедрения разработанной технологии извлечения алкалоидов *Peganum harmala* L. в производство субстанции нейротропного препарата «Гармина гидрохлорид».

Работа выполнена по грантовому проекту AP08052030 «Моделирование и оптимизация технологии оригинальных лекарственных препаратов», финансируемого Комитетом науки МОН Республики Казахстан

Библиографический список

1. Aniszewski T. Alkaloids. Chemistry, Biology, and Application. Amsterdam: Elsevier Science. 2015. 496 p.

УДК 661.728.7:663.1

ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТИВНОСТИ ПРОДУЦЕНТА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ *MEDUSOMYCES GISEVII* SA-12 К ГИДРОЛИЗНЫМ СРЕДАМ

А.И. Шилов^{1,2}, Н.А. Шавыркина^{1,2}

¹ *Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения
Российской академии наук, Бийск, Россия*

² *Бийский технологический институт (филиал) Алтайского государственного
технического университета им. И.И. Ползунова (БТИ АлтГТУ), Бийск, Россия*

В работе исследована зависимость выхода БНЦ, синтезируемой с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12, от состава гидролизных сред из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья. В качестве основной гидролизной среды выбрана биологически недоброкачественная среда, представляющая собой ферментативный гидролизат продукта азотнокислой обработки мискантуса. Исследован биосинтез на основной гидролизной среде и на смешевых средах, полученных путем смешивания гидролизной и контрольной сред в соотношении от 10:90 до 90:10 с шагом 10. В качестве контрольной использована полусинтетическая питательная среда, в которой в качестве субстрата использована глюкоза, а в качестве стимулятора роста продуцента – экстракт чёрного чая. На каждой среде проведено 8 циклов адаптации, при этом культуральная жидкость, полученная в предыдущем цикле адаптации, использовалась в качестве инокулята в последующем цикле адаптации. Установлено, что чем выше доля основной гидролизной среды в исследуемой питательной среде, тем меньше выход БНЦ. Выход БНЦ на основной гидролизной среде на 44–65% ниже, чем на контрольной среде. Данная зависимость справедлива для всех 8 циклов адаптации. В зависимости от цикла адаптации выход БНЦ колеблется незначительно. Независимо от доли гидролизной среды в смешевой среде наблюдается небольшое повышение выхода БНЦ в цикле II адаптации на 6–7%, однако далее выход возвращается к уровню цикла I. Проявлением адаптации можно считать сохранение способности *Medusomyces gisevii* Sa-12 к синтезу БНЦ на недоброкачественной основной гидролизной питательной среде.

Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, *Medusomyces gisevii* Sa-12, гидролизная среда, биосинтез, адаптация продуцента.

Бактериальная целлюлоза – наноматериал, который нашел широкое применение в различных областях промышленности [1].

Бактериальная целлюлоза является продуктом жизнедеятельности некоторых видов бактерий и, в отличие от растительной целлюлозы, характеризуется высокой чистотой, прочностью и эластичностью. Эти свойства, а также нетоксичность и биосовместимость, обуславливают применение бактериальной целлюлозы в биотехнологии, медицине, пищевой промышленности и при создании новых видов композитных материалов, текстиля, бумаги, в электронике [2, 3].

Проблемой в получении бактериальной целлюлозы является использование дорогих питательных сред. Для культивирования продуцентов используют среды, в состав которых входят источники углерода (глюкоза, сахароза, фруктоза, глицерол), азота (дрожжевой экстракт, пептон), фосфора, микроэлементы и биологически активные вещества. Но в экономическом отношении выгоднее использовать среды, полученные из доступных отходов биотехнологических и пищевых производств, при этом решается проблема их утилизации [4]. Кро-

ме того, перспективным направлением является получение высокоценной БНЦ из дешёвого растительного целлюлозосодержащего сырья [5].

В ИПХЭТ СО РАН БНЦ была получена из двух видов целлюлозосодержащего сырья: шелухи овса и мискантуса. Впервые в мировой практике была исследована зависимость выхода БНЦ и её свойств от способа предварительной химической обработки целлюлозосодержащего сырья [6–9]. Было показано, что выход БНЦ на мискантусных средах ниже, чем на средах из шелухи овса. Самый низкий выход БНЦ – 3,3 % был получен при обработке мискантуса азотной кислотой в одну стадию (для сравнения: выход на контрольной полусинтетической глюкозной среде составил 10%). Поэтому именно самая биологически небогатая питательная среда, полученная путем предобработки мискантуса азотной кислотой и последующего ферментативного гидролиза полученного субстрата, была использована в данной работе. Было сделано предположение, что в данной среде при технологических обработках остаются ингибирующие вещества.

Проблема снижения выхода БНЦ на гидролизных средах описана в литературе. В работе [10] приведён обзор различных питательных сред и источников углерода, продуцентов для биосинтеза целлюлозы. Приведены различные гидролизаты и выходы БНЦ из них. Установлено, что кислотные гидролизаты нуждаются в детоксикации (обычно она проводится активированным углем и/или известью), после чего выход БНЦ на них увеличивается. Ферментативные гидролизаты в детоксикации не нуждались. Разброс выходов БНЦ обусловлен различными видами сырья, способами его обработки, различными штаммами продуцентов, параметрами биосинтеза.

В работе [11] БНЦ получили путем биосинтеза на кислотном гидролизате кукурузы, в качестве продуцента использован *Acetobacter xylinum* ATCC 23767. Были определены оптимальные параметры для биосинтеза: pH = 6,8, температура 30 °C, время биосинтеза 7 дней, объем вносимого инокулята 8 %. Максимальная продуктивность на стандартной среде составляет 2,93 г/л. При очистке гидролизата активированным углем, вносимом в количестве 1,98 %, и последующей очисткой ионообменной смолой продуктивность увеличивается до 2,86 г/л (на гидролизате без обработки продуктивность составила 0,21 г/л).

Кислотный гидролизат листьев шелковицы используется в качестве питательной среды для *Acetobacter xylinum* NUST 4.2 в работе [12]. Продуктивность БНЦ на гидролизате составила 2,04 г/л, а на стандартной среде – 4,05 г/л. Авторы связывают это с тем, что среда была новой для штамма, были использованы не все аминокислоты и редуцирующие сахара. Также в среде присутствовали бактериостатические вещества, которые подавляли активность ферментативных бактерий, тем самым увеличивая цикл ферментации и уменьшая производство целлюлозы. Уменьшаются в соответствии с выходом и прочностные характеристики пленок, полученных на гидролизате.

Из кожуры картофеля путем кислотного гидролиза различными минеральными кислотами получали гидролизат, затем его нейтрализовали гидроксидом натрия. Наилучшей среди кислот оказалась азотная кислота, при этом с выходом БНЦ составил 4,7 г/л. Использован штамм *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245 [13].

В работе [14] питательная среда получена из соломы кукурузы путем автогидролиза и последующего ферментативного гидролиза. Авторами предложен способ адаптации штамма *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 к автогидролизной питательной среде. После проведения 12 циклов был получен штамм, устойчивый к ингибированию фенольными соединениями, и авторами сделан вывод об эффективной эволюционной адаптации продуцента. Наноцеллюлоза из адаптированного штамма сохранила те же свойства, что и полученная в стандартной культуральной среде.

Целью данной работы являлось исследование адаптации продуцента БНЦ *Medusomyces gisevii* Sa-12 к ферментативному гидролизату продукта азотнокислой обработки мискантуса.

Для получения основной гидролизной среды проводили ферментативный гидролиз продукта азотнокислой обработки мискантуса. Подробно получение продукта азотнокислой обработки мискантуса в 250 л емкостном аппарате, его химический состав и реакционная способность к ферментативному гидролизу и методика её определения обсуждены в работе [15]. В данной работе ферментативный гидролиз проводили в ферментёре И.Н. Павлова объёмом 11 л, концентрация субстрата составила 40 г/л. По окончании гидролиза, среду центрифугировали на центрифуге ЦЛЮ6-3 (ПАО «ДНПП», Россия) при частоте 3500 об/мин в течение 10 минут для удаления твердых взвешенных частиц.

Далее среды стандартизировали по концентрации редуцирующих веществ, приводя к содержанию редуцирующих веществ 20 г/л. Стандартизованный гидролизат доводили до кипения и использовали в качестве экстрагента для извлечения экстрактивных веществ чёрного чая (10 г/л). В качестве контрольной среды использована полусинтетическая глюкозная среда, состоящая из глюкозы (20 г/л) и экстракта чёрного чая (10 г/л). Среду готовили согласно [16]. Смесевые питательные среды готовили путём смешивания основной гидролизной и контрольной сред, варианты отражены в таблице 1.

Таблица 1

Варианты питательных сред для адаптации *Medusomyces gisevii* Sa-12 к ферментативному гидролизату продукта азотнокислой обработки мискантуса

Вариант	Количество среды, мл	
	основная гидролизная среда	полусинтетическая среда
Контроль	0	100
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50
6	60	40
7	70	30
8	80	20
9	90	10
10	100	0

Готовые среды фильтровали через металлическое сито, охлаждали до температуры (27±2)°С и использовали в качестве питательных сред. Инокулят *Medusomyces gisevii* Sa-12, полученный на полусинтетической глюкозной среде, вносили в количестве 10 % в первом цикле адаптации. Далее культуральная жидкость, полученная в предыдущем цикле адаптации, использовалась в качестве инокулята в последующем цикле адаптации и вносилась также в количестве 10 %. Биосинтез проводился в термостате ТСО-80 (Россия) в чистых, но не в стерильных условиях. Проведено 8 циклов, продолжительность каждого 7 суток. Полученные гель-пленки промывали согласно [16] и высушивали в сублиматоре BIO-RUS-4SFD (HR-7000M, Москва, Россия) согласно [17]. Масса БНЦ определялась гравиметрическим методом на лабораторных аналитических весах Explorer EX-224 (Швейцария). Выход БНЦ, рассчитанный на начальную концентрацию редуцирующих веществ в среде, представлен в таблице 2. Концентрация редуцирующих веществ определялась в пересчете на глюкозу с помощью спектрофотометра UNICO UV-2804 (United Products & Instruments, Inc., США) при

длине волны 530 нм с применением реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Panreac, Испания). Исследования проводились при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, Бийск).

Таблица 2

Выход БНЦ на гидролизных смесевых средах в процессе адаптации

№ образ-ца	Выход БНЦ, %, в цикле адаптации							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0	10,94	11,94	11,99	12,30	12,80	12,16	11,58	7,02
1	9,51	8,35	11,09	9,21	9,31	12,68	9,32	5,02
2	7,83	7,29	6,53	6,81	7,07	7,31	6,62	5,88
3	7,34	10,71	5,37	4,81	10,29	6,96	4,47	4,49
4	6,74	7,29	5,90	3,08	7,30	5,76	5,26	4,35
5	6,26	5,55	6,80	4,13	3,93	5,03	5,15	4,47
6	5,01	5,12	5,01	4,25	4,15	5,26	4,17	4,28
7	4,93	5,69	3,91	2,87	5,34	5,02	4,77	4,18
8	4,58	5,53	3,62	3,62	2,40	4,37	4,20	4,36
9	3,96	3,69	3,78	2,99	3,84	3,80	3,74	3,63
10	3,83	4,32	3,85	3,91	3,16	3,98	3,70	3,91

При исследовании выхода БНЦ на гидролизных смесевых средах в процессе адаптации наблюдали обратную пропорциональную зависимость: чем выше доля основной гидролизной среды в исследуемой питательной среде, тем ниже выход БНЦ. Выход БНЦ на основной гидролизной среде на 44–65% ниже, чем на контрольной среде. Данная зависимость справедлива для всех 8 циклов адаптации.

В зависимости от цикла адаптации выход БНЦ колеблется незначительно. Независимо от доли гидролизной среды в смесевой среде наблюдается небольшое повышение выхода БНЦ в цикле II адаптации на 6–7 %, однако далее выход возвращается к уровню цикла I. Значительное снижение выхода БНЦ в цикле VIII адаптации связано с контаминацией культуры, поскольку опыт проводился в нестерильных условиях. Однако контаминация наблюдается лишь на средах с высокой долей контрольной среды в их составе. На средах 6–10, в которых высока доля основной гидролизной среды, выход БНЦ в цикле VIII не ниже, чем выход БНЦ в цикле VII.

Проявлением адаптации можно считать сохранение способности *Medusomyces gisevii* Sa-12 к синтезу БНЦ на столь недоброкачественной питательной среде, как основная гидролизная среда (№ 10 в таблице 2), однако эволюционной адаптации, при которой наблюдается повышение выхода БНЦ, как описано в работе [14], мы не наблюдали.

Таким образом, ещё раз подтверждена уникальная способность продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12 приспосабливаться к различным неблагоприятным воздействиям среды (холодовому стрессу и тяжелой воде в работе [18], к гидролизным средам в работах [6–9], к смоделированным условиям поверхности Марса в работе [19]), в нашем случае – к недоброкачественной питательной среде; однако опровергнута возможность эволюционной адаптации, при которой выход БНЦ на гидролизной среде повысится в несколько раз в результате «привыкания» к среде симбионтов продуцента.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054)

Библиографический список

1. Болотова К.С., Чухчин К.С., Майер Д.Г., Гурьянова А.А. Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной целлюлозы // Известия высших учебных заведений. Лесной журнал. 2016. № 6(354). С. 153–156. DOI: 10.17238/issn0536-1036.2016.6.153.
2. Klemm D., Petzold-Welcke K., Kramer F., Richter T., Raddatz V., Fried W., Nietzsche S., Bellmann T., Fischer D. Biotech nanocellulose: A review on progress in product design and today's state of technical and medical applications // Carbohydrate Polymers. 2020. 117313. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117313
4. Скворцова З.Н., Громовых Т.И., Грачев В.С., Траскин В.Ю. Физико-химическая механика бактериальной целлюлозы // Коллоидный журнал. 2019. Т. 81. № 4. С. 441–452. DOI: 10.1134/S0023291219040165.
5. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назаркина М.И., Богатырева А.О., Щанкин М.В. Получение бактериальной целлюлозы на отходах пищевой промышленности // Актуальная биотехнология. 2014. № 3(10). С. 112.
6. Hussain Z., Sajjad W., Khan T., Wahid F. Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review // Cellulose. 2019. Vol.26 (5). P. 2895–2911. DOI: 10.1007/s10570-019-02307-1.
7. Sakovich G.V., Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Aleshina L.A. Technological Fundamentals of Bacterial Nanocellulose Production from Zero Prime-Cost Feedstock // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2017. V. 477. P. 357-359. DOI: 10.1134/S1607672917060047.
8. Skiba E.A., Budaeva V.V., Ovchinnikova E.V., Gladysheva E.K., Kashcheyeva E.I., Pavlov I.N., Sakovich G.V. A technology for pilot production of bacterial cellulose from oat hulls // Chemical Engineering Journal. 2020. T. 383. P. 123–128. DOI: 10.1016/j.cej.2019.123128.
9. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass // Carbohydrate Polymers. 2021. Vol. 252. P. 117-178. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117178.
10. Sakovich G.V., Skiba E.A., Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V. *Miscanthus* is the feedstock for bacterial nanocellulose production // Doklady Chemistry. 2020. Vol. 495. № 2. P. 205–208. DOI: 10.1134/S0012500820120034.
11. Гладышева Е.К., Скиба Е.К. Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы на альтернативных питательных средах: обзор // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2018. Т. 14. № 1. С. 92–101.
12. Cheng Z., Yang R., Liu Xu., Liu Xiao., Chen Xua. Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis liquor of agricultural corn stalk used as carbon source // Biore-sour. Technol. 2017. Vol. 234. P. 8–14. DOI: 10.1016 / j.biortech.2017.02.131.
13. Chen J., Chen C., Liang G., Xu X., Hao Q., Sun D. In situ preparation of bacterial cellulose with antimicrobial properties from bioconversion of mulberry leaves // Carb. Polym. 2019. Vol. 220. P. 170-175. DOI: 10.1016 / j.carbpol.2019.05.062.
14. Abdelraof M., Hasanin M.S., El-Saied H. Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose // Carbohydr. Polym. 2019. Vol. 211. P. 75–83.
15. Vasconcellos V.M., Farinas C.S., Ximenes E., Slininger P., Ladisch M. Adaptive laboratory evolution of nanocellulose-producing bacterium // Biotechnol. Bioeng. 2019. Vol. 116. Iss. 8. P. 1923–1933. DOI: 10.1002 / bit.26997.

16. Kashcheyeva E.I.; Gismatulina Y.A.; Budaeva V.V. Pretreatments of Non-Woody Cellulosic Feedstocks for Bacterial Cellulose // Synthesis. Polymers. 2019. Vol. 11. №10. P. 1645. DOI: 10.3390/polym11101645.
17. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // Applied Biochemistry and Microbiology. 2018. Vol. 54. №. 2. P. 179–187. DOI: 10.1134/S0003683818020035.
18. Павлов И.Н., Кузнецов П.С., Шилов А.И. Исследование процесса сублимационной сушки бактериальной наноцеллюлозы // Ползуновский вестник. 2020. № 4. С. 88–94. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2020.04.017.
19. Kutysenko V.P., Yurkevich D.I. Influence of heavy water on the metabolism of a symbiotic organism // Biophysics. 2003. Vol. 48. № 4. P. 648–656.
20. Podolich O., Kukhareno O., Haidak A., Zaets I., Zaika L., Storozhuk O., Palchikovska L., Orlovska I., Reva O., Borisova T., Khirunenko L., Sosnin M., Rabbow E., Kravchenko V., Skoryk M., Kremenskoy M., Demets R., Olsson-Francis K., Kozyrovskaya N., de Vera J.-P.P. Multi-microbial Kombucha Culture Tolerates Mars-Like Conditions Simulated on Low-Earth Orbit // Astrobiology. 2019. Vol. 19. №2. DOI: 10.1089/ast.2017.1746

УДК 664.286

ПОЛУЧЕНИЕ СУКЦИНАТОВ КРАХМАЛА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Е.Ю. Шумилова, А.В. Протопопов

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

В статье рассмотрены закономерности получения сложных эфиров крахмала с янтарной кислотой и изучены реологические свойства полученных сукцинатов крахмала. В ходе работы изучено получение сукцинатов крахмала в среде толуола, а также с применением в качестве катализатора сульфата алюминия. Показано, что с применением катализатора можно получить практически трехзамещенные сукцинаты крахмала. Образование сложных эфиров крахмала подтверждено методом ИК-спектроскопии. Исследованы реологические свойства полученных сложных эфиров крахмала и определена изоэлектрическая точка для сукцинатов крахмала. Изучена солюбилизующая способность сукцинатов крахмала к растительному маслу.

Ключевые слова: ацилирование, крахмал, сукцинаты крахмала, сложные эфиры крахмала.

После сорока лет тихого накопления проблема пластиковых отходов недавно привлекла к себе тревожное внимание: научные отчеты указывают на широкое распространенное и повсеместное загрязнение пластиковыми отходами в мировом океане. Ученые и исследователи в своих работах предоставляют фотографии морских птиц и млекопитающих, которые ошибочно употребляют в качестве пищи пластик, а также запутываются в пластиковом мусоре. Пластиковые отходы десятилетиями сохраняются в окружающей среде без биологического разложения, поэтому они просто накапливаются в природе. Они медленно распадаются на токсичные компоненты, которые были обнаружены в крови и моче человека. Хотя мало что известно о воздействии пластмасс на здоровье человека, предполагается, что они нарушают работу эндокринной системы, что приводит к аномалиям репродуктивных органов и др. Все вышесказанное свидетельствует о том, что необходимо создание материала, кото-

рый бы легко поддавался биоразложению без ущерба окружающей среде. Одним из таких материалов является биопластик.

Биопластики могут заменить обычные пластмассы и способны разлагаться после утилизации в окружающей среде. В современном мире активно ведутся разработки различных методик по созданию материалов данного типа [1].

В последнее время наблюдается большой интерес к исследованиям термопластичного крахмала из-за его биоразлагаемости и биологически устойчивого источника. Температуры стеклования и плавления натурального сухого крахмала выше, чем температура его термического разложения. Препятствием к использованию крахмала в пластмассах является его хрупкая природа из-за относительно высокой температуры стеклования и отсутствия релаксации основной цепи ниже нее. Кроме того, со временем хрупкость увеличивается из-за релаксации свободного объема и ретроградации. Таким образом, в отличие от других синтетических термопластичных полимеров, крахмал может быть только переработан в термопластичный материал, обеспечивая пластификацию молекул крахмала.

Ацилирование картофельного крахмала увеличивает отрасли его применения. Модификация крахмала способствует внедрению новых функциональных групп, а также позволяет варьировать степень замещения получаемых сложных эфиров крахмала. Крахмал является одним из главных компонентов для производства разнообразных продуктов с улучшенными потребительскими свойствами [2]. Актуальность работы заключается в усовершенствовании свойств сложных эфиров крахмала для их использования в различных отраслях. Использование модифицированного крахмала снижает себестоимость продукта, следовательно, данный фактор показывает перспективы разработки данной тематики. Методика ацилирования крахмала основана на ранее апробированной методике получения сложных эфиров целлюлозы и лигнина [3, 4].

Синтез проводили в мольном соотношении *янтарная кислота: крахмал* как 3:1. Синтез состоит из двух стадий: 1) получение ацилирующего агента – хлорангидрида янтарной кислоты; 2) ацилирование крахмала полученным хлорангидридом янтарной кислоты.

Синтез проводили с варьированием температуры от 35 °С до 65 °С с шагом в десять градусов и продолжительностью от одного до пяти часов. Термостатирование проводилось на водяной бане с автоматическим термостатом. Полученный продукт промывали спиртом на фильтрах Шотта и высушивали до воздушно-сухого состояния.

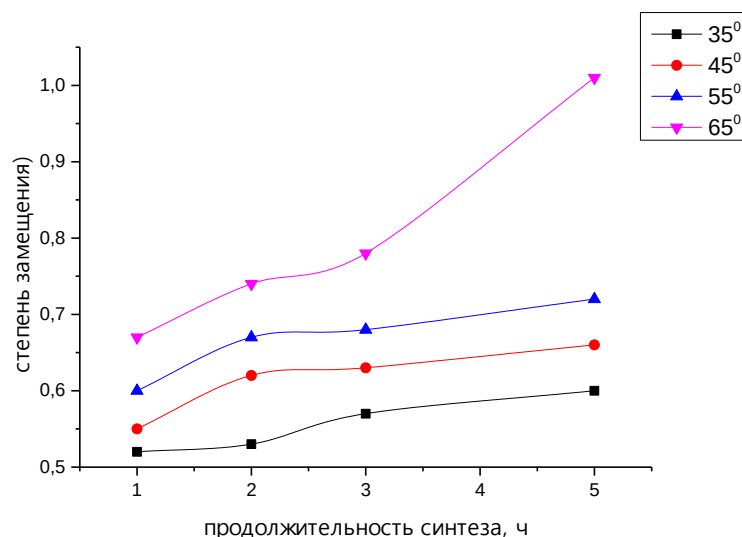


Рис. 1. Степень замещения в сложных эфирах крахмала при различных температурах

Повышение температуры и времени синтеза приводит к возрастанию степени замещения в полученных продуктах. В этих условиях возможно получение однозамещенного эфира крахмала (рис. 1).

Исследование методом ИК-спектроскопии полученных продуктов показало образование сложноэфирной связи, в спектрах продуктов появляются полосы поглощения в области 1740 и 1220 см^{-1} (рис. 2).

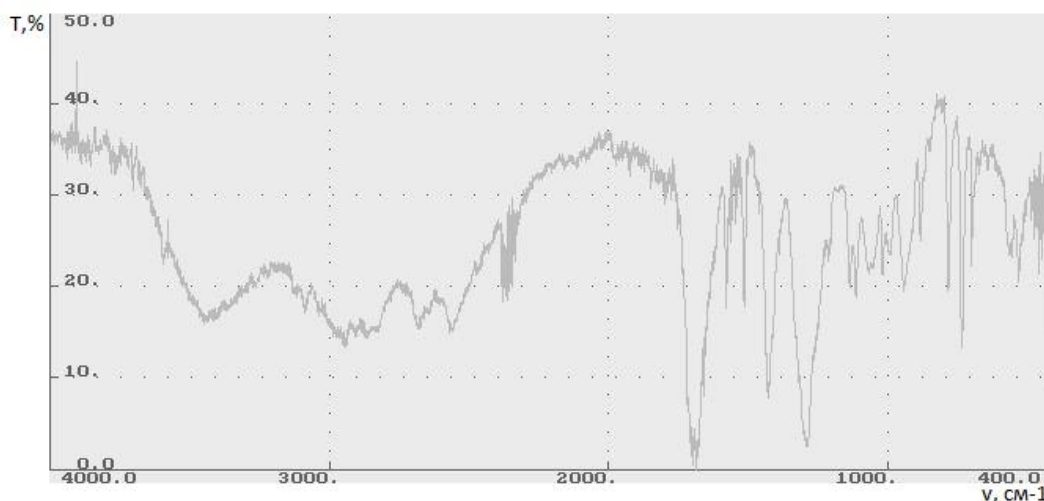


Рис. 2. ИК-спектр полученных сложных эфиров крахмала

Ацилирование является одним из эффективных способов денатурации, крахмал можно модифицировать физическими, химическими или ферментативными методами, которые эффективно применяются в пищевой, текстильной, бумажной, нефтехимической и фармацевтической промышленности в зависимости от его различных свойств.

Как и в предыдущих условиях, проведен синтез сложных эфиров крахмала с янтарной кислотой, но в данном случае использовался катализатор – в присутствии сульфата алюминия. Полученные продукты анализировали на содержание связанной кислоты в полученном сложном эфире крахмала (рис. 3).

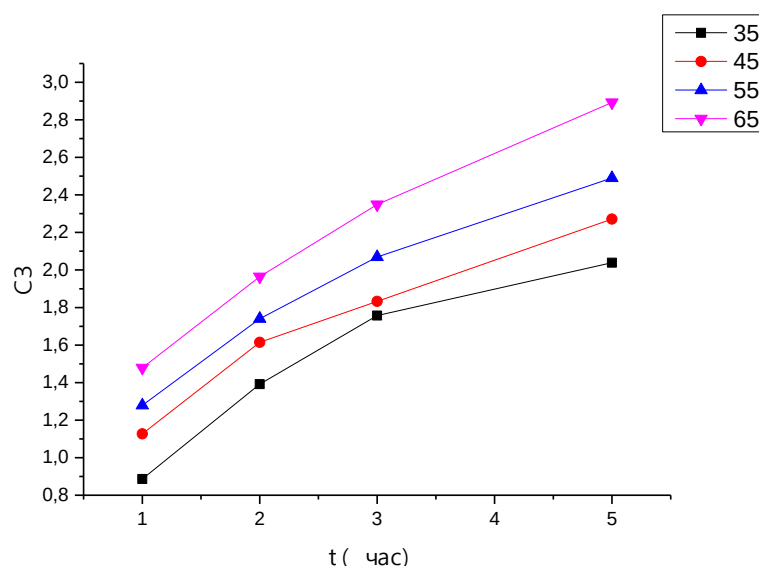


Рис. 3. Степень замещения в сложных эфирах крахмала

С увеличением продолжительности и температуры синтеза наблюдается возрастание степени замещения в полученных продуктах. При этом достигнутая степень замещения составляет практически от одно- до трехзамещенного сложного эфира. Как показывают полученные данные, использование сульфата алюминия в качестве катализатора позволяет повысить содержание связанной кислоты. Данный факт можно объяснить созданием более интенсивной ионной среды, способствующей реакции ацилирования крахмала.

Для полученных сложных эфиров крахмала нами было изучено влияние pH среды на вязкость растворов и структурообразование. Вязкость растворов измерялась на вискозиметре Убеллоде (рис. 4).

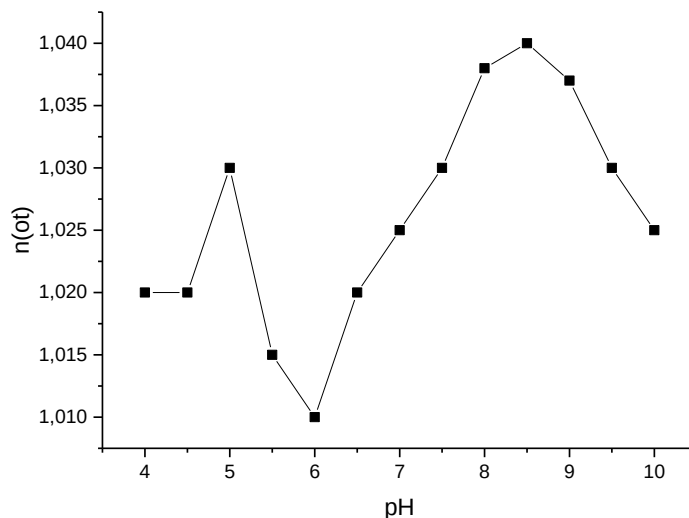


Рис. 4. Зависимость вязкости раствора от pH среды

Вязкость раствора изменяется нелинейно с ростом pH среды, при этом наблюдается минимум вязкости при нейтральном pH. При подкислении раствора вязкость при сравнении с переходом в щелочную область незначительно возрастает, а в более кислой среде происходит некоторое ее снижение, в щелочной среде – резкий скачок вязкости.

Зависимость оптической плотности раствора сложного эфира крахмала от pH среды показывает экстремальный характер с максимумом при pH 6-7 (рис. 5).

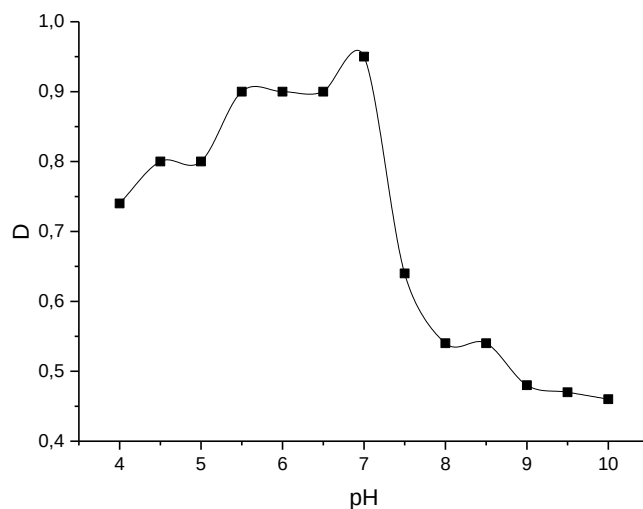


Рис. 5. Зависимость оптической плотности раствора сложного эфира крахмала от pH среды

Из полученных данных можно предположить образование изоэлектрической точки сукцината крахмала при нейтральном pH среды.

Для полученных сложных эфиров крахмала нами было изучена солюбилизующая способность растворов крахмала по отношению к растительному маслу. В пищевой промышленности сложные эфиры крахмала используются в качестве эмульгаторов и загустителей, в частности для получения загущенных сред из растительного масла в производстве

кондитерских изделий. Солюбилизирующая способность сложных эфиров крахмала исследовалась турбодиметрическим методом путем получения растворов с различным содержанием растительного масла в растворе сложного эфира крахмала с заданной концентрацией (рис. 6).

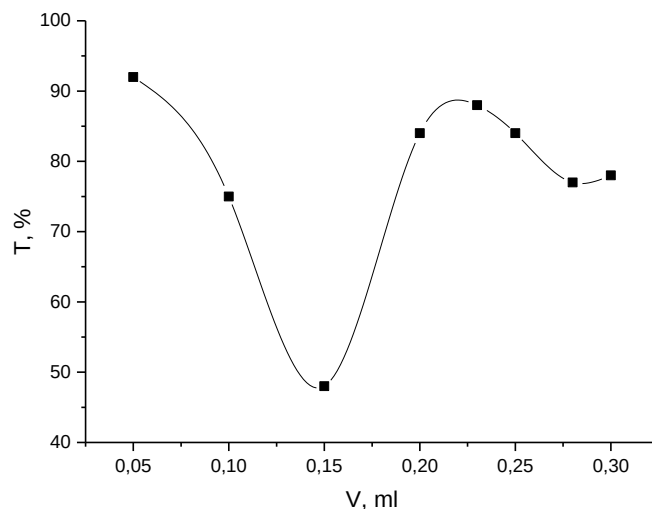


Рис. 6. Зависимость светопропускания от содержания растительного масла в растворе сложного эфира крахмала

Полученные значения показывают хорошую растворимость растительного масла в растворе сложного эфира крахмала.

Полученные нами сложные эфиры крахмала могут быть в дальнейшем модифицированы для изготовления биопластика.

Предложенный метод позволяет получать самые различные сложные эфиры крахмала с карбоновыми кислотами, тем самым широко варьируя эмульгирующие свойства получаемых модифицированных крахмалов и область их применения.

Библиографический список

1. Almanza-Benitez S., Osorio-Díaz P., Méndez-Montealvo G., et al. Addition acid-treated unripe plantain flour modified the starch digestibility, indigestible carbohydrate content and antioxidant capacity of semolina spaghetti // *LWT – Food Science and Technology*. 2015. V. 62 (2). P. 1127–1133.
2. Nawaz H., Waheed R., Nawazand M., et al. Physical and chemical modifications in starch structure and reactivity // *Journal of Cereal Science*. 2020. V. 27. P. 301–314.
3. Jianhua L., Wang B., Lin L., et al. Functional, physicochemical properties and structure of cross-linked oxidized maize starch // *Food Hydrocolloids*. 2014. V. 36 (0). P. 45–52.
4. Patkar M.S., Prasad R.R., Rahate K.S., et al. Extraction and Characterization of Starch from Tubers and its Application as Bioplastic // *Polymer International*. 2014. Vol. 56. No.11. P. 1440–1447.
5. Protopopov A.V., Klevtsova M.V., Konshin V.V. et al. Chemical modification of lignins by amino acids // *Chemistry of Natural Compounds*. 2015. № 51. P. 934–936. DOI: 10.1007/s10600-015-1451-0.
6. Efryushin D.D., Konshin V.V., Protopopov A.V., et al. Modification of technical lignins by carboxylic acids // *Chemistry of Natural Compounds*. 2015. № 51. P. 1007–1008. DOI: 10.1007/s10600-015-1451-0.

УДК 579.0

ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ BACILLUS SUBTILIS

Е.С. Яценко, Л.В. Затонская, В.А. Петухов, П.В. Лыков
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

В статье представлены результаты исследования элементного состава спор *Bacillus subtilis*. Рекомендованы соли, которые, по мнению авторов, повышают эффективность питательных сред. Выявлены соли металлов, оказывающие эффект ингибирования на рост микроорганизмов.

Ключевые слова: питательные среды, элементный состав, *Bacillus subtilis*, споры микроорганизмов, глубинное культивирование.

Bacillus subtilis является одним из представителей вида аэробных спорообразующих почвенных бактерий. Спорообразование бактерий – сложный многостадийный процесс. Интенсивность спорообразования культур зависит от способа культивирования, состава питательных сред, условий выращивания культуры [1]. Необходимо наличие в питательной среде минеральных солей, содержащих ионы Ca, Mg, K, Mn, Fe, Zn, Cu и других металлов. В отсутствии некоторых из них, прежде всего Ca, Mg, Mn, спорообразование может происходить замедленно или же вообще не наблюдаться [2].

Цель работы – проанализировать элементный состав спор *Bacillus subtilis* и выявить металлы, оказывающие эффект ингибирования на рост микроорганизмов.

Культивирование микроорганизмов проводилось глубинными методом, использованием питательной среды в состав которой входили следующие соли: дигидрофосфат натрия, гидрофосфат калия, сульфат магния, сульфат марганца, хлорид натрия, хлорид кальция, сульфат железа (II). После культивирования споры были лиофилизированы. Затем навеску спор 1 г добавляли 20 мл концентрированной азотной и 10 мл концентрированной фтористоводородной кислоты, перемешивали и нагревали до 100 °С. Пробу охлаждали. Переносили в колбу на 50 мл до метки дистиллированной водой. Элементный состав определяли на спектрофотометре с индуктивно связанной плазмой эмиссионном Optima. По ПНДФ 16.1:2.3:3.11-98. Методика выполнения измерений содержания металлов в твердых объектах методом спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Элементный состав спор *Bacillus subtilis*

Исследуемый ингредиент	Концентрация в мг/кг							
	Bacillus subtilis B-2918	Bacillus subtilis B- 1323	Bacillus subtilis B- 4828	Bacillus subtilis B- 5449	Bacillus subtilis B- 12079	Bacillus subtilis B- 2895	Bacillus subtilis B- 2896	Среднее значение
Ca	6585	13280	24340	18280	21340	22150	14690	17238
P	6323	13160	15200	9298	12580	13500	10200	11466
K	12800	10140	7794	5254	6940	5858	7459	8035
Na	15600	4371	3958	4256	2403	3247	2427	5180
Mg	1423	2544	2727	1803	2497	2591	1669	2179
Fe	113	800	2134	619	983	1300	899	978
Cu	5	516	314	4	348	514	338	291
Zn	58	157	147	110	161	191	102	132
Cr	45	57	30	31	36	30	34	38
Среднее значение	4313	4689	5681	4157	4865	5176	4223	

Выявлено, что самое большое содержания в споре кальция и фосфора. Содержание калия, натрия, магния также высокое. Концентрация алюминия, бария, кобальта, селена, ванадия, бора и стронция в споре от 1 до 30 мг/кг. Концентрация титана, никеля, мышьяка, свинца, кадмия менее 1 мг/кг. Концентрация серебра, олова и сурьмы во всех пробах равна нулю. Самое большое содержание исследуемых элементов обнаружено в штамме *Bacillus subtilis* В- 4828.

Для выявления ингибирующей способности солей металлов на рост микроорганизмов проводилось глубинное культивирование *Bacillus subtilis* В-12079 с использованием солей: нитрат кадмия ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), нитрат висмута ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$), хлорид олово 5-водный ($\text{SnCl}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), хлорид олова (SnCl_2), хлорид сурьмы (SbCl_3), которые были добавлены в жидкую стандартную питательную среду в концентрациях 1 и 2 мг/л. В жидкую среду вносили 0,1 г лиофилизированных спор *Bacillus subtilis* В-12079. Затем микроорганизмы культивировали при температуре 37 °С 24 часа, после чего был осуществлен пересев на стандартные агаризованные питательные среды и термостатирование 24 часа при температуре 37 °С. Затем производили подсчёт колоний. В качестве контрольной пробы использовали стандартные среды без добавления дополнительных солей. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние солей некоторых металлов на динамику численности *Bacillus subtilis* в процессе культивирования

Навеска солей (г)	Количество микроорганизмов (КОЕ/1МЛ)					Контрольная проба
	($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$)	($\text{SnCl}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	(SnCl_2)	(SbCl_3)	
1	500±50	50±10	60±10	800±100	30±10	3000±200
2	30±10	30±5	20±5	30±10	3±3	

Из таблицы видно, что все исследуемые соли обладают ингибирующим эффектом. Причем с ростом концентрации солей эффект увеличивается. Самым сильным ингибитором является хлорид сурьмы. Несмотря на высокую токсичность сурьмяного масла при концентрации 2 мг/л полной летальности микроорганизмов не достигнуто, что свидетельствует о высокой устойчивости *Bacillus subtilis* к химическим факторам среды.

Следовательно, при разработке эффективных питательных сред для *Bacillus subtilis* необходимо использовать соли кальция, фосфора, калия, натрия, магния. Соли серебра, олова, кадмия и сурьмы обладают подавляющим действием на рост микроорганизмов и не могут быть использованы для питательных сред.

Библиографический список

1. Романовская Т.В. Интенсификация спорообразования бактерий рода *Bacillus* как основа повышения эффективности биопестицидов. URL: <https://elib.belstu.by/bitstream/> (дата обращения: 04.07.21).
2. Лиморенко А.П. Разработка технологии глубинного способа культивирования микроорганизмов *B. subtilis* и *B. licheniformis* для производства пробиотиков. URL: <https://www.dissercat.com/content/> (дата обращения: 04.07.21).

Научное издание

**МАТЕРИАЛЫ III МЕЖДУНАРОДНОГО БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
СИМПОЗИУМА «БИО – АЗИЯ АЛТАЙ 2021»**

Барнаул, Алтайский край, Россия
23-26 сентября 2021 г.

Ответственные за выпуск: *О.Н. Мироненко, О.В. Бычкова*

Редактор *Л.И. Базина*
Подготовка оригинал-макета *С.И. Тесленко*
Дизайн обложки: *М.В. Белоруков*

ЛР 020261 от 14.01.1997.
Подписано в печать 13.12.2021. Вышло в свет 22.12.2021.
Бумага офсетная. Усл.-печ. л. 29,76.
Тираж 100 экз. Заказ № 527

Издательство Алтайского государственного университета

Типография Алтайского государственного университета
656099 Барнаул, ул. Димитрова, 66