

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
К.Г. Скрябин (Москва), Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Василев* 4

Оригинальные статьи

Очистка муниципальных сточных вод г. Владимира с помощью технологии вермифильтрации.
И.Н. Титов, Фарзах Фаваз Салим Фатах, Н.П. Ларионов 5

Очистка муниципальных сточных вод г. Владимира с помощью технологии вермифильтрации для получения дезинфицированной воды, пригодной для ирригации.
И.Н. Титов, Фарзах Фаваз Салим Фатах, Н.П. Ларионов 9

Полифункциональный ферментный биопрепарат на основе гексагистидинсодержащей органофосфат-гидролазы, действующий против бактериоза растений.
А.Г. Асланлы, О.В. Маслова, О.В. Сенько, Е.Н. Ефременко 13

Изучение структуры биоПАВ, синтезируемых микроорганизмами, выделенными из поверхностных вод и седиментов Балтийского моря.
К.В. Петриков, А.А. Ветрова, А.А. Иванова, Я.А. Делеган, А.Б. Гафаров, С.Л. Соколов 18

Биокаталитическое получение альгината, продуцируемого клетками *Azotobacter vinelandii* в иммобилизованной форме. *Н.А. Степанов, Е.Н. Ефременко* 25

Получение гидрогелей ПВС-ксантана и анализ их применимости как носителей хлорофилла.
Н.П. Бабиченко, А.Ю. Шаталова, П.М. Готовцев, Г.У. Бадранова, Я.Э. Сергеева, К.В. Горин, Р.Г. Василев 31

Биосенсор на основе иммобилизованных в модифицированные силикагели метилотрофных дрожжей для мониторинга процесса брожения.
О.А. Каманина, Д.Г. Лаврова, В.А. Арляпов, О.Н. Пономарева 40

Экспрессия маркеров воспаления и белков антиоксидантной защиты в гиппокампе при болезни Альцгеймера.
С.А. Крынский, М.И. Сорокин, И.К. Малашенкова, Р.Г. Василев, А.А. Селищева 46

Использование инструментария базы данных DEPPDB для изучения роли электростатики в регуляции транскрипции прокариот.
А.А. Осипов, Е.А. Крутинина, Г.Г. Крутинин, П.М. Бескаравайный, С.Г. Камзолова 55

Антимикробные свойства штамма *Bacillus subtilis* 534 – основы лекарственного препарата пробиотика споробактерина.
И.А. Маланичева, М.Х. Кубанова, В.А. Алферова, В.А. Коршун, И.В. Драбкина, Т.В. Крупенио, О.В. Ефременкова, Н.И. Габриэлян 59

Композиты на основе бактериальной целлюлозы с добавлением аллогенного гидроксиапатита, карбокси-метилцеллюлозы и коллагена.
В.В. Ревин, Н.А. Кленова, Е.В. Писарева, М.Ю. Власов, Н.А. Редькин, Э.П. Белоусова, К.Н. Тукмаков, Ю.А. Маркова, Э.Ю. Сосова, Ю.В. Зубкова, М.А. Даниэль, Е.Г. Литвинова 66

Обзоры

Анализ существующих подходов к изучению движения носителя заряда по нуклеиновым кислотам.
М.А. Галченкова, П.М. Готовцев, Р.Г. Василев 74

Отходы лесозаготовок и деревообрабатывающей промышленности как исходное сырье для получения биогаза.
О.В. Сенько, Д.А. Слюсарев, О.В. Маслова 89

Правила для авторов 94

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. R.G. Vasilov 4

Original articles

Municipal wastewater treatment using the technology of the vermifiltration.

I.N. Titov, Farzah Fawaz Salim Fatah, N.P. Larionov 5

Production of disinfected water suitable for irrigation after treatment municipal wastewater using of vermifiltration technology.

I.N. Titov, Farzah Fawaz Salim Fatah, N.P. Larionov 9

Polyfunctional enzyme biopreparation based on hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase, acting against bacteriosis of plants.

A.G. Aslanli, O.V. Maslova, O.V. Senko, E.N. Efremenko 13

Study of the structure of biosurfactants synthesized by microorganisms isolated from surface waters and sediments of the Baltic Sea.

K.W. Petrikov, A.A. Vetrova, A.A. Ivanova, Ya.A. Delegan, A.B. Gafarov, S.L. Sokolov 18

Biocatalytic preparation of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* cells in immobilized form.

N.A. Stepanov, E.N. Efremenko 25

Preparation of PVA-xanthan hydrogels and analysis of their applicability as carriers of chlorophyll.

N.P. Babichenko, A.Yu. Shatalova, P.M. Gotovtsev, G.U. Badranova, Ya.E. Sergeeva, K.V. Gorin, R.G. Vasilov .. 31

Biosensor based on methylotrophic yeast immobilized in modified silica gel to monitor the fermentation process.

O.A. Kamanina, D.G. Lavrova, V.A. Arlyapov, O.N. Ponamoreva 40

Expression of inflammatory markers and proteins of antioxidant protection in the hippocampus in Alzheimer's disease.

S.A. Krynskiy, M.I. Sorokin, I.K. Malashenkova, R.G. Vasilov, A.A. Selischeva 46

Using the DEPPDB database toolkit to study the role of electrostatics in the regulation of prokaryotic transcription.

A.A. Osyrov, E.A. Krutinina, G.G. Krutinin, P.M. Beskaravayny, S.G. Kamzolova 55

Antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* 534 strain – the base of probiotic drug Sporobacterin.

I.A. Malanicheva, M.Kh. Kubanova, V.A. Alferova, V.A. Korshun, I.V. Drabkina, T.V. Krupenio,

O.V. Efremenkova, N.I. Gabrielyan 59

Composites based on bacterial cellulose with the addition of allogenic hydroxyapatite, carboxymethylcellulose and collagen.

V.V. Revin, N.A. Klenova, E.V. Pisareva, M.U. Vlasov, N.A. Redykin, Z.P. Belousova,

K.N. Tukmakov, U.A. Markova, E.U. Sosova, U.V. Zubkova, M.A. Daniel, E.G. Litvinova 66

Reviews

An analysis of existing approaches to the study of the motion of a charge carrier along nucleic acids.

M.A. Galchenkova, P.M. Gotovtsev, R.G. Vasilov 74

Waste from logging and wood processing industry as substrates for biogas production.

O.V. Senko, D.A. Sliusarev, O.V. Maslova 89

Rules for authors 94

К читателям

В 4-м номере 2017 г. помещены оригинальные и обзорные исследования по разным аспектам биотехнологии, биохимии, микробиологии.

И.Н. Титов с соавторами (Владимирский государственный университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых) представили материалы по очистке муниципальных сточных вод г. Владимира с помощью технологии вермифльтрации.

Асланлы А.Г. с коллегами из МГУ им. М.В. Ломоносова исследовали полифункциональный ферментный биопрепарат на основе гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы, действующий против бактериоза растений.

Сотрудниками Пуштинского Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (Петриков К.В. и др.) изучена структура биологических поверхностно-активных веществ, синтезируемых микроорганизмами, выделенными из поверхностных вод и седиментов Балтийского моря.

Степанов Н.А., Ефременко Е.Н. (МГУ им. М.В. Ломоносова) описали процесс биокаталитического получения альгината, продуцируемого клетками *Azotobacter vinelandii* в иммобилизованной форме.

Группа авторов из Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева и НИЦ «Курчатовский институт» (Бабиченко Н.П. и др.) синтезировала гидрогели на основе поливинилового спирта и ксантана и проанализировала их применимость в качестве носителей хлорофилла.

Исследователи из Тульского государственного университета Каманина О.А. и др. создали биосенсор на основе иммобилизованных в модифицированные силикагели метилотрофных дрожжей, который предполагается использовать для мониторинга процесса брожения.

Крынский С.А. с коллегами (НИЦ «Курчатовский институт», МГУ им. М.В. Ломоносова) изучили экспрессию ряда ключевых генов естественного иммунитета и воспаления, а также окислительного стресса в гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера.

Осипов А.А. и др. (Институт ВНД и нейрофизиологии РАН, Институт биофизики клетки РАН) использовали инструментарий базы данных DEPRDB для изучения роли электростатики в регуляции транскрипции прокариот.

Сотрудники московских институтов – НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе и Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова – Маланичева И.А. и др. исследовали антибиотическую активность штамма *Bacillus subtilis* 534.

Коллектив ученых из Самары и Пушино (Ревин В.В. и др.) сообщил о новом методе получения и свойствах биоорганических композитов на основе бактериальной целлюлозы, продуцируемой *Gluconacetobacter sucrofermentans* В-11267.

Наконец, публикуются две обзорных статьи: «Анализ существующих подходов к изучению движения носителя заряда по нуклеиновым кислотам» (Галченкова М.Ю., Готовцев П.М., Васильев Р.Г. – МФТИ, НИЦ «Курчатовский институт») и «Отходы лесозаготовок и деревообрабатывающей промышленности как исходное сырье для получения биогаза» (Сенько О.В., Слюсарев Д.А., Маслова О.В. – МГУ им. М.В. Ломоносова, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, МВТУ им. Н.Э. Баумана).

Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ

ОЧИСТКА МУНИЦИПАЛЬНЫХ СТОЧНЫХ ВОД Г. ВЛАДИМИРА С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ ВЕРМИФИЛЬТРАЦИИ

И.Н. ТИТОВ*, ФАРЗАХ ФАВАЗ САЛИМ ФАТАХ, Н.П. ЛАРИОНОВ

ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени А.Г и Н.Г. Столетовых», Владимир

Представлены результаты по очистке муниципальных сточных вод г. Владимира с помощью новой технологии вермифильтрации. Показано, что по основным показателям качества воды БПК₅, ХПК и содержанию взвешенных частиц происходило снижение на 96,16, 77,43 и 77,43%, соответственно. Сточные воды после вермифильтрации не обладали фитотоксичностью для растений тритикале и содержали в себе ростостимулирующие вещества.

Ключевые слова: вермикультура, рециклинг органических отходов, сточные воды, вермифильтрация.

Введение

На городские очистные сооружения г. Владимира ежедневно поступает около 80000 м³ сточных вод, при обработке которых образуется около 90 м³ осадков сточных вод. Сточные воды представляют собой зловонные мутные жидкости, обогащенные минеральными и органическими веществами, в которых содержание воды достигает до 99%. Кроме органических и неорганических поллютантов, в них могут содержаться патогенные микроорганизмы, инвазионные яйца и личинки гельминтов, опасные для человека, и разнообразные ксенобиотики.

Для очистки сточных вод в настоящее время широко используются биологические методы, но они обладают двумя основными существенными недостатками:

- образуются вторичные загрязнения в виде сырого осадка сточных вод;
- накапливаются большие объемы избыточного активного ила, образующегося в процессе биологической очистки.

В последние годы для очистки сточных вод (бытовых и промышленных) стала применяться технология вермифильтрации с использованием дождевых (компостных) червей. Эта новая биотехнология лишена вышеуказанных недостатков и может быть внедрена в коммунальном

хозяйстве городов, поселков и в различных отраслях промышленности и сельского хозяйства для очистки бытовых и промышленных сточных вод, содержащих биологически разлагаемые вещества. С помощью технологии вермифильтрации возможно быстро, рентабельно и экологически безопасно осуществлять очистку бытовых и промышленных сточных вод, без образования ила и осадков сточных вод, без выделения запахов и парниковых газов при 100%-ной регенерации воды [1–3, 7]. Эта технология внедряется в практику очистки сточных вод в таких зарубежных странах, как Чили, Индия, Китай, Мексика, Австралия и Бразилия [4–6].

Целью настоящего исследования в цикле последовательных работ данного направления являлось испытание пилотной установки для очистки муниципальных сточных вод г. Владимира с помощью технологии вермифильтрации.

Материалы и методы

Пробы сточных вод отбирали согласно рекомендациям «ГОСТ Р 51592-2000». Объем отбираемой пробы — не менее 5,0 л. Отбор проб делали в день выполнения экспериментов по вермифильтрации и анализов в лаборатории. Физико-химические, агрохимические и микробиологические анализы образцов сточных вод до и после вермифильтрации проводились в сертифицированной аналитической лаборатории воды МУП «ВладимирВодоканал» (г. Владимир).

В работе использовались дождевые (компостные) черви вида *Eisenia fetida*, которые были предоставлены компанией НПП ООО «БИОХИМПРЕСУРС» (г. Владимир).

© 2017 г. Титов И.Н., Фарзах Фаваз Салим Фатах, Ларионов Н.П.

* **Автор для переписки:**

Титов Игорь Николаевич

к.б.н., ст.н.с., доцент, ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени А.Г и Н.Г. Столетовых», Институт информационных технологий и радиоэлектроники

E-mail: tit42@mail.ru

Пилотные установки по вермифильтрации были изготовлены, используя пластиковые баки ПВХ размером 35×45 см (объем 40 л) и пластиковые канализационные трубы ПВХ диаметром 16 см и длиной 105 см (объем 21 л).

Работа выполнялась на основании Договора о сотрудничестве между МУП «ВладимирВодоканал» и ВЛГУ в области совместной научно-образовательной деятельности.

Результаты и обсуждение

Пилотная установка была изготовлена из пластикового бака ПВХ объемом 40 л, в дно которого были вмонтированы краны. В качестве носителя использовали дробленый гранит, который предварительно промывали водой и фракционировали по размеру с помощью сит. На дно бака укладывался слой в 10 см из гранита размером 20–35 мм, над ним слой в 10 см гранита размером 6–10 мм, затем слой в 10 см древесных опилок. Верхние 10 см – это слой садовой земли, в который заселяли дождевых червей: он и представляет собой вермифильтр. Объем верхнего почвенного слоя составлял 0,01 м³, в который заселяли популяцию дождевых червей численностью 1000 взрослых особей (биомасса составляла 290 г). Обе установки промывали водой в течение 3 дней. Для этого сточные воды молокозавода АО «Данон Россия» пропускали со скоростью 1 м³/м²/час.

Результаты показали, что после вермифильтрации сточных вод молокозавода содержание различных форм азотистых соединений в фильтрованной воде снижалось на 53,4–85,3%. Удаление взвешенных частиц – на 52,1%. Показатели биологического потребления кислорода (БПК₅) и химического потребления кислорода (ХПК) снизились на 53,6 и 44,1%, соответственно. Значение рН в пробах воды до и после вермифильтрации сдвинулось от слабощелочного до близкого к нейтральному значению (табл. 1).

Таблица 1

Результаты анализа сточных вод молокозавода с высокой нагрузкой после вермифильтрации, в мг/дм³

| № | Показатели | Исходная проба | После вермифильтрации | Эффективность удаления |
|---|---------------------|----------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | Азот аммонийный | 9,2±1,6 | 1,35±0,24 | 85,3% |
| 2 | Азот нитратный | 63,0±12,0 | 22,0±2,1 | 65,1% |
| 3 | Азот нитритный | 0,131±0,015 | 0,61±0,11 | 53,4% |
| 4 | Взвешенные вещества | 599±25 | 287±12 | 52,1% |
| 5 | БПК ₅ | 1238±125 | 575±58 | 53,6% |
| 6 | ХПК | 2416± 284 | 1351±159 | 44,1% |
| 7 | Значение рН | 5,94±0,17 | 6,45±0,17 | |

С целью достижения более эффективного процесса очистки сточных вод с помощью вермифильтрации была приготовлена пилотная установка другого типа. В первоначальной установке суммарная высота слоев биофильтра и вермифильтра составляла 45 см при соотношении высоты к диаметру 1,18. Для этого была использована пластиковая ПВХ канализационная труба диаметром 16 см. Она была распилена на отдельные части длиной по 105 см, в которые были с помощью клея-герметика вклеены заглушки с вмонтированными кранами. Схема такой установки представлена на рисунке 1.

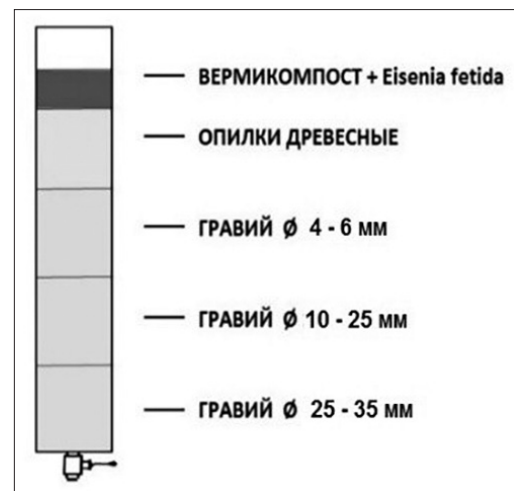


Рис. 1. Схема пилотной установки для вермифильтрации сточных вод

В качестве наполнителя был использован строительный щебень, который был отмыт водой, просушен на воздухе и фракционирован на ситах с разным диаметром ячеек. На дно такой установки помещался слой щебня (25 см) размером частиц 25–35 мм, затем следующий слой (25 см) частиц размером 10–25 мм, затем слой (25 см) частиц 4–6 мм, затем слой опилок (15 см). Самый верхний слой в 10 см представлял собой смесь вермикомпоста с компостом для питания червей, в который заселяли популяцию дождевых червей (150 взрослых особей).

Таким образом, суммарная высота рабочей зоны этой лабораторной установки по вермифильтрации составляла 100 см при диаметре 16 см. Соотношение высоты рабочей зоны установки к ее диаметру составило 6,25.

До экспериментов по обработке сточных вод пилотную установку для вермифильтрации промывали водой в течение 3 дней. Скорость пропускания муниципальных сточных вод г. Владимира в экспериментах составляла 1 м³/м²/час. Результаты экспериментов на данной установке представлены в таблице 2.

Для того чтобы установка по вермифильтрации работала более эффективно, ее предварительно обрабатывали сточными водами в течение трех дней. Это способствовало более сильному обрастанию наполняющих материалов (опилок и гравия) биопленкой из микроорганизмов. Скорость пропускания муниципальных сточных вод г. Владимира в экспериментах также составляла $1 \text{ м}^3/\text{м}^2/\text{час}$. Результаты экспериментов на данной установке представлены в таблице 3.

Результаты этого эксперимента показали, что после вермифильтрации муниципальных сточных вод г. Владимира в указанных условиях опыта общее содержание азотсодержащих соединений в сточной воде после вермифильтрации увеличилось на 26,9%, содержание общего фосфора снизилось на 17,0%. Удаление взвешенных частиц составило 93,08%. Показатели БПК₅ и ХПК снизились на 96,16 и 77,43%, соответственно.

Таблица 2

Усредненные результаты очистки сточных вод г. Владимира с помощью вермифильтрации

| Показатели | До обработки | После обработки | Процент удаления |
|----------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| Значение pH | 6,9–7,8 | 7,5 | |
| Взвешенные в-ва, мг/л | 100–200 | 50–100 | 50% |
| БПК ₅ , мг/л | 200 | 80 | 60% |
| ХПК, мг/л | 400 | 250 | 45% |
| Цвет | темно-серый | светло-коричневый | |
| Запах | сильный неприятный | отсутствие запаха | |
| Фекальные колиформы (КОЕ/100 мл) | $>10^6$ | 10^3 | $>99,9\%$ |

Таблица 3

Результаты эксперимента по обработке муниципальных сточных вод г. Владимира вермифильтрацией

| Параметры | Исходная проба | После вермифильтрации | % |
|--------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------|
| N _{общий} мг/л | 78 ± 11 | 99 ± 14 | 126,9 |
| P _{общий} мг/л | $19,4 \pm 1,6$ | $16,1 \pm 1,4$ | 17,0 |
| Значение pH | $7,80 \pm 0,17$ | $7,57 \pm 0,17$ | - |
| ХПК мг/л | 638 ± 75 | 144 ± 24 | 77,43 |
| БПК ₅ мг/л | 134 ± 16 | $5,11 \pm 0,60$ | 96,16 |
| Взвешенные в-ва, мг/л | 260 ± 16 | $18 \pm 1,5$ | 93,08 |
| Фекальные колиформы КОЕ/100 мл | $>10^6$ | 10^3 | $>99,9\%$ |

Увеличение содержания общего азота можно объяснить тем, что при вермифильтрации происходит экстракция водорастворимых веществ органической и неорганической природы из верхнего слоя субстрата вермифилтратра, включая гуминовые соединения. Поэтому очищенная вода имеет коричневый цвет (рис. 2).

С целью определения фитотоксичности и ростовых свойств очищенных вермифильтрацией препаратов муниципальных сточных вод г. Владимира были проведены простые биотесты на проращивание семян. Для этого взяли по 50 штук семян тритикале, поместили равномерно на фильтровальную бумагу в чашки Петри диаметром 10 см. В каждую чашку Петри добавили по 5 мл исследуемой и чистой водопроводной (контроль) воды. Чашки покрывали крышками и оставляли при комнатной температуре [5]. Через 5 суток взвесили общую сырую биомассу пророст-

ков и длину самих проростков, исключая пять наименьших значений. Результаты представлены в таблице 4.

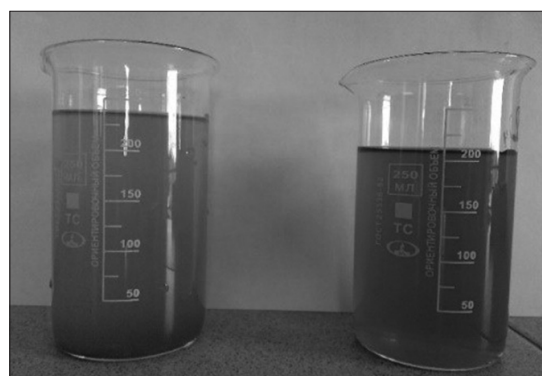


Рис. 2. Муниципальные сточные воды г. Владимира до (слева) и после вермифильтрации (справа) — последние коричневого цвета

Таблица 4
Результаты проращивания семян тритикале при замачивании в муниципальной сточной воде г. Владимира до и после ее обработки вермифльтрацией (n=50)

| Пробы | Сырая биомасса проростков, г | % | Средняя длина проростков, мм | % |
|----------------------|------------------------------|------|------------------------------|------|
| Исходная | 2,87 | - | 58,6 | - |
| После вермифльтрации | 3,76 | 42,5 | 81,1 | 39,2 |

Из результатов проведенного опыта можно считать, что муниципальная сточная вода г. Владимира после очистки с помощью вермифльтрации не обладает фитотоксичностью для растений тритикале и содержит в себе ростстимулирующие вещества (сырая биомасса проростков увеличилась на 42,5%, а средняя длина проростков — на 39,2%), то есть она пригодна для использования при выращивании растений, начиная от замачивания семян.

Заключение

Предложенная технология вермифльтрации не ставит своей целью добиваться высокой степени очистки, так как является способом получения технической воды, которая обогащена макро- и микроэлементами, органическими веществами, в частности гуминовыми веществами, продуктами метаболизма микробиоценоза и дождевых червей, экстрагируемых из зоны вермифилтра в процессе вермифльтрации. Такая вода может быть пригодной для ирригации.

Литература

1. *Титов И.Н., Фарзах Фаваз Салим Фатах.* Инновационная биотехнология вермифльтрации для очистки

сточных вод. Обзор // Проблемы механизации агрохимического обслуживания сельского хозяйства: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Инновационные агротехнологии и средства механизации для развития органического земледелия», 2–3 декабря 2015 г., г. Рязань. ФГБНУ ВНИИМС. — Рязань. 2015. — С. 247–254.

2. *Титов И.Н., Фарзах Фаваз Салим Фатах, Ларионов Н.П.* Инновационная технология вермифльтрации для очистки бытовых и промышленных сточных вод // *Материалы XI Международной научной конференции «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии» ФРЭМЭ-2014, 1–3 июля 2014.* — Владимир-Суздаль, Россия. — С. 292–296.
3. *Титов И.Н., Фарзах Фаваз Салим Фатах, Ларионов Н.П., Кан В.М.* Технология вермифльтрации — эффективный метод очистки бытовых и промышленных сточных вод. Обзор // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова.* — 2014. — Т. 10. — № 1. — С. 58–70.
4. *Aguilera M.L.* Purification of wastewater by vermifiltration. Doctoral Thesis. — University of Montpellier 2, France, 2003. — 188 p.
5. *Bouché M.B., Soto P.* An industrial use of soil animals for environment: the treatment of organically polluted water by lumbrifiltration // In: *Proceedings of the XIVth International Colloquium on Soil Zoology and Ecology, University of Rouen, Mont Saint Aignan, France, August 30–September 3.* — University of Rouen, 2004. — P. 1–13.
6. *Sinha R.K., Valani D.* Vermiculture Revolution: The Technological Revival of Charles Darwin's Unheralded Soldiers of Mankind. — Nova Science Publishers Inc., 2011. — 328 p.
7. *Titov I.N., Farzah Fawaz Salim Fatah.* Innovative technology of vermifiltration for the treatment of domestic and industrial wastewater. Review // *International Symposium «Euro-ECO — Hannover 2015: Environmental and Engineering Aspects for sustainable living», Program Abstracts. 1–2 December 2015.* — Hannover, Germany, 2015. — P. 73–74.

MUNICIPAL WASTEWATER TREATMENT USING THE TECHNOLOGY OF THE VERMIFILTRATION

I.N. TITOV, FARZAH FAWAZ SALIM FATAH, N.P. LARIONOV

A.G. and N.G. Stoletovs Vladimir State University

The results of the municipal wastewater treatment in Vladimir with the help of new technology of vermifiltration are presented. It is shown that the main indicators of water quality BOD₅, COD and the content of suspended particles decreased by 96.16, 77.43 and 77.43%, respectively. Wastewater after vermifiltration did not have phytotoxicity for triticale plants and contained growth-stimulating substances.

Keywords: vermiculture, organic waste recycling, waste water, vermifiltration.

ОЧИСТКА МУНИЦИПАЛЬНЫХ СТОЧНЫХ ВОД Г. ВЛАДИМИРА С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ ВЕРМИФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕЗИНФИЦИРОВАННОЙ ВОДЫ, ПРИГОДНОЙ ДЛЯ ИРРИГАЦИИ

И.Н. ТИТОВ*, ФАРЗАХ ФАВАЗ САЛИМ ФАТАХ, Н.П. ЛАРИОНОВ

ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени А.Г и Н.Г. Столетовых», Владимир

Представлены результаты по практическому использованию электроактивированной воды анолита АНК для стерилизации очищенных муниципальных сточных вод г. Владимира технологией вермифилтрации. Показано, что добавление анолита АНК в очищенную вермифилтрацией сточную воду в концентрации 5–10% полностью ее стерилизовало.

Ключевые слова: сточные воды, вермифилтрация, анолит АНК.

Введение

В последние годы для очистки сточных вод (хозяйственно-бытовых и промышленных) стала применяться технология вермифилтрации с использованием дождевых червей. Система вермифилтрации не нуждается в сложном и дорогостоящем оборудовании, ее обслуживание требует минимальных энергетических затрат. Важнейшими преимуществами очистки сточных вод с помощью технологии вермифилтрации является то, что отсутствуют газообразование и какие-либо запахи, не образуются осадки сточных вод, что характерно для всех традиционных способов их очистки. Очень важно еще и то, что система вермифилтрации может работать децентрализованно, то есть на месте образования сточных вод (частные дома, коттеджи, отели, поселки, перерабатывающие предприятия и т.д.). Получаемая очищенная вода содержит в себе питательные вещества, что очень выгодно использовать ее для ирригации фермерских земель и в садоводстве [5, 8, 10, 11].

Изучение потенциально вредных микроорганизмов до и после переработки сточных вод желательно, так как большая часть сточных вод содержит вредные патогены и имеется необходимость анализировать их,

прежде чем обработанная вода может быть повторно использована для ирригации.

Несмотря на то, что при вермифилтрации сточных вод происходит эффективное удаление фекальных колиформных бактерий (ФКБ) на 99,9%, в вермифилтрованной сточной воде остаточные количества ФКБ, как правило, более 1000 ФКБ на 100 мл сточной воды [6, 7, 9].

Это превышает допустимые остаточные уровни 1000 ФКБ на 100 мл сточной воды по нормам СанПиН 2.1.7.573-96, что не разрешает их использование для свободного полива зеленых насаждений. Более жесткие рекомендации (200 ФКБ на 100 мл) относятся к паркам, площадкам для гольфа, лужайкам, посещаемым людьми [1]. Поэтому технология вермифилтрации сточных вод должна быть дополнена методами, которые позволяют специфически удалять остаточные уровни ФКБ.

Для уменьшения вредного воздействия на окружающую среду следует придавать особое значение удалению патогенов из сточных вод. Вот почему процессы дезинфекции имеют решающее значение для работы очистных сооружений. Дезинфекция традиционно осуществляется путем хлорирования, что значительно снижает уровень патогенов, но может представлять серьезную опасность для здоровья человека в результате образования побочных продуктов. Озон — это очень мощное дезинфицирующее средство, которое может удалить широкий спектр микроорганизмов, но он является нестабильным соединением, которое разлагается очень быстро. Облучение УФ-светом служит наиболее эффективным методом для дезинфекции, поскольку это приводит к нарушению генетического материала патогенов. Тем не менее затраты, связанные с этим способом

© 2017 г. Титов И.Н., Фарзах Фаваз Салим Фатах, Ларионов Н.П.

* Автор для переписки:

Титов Игорь Николаевич

к.б.н., ст.н.с., доцент, ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени А.Г и Н.Г. Столетовых», Институт информационных технологий и радиоэлектроники

E-mail: tit42@mail.ru

дезинфекции, очень высоки; поэтому потребность в недорогом, простом и эффективном способе дезинфекции давно существует.

Для получения безопасной дезинфицированной воды активно используются различные дезинфектанты химической природы. Но наивысшей антимикробной активностью среди всех известных жидких стерилизующих и дезинфицирующих средств при исключительно малой токсичности или при полном ее отсутствии для теплокровных организмов обладают электрохимически активированные растворы, в частности, нейтральный Анолит АНК, который производится в установках типа СТЭЛ из разбавленного водного раствора хлорида натрия. Анолит АНК — раствор универсального назначения, в связи с чем используется как для дезинфекции, так и стерилизации. Анолит АНК, в отличие от 0,5–5,0%-ных растворов гипохлорита, которые обладают только дезинфицирующим действием, является стерилизующим раствором при концентрации оксидантов в диапазоне 0,005–0,05% [2].

Действующими веществами в анолите АНК служит смесь пероксидных соединений и хлоркислородных соединений. Подобная комбинация действующих веществ обеспечивает отсутствие адаптации микроорганизмов к биоцидному действию анолита АНК, а малая суммарная концентрация соединений активного кислорода и хлора гарантирует полную безопасность для человека и окружающей среды при его длительном применении. Сумма соединений активного кислорода и хлора в анолите АНК (суммарное содержание оксидантов) находится в пределах от 100 до 500 мг/л, что в десятки раз меньше, чем в большинстве рабочих растворов современных дезинфицирующих препаратов. Анолит АНК не вызывает коагуляцию белка, защищающего микроорганизмы, и благодаря разрыхленной структуре легко проникает в микроканалы живой и неживой материи. Анолит АНК нетоксичен ввиду малой концентрации действующих веществ и поэтому не требует удаления с обработанных поверхностей после окончания обработки [2].

Целью настоящей работы было усовершенствование способа очистки муниципальных сточных вод г. Владимира с помощью технологии вермифльтрации и получения дезинфицированной очищенной воды, пригодной для ирригации.

Материалы и методы

Пробы сточных вод отбирали согласно рекомендациям «ГОСТ Р 51592-2000». Объем отбираемой

пробы — не менее 5,0 л. Отбор проб осуществляли в день выполнения экспериментов по вермифльтрации и анализов в лаборатории. Физико-химические, агрохимические и микробиологические анализы образцов сточных вод до и после вермифльтрации проводились в сертифицированной аналитической лаборатории воды МУП «ВладимирВодоканал» (г. Владимир).

В работе использовались дождевые (компостные) черви вида *Eisenia fetida*, которые были предоставлены компанией НПП ООО «БИОХИМРЕСУРС» (г. Владимир).

Пилотные установки по вермифльтрации были изготовлены, используя канализационные трубы ПВХ диаметром 16 см и длиной 105 см (объем 21 л).

Для дезинфекции сточных вод после вермифльтрации был применен электрохимически активированный раствор, в частности, нейтральный Анолит АНК, который производится в установках типа СТЭЛ из сильно разбавленного водного раствора хлорида натрия. Препарат нейтрального Анолита АНК был предоставлен профессором В.М. Бахиrom (Институт электрохимических систем и технологий Витольда Бахира, г. Москва; www.vbinstitute.ru).

Результаты и обсуждение

В предыдущей работе [4] нами было показано, что при очистке муниципальных сточных вод г. Владимира с помощью новой технологии вермифльтрации по основным показателям качества воды БПК₅, ХПК и содержанию взвешенных частиц происходило снижение на 96,16, 77,43 и 77,43%, соответственно. Сточные воды после вермифльтрации не обладали фитотоксичностью для растений тритикале и содержали в себе ростостимулирующие вещества. Однако остаточные титры фекальных колиформ в такой воде составляли в среднем 103 КОЕ/100 мл.

В пробы сточных вод после процесса вермифльтрации добавляли электроактивированную воду Анолит АНК в следующих соотношениях: 99:1; 95:5 и 90:10. Результаты титрования проб представлены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 следует, что добавление электроактивированной воды анолита АНК в концентрации 5–10% вызывало полную стерилизацию очищенной сточной воды с помощью вермифльтрации.

Таким образом, добавление электроактивированной воды Анолит АНК в концентрации 5–10% к очищенной сточной воде с помощью вермифльтрации

удаляет в ней остаточные количества ФКБ, и такая сточная вода может использоваться для ирригации.

Таблица 1
Влияние электроактивированной воды Анолит АНК на стерилизацию сточных вод после вермифльтрации

| Пробы | Титры фекальных колиформ, КОЕ/100 мл |
|--|--------------------------------------|
| Сточная вода до вермифльтрации | ≥ 106 |
| Сточная вода после вермифльтрации | 103 |
| Сточная вода после вермифльтрации + Анолит 1% | 102 |
| Сточная вода после вермифльтрации + Анолит 5% | 100 |
| Сточная вода после вермифльтрации + Анолит 10% | 100 |

Можно считать, что применение электроактивированной воды Анолит АНК как дополнение к системе вермифльтрации сточных вод, в конечном счете, улучшает основные качественные, количественные и режимные параметры самого технологического процесса вермифльтрации. Использование электроактивированной воды Анолит АНК представляет собой новый, безопасный и дешевый способ для дезинфекции хозяйственно-бытовых сточных вод, очищенных с помощью вермифльтрации. На данный способ получения пригодной для ирригации дезинфицированной воды при обработке хозяйственно-бытовых сточных вод с помощью технологии вермифльтрации подана патентная заявка в Роспатент [3].

Заключение

Технология вермифльтрации не служит альтернативой очистке сточных вод в аэротенках с помощью избыточного активного ила. Она может в разных модификациях дополнять и расширять возможности традиционных подходов. Предложенный способ применения электроактивированной воды Анолит АНК является новым перспективным методом для дезинфекции хозяйственно-бытовых сточных вод.

Литература

1. СанПиН 2.1.7.573–96. Гигиенические требования к использованию сточных вод и их осадков для орошения и удобрения. Приложение 10.
2. Сучков Ю.Г., Стрельников И.И., Слизкова В.Г., Леонов Б.И., Ипполитов В.П., Бахир В.М. Пути создания эффективных и безопасных антимикробных жидких средств и эволюция общественного восприятия дезинфекционных мероприятий // Дезинфекционное дело. – 2004. – № 3. – С. 52–57.
3. Титов И.Н., Белкин К.М. Способ получения пригодной для ирригации дезинфицированной воды при обработке хозяйственно-бытовых сточных вод с помощью технологии вермифльтрации. Патентная заявка РФ № 2017108902 от 17.03.2017.
4. Титов И.Н., Фарзах Фаваз Салим Фатах, Ларионов Н.П. Очистка муниципальных сточных вод г. Владимира с помощью технологии вермифльтрации // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2017. – Т. 13. – № 4. – С. 5–8.
5. Титов И.Н., Фарзах Фаваз Салим Фатах. Инновационная биотехнология вермифльтрации для очистки сточных вод. Обзор // Проблемы механизации агрохимического обслуживания сельского хозяйства: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Инновационные агротехнологии и средства механизации для развития органического земледелия», 2–3 декабря 2015 г., г. Рязань, ФГБНУ ВНИИМС / ФГБНУ ВНИИМС. – Рязань, 2015. – С. 247–254.
6. Arora S., Rajpal A., Kumar T., Bhargava R. & Kazmi A.A. Pathogen removal during wastewater treatment by vermifiltration // Environmental Technology. – 2014. – Vol. 35(19). – P. 2493–2499.
7. Arora S., Rajpal A., Kumar T., Bhargava R., Kazmi A.A. A comparative study for pathogen removal using different filter media during vermifiltration // Water Sci. Technol. – 2014. – Vol. 70(6). – P. 996–1003.
8. Jiang L., Liu Y., Hu X., Zeng G., Wang H., Zhou L., Tan X., Huang B., Liu S., Liu S. The use of microbial-earthworm ecofilters for wastewater treatment with special attention to influencing factors in performance: A review // Bioresource Technology. – 2016. – Vol. 200. – P. 999–1007.
9. Mudziwapasi R., Mlambo S.S., Kuipa P.K., Chigu N.L., Utefe B. Potential synchronous detoxification and biological treatment of raw sewage in small scale vermifiltration using an epigeic earthworm, *Eisenia fetida* // Resources and Environment. – 2016. – Vol. 6(1). – P. 16–21.
10. Sinha R.K., Valani D. Vermiculture Revolution: The Technological Revival of Charles Darwin's Unheralded Soldiers of Manking. – Nova Science Publishers Inc., 2011. – 328 p.

11. Titov I.N., Farzah Fawaz Salim Fatah. Innovative technology of vermifiltration for the treatment of domestic and industrial wastewater. Review // International Symposium «Euro-ECO – Hannover 2015: Environmental and Engineering Aspects for sustainable living», Program Abstracts. 1–2 December 2015. – Hannover, Germany. – P. 73–74.

**PRODUCTION OF DISINFECTED WATER SUITABLE
FOR IRRIGATION AFTER TREATMENT MUNICIPAL WASTEWATER
USING OF VERMIFILTRATION TECHNOLOGY**

I.N. TITOV, FARZAH FAWAZ SALIM FATAH, N.P. LARIONOV

A.G. and N.G. Stoletovs Vladimir State University

Results are presented on the practical use of electroactivated water ANK anolyte for sterilization of treated municipal wastewater in Vladimir using vermifiltration technology. It is shown that the addition of ANK anolyte to wastewater purified by vermifiltration in a concentration of 5–10% completely sterilized it.

Keywords: waste water, vermifiltration, ANK anolyte.

ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ГЕКСАГИСТИДИНСОДЕРЖАЩЕЙ ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗЫ, ДЕЙСТВУЮЩИЙ ПРОТИВ БАКТЕРИОЗА РАСТЕНИЙ

А.Г. АСЛАНЛЫ, О.В. МАСЛОВА, О.В. СЕНЬКО, Е.Н. ЕФРЕМЕНКО*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Исследована возможность комбинированного сочетания препарата Фитолавина бактерицидного и фунгицидного действия и полиэлектролитных комплексов (ПЭК) фермента гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы ($\text{His}_6\text{-ORH}$) с полианионами (поли-L-аспарагиновой или поли-L-глутаминовой кислотами). Показано, что применение фермента $\text{His}_6\text{-ORH}$ именно в составе ПЭК в присутствии Фитолавина обеспечивает ему стабильность в проявлении лактоназной активности при нейтральных значениях pH в реакциях гидролиза N-ацилгомосеринлактонов, запускающих процесс формирования у бактериальных клеток повышенной устойчивости к антибиотикам. Исследована принципиальная возможность использования комбинации ферментного ПЭК с Фитолавином для элиминирования развития бактериального поражения побегов томатов, вызываемого бактериальными клетками *Xanthomonas campestris*. Установлено, что комбинирование ПЭК фермента, полученного на основе поли-L-глутаминовой кислоты ($\text{His}_6\text{-ORH/PLE}_{50}$), с антибактериальным препаратом Фитолавином обеспечивает возможность снижения в 2 раза концентрации раствора последнего для его нанесения на растения с целью получения результата, аналогичного тому, который может быть получен в присутствии только одного Фитолавина.

Ключевые слова: гексагистидинсодержащая органофосфатгидролаза, бактерицидный препарат Фитолавин, лактоназная активность, *Xanthomonas campestris*.

Введение

Быстро развивающаяся бактериальная устойчивость к широко применяемым антибактериальным средствам представляется одной из серьезнейших проблем современности [14]. В настоящее время в Российской Федерации отмечают увеличение числа бактериальных поражений растений, вызываемых известными патогенами, а также фиксируются случаи бактериоза за счет патогенной активности новых возбудителей [1, 2]. К числу наиболее распространенных возбудителей бактериоза растений относятся грамотрицательные бактерии родов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Pantoea* и др., которые при достижении определенной концентрации биомассы способны проявлять кворумный ответ, обеспечивающий координированное устойчивое коллективное

поведение популяции клеток этих микроорганизмов, в том числе к действию антимикробных агентов. Таким образом, для подавления патогенной активности клеток бактерий, находящихся в состоянии популяций высокой плотности (кворума), требуется использование более высоких концентраций антибактериальных препаратов.

Развитие кворумного ответа у грамотрицательных клеток сопряжено с синтезом и накоплением N-ацилгомосеринлактонов, выполняющих роль аутоиндукторов развития кворумного ответа у большинства из них. В качестве эффективного, с точки зрения предотвращения развития антибиотикоустойчивости патогенных бактериальных популяций и снижения уровня их резистентности, обсуждается подход, основанный на комбинировании известных антибиотиков и ферментных деструкторов сигнальных молекул кворумного ответа, в частности, N-ацилгомосеринлактонов [5, 7, 9, 13]. Разрушение молекул N-ацилгомосеринлактонов направлено на лишение бактериальных клеток возможности перехода в устойчивое состояние [6]. В результате обеспечивается более эффективное воздействие антимикробных агентов на клетки патогенов и становится возможным снижение величины применяемых эффективных доз антибиотиков. В литературе данный подход к решению агробиотехнологических проблем уже обсуждается [11]. В этой связи

© 2017 г. Асланлы А.Г., Маслова О.В., Сенько О.В., Ефременко Е.Н.

* Автор для переписки:

Ефременко Елена Николаевна

д.б.н., профессор, зав. лабораторией экобиокатализа кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН

E-mail: elena_efremenko@list.ru

разработка новых эффективных комбинированных препаратов и оптимизация условий их использования для элиминирования и профилактики бактериоза растений представляется актуальной задачей.

Известно, что лактоназную активность проявляет гексагистидинсодержащая органофосфатгидролаза ($\text{His}_6\text{-OPH}$) [10]. Обнаружены полифункциональные свойства этого фермента, заключающиеся в том, что он способен осуществлять гидролиз фосфорорганических соединений [3] и N-ацилгомосеринлактонов. При этом комбинирование данного фермента с отдельными антибиотиками (ампициллин, гентамицин, канамицин, рифампицин) приводит к тому, что последние, взятые в концентрациях, соответствующих терапевтическим дозам, могут оказывать стабилизирующий эффект на его активность [8]. Использование $\text{His}_6\text{-OPH}$ в составе нековалентных полиэлектролитных комплексов, полученных на основе таких полиаминокислот, как поли-L-аспарагиновая ($\text{His}_6\text{-OPH/PLD}_{50}$) или поли-L-глутаминовая ($\text{His}_6\text{-OPH/PLE}_{50}$), обеспечивает ферменту дополнительную повышенную стабильность действия и функционирования *in vivo* [3].

В настоящей работе были исследованы возможности комбинирования фермента $\text{His}_6\text{-OPH}$, взятого в виде ПЭК на основе полиаминокислот с коммерческим препаратом Фитолавином бактерицидного и фунгицидного действия, применяемым для профилактики и лечения бактериоза растений, вызванного клетками бактерий *Xanthomonas campestris* (черная бактериальная пятнистость). В качестве модельного растения в ходе исследований использовались кусты томатов сорта Де Барао. В случае нанесения Фитолавина на растения в

комбинации с ферментом концентрация его раствора для обработки растений была снижена в 2 раза по сравнению с тем, которая использовалась в соответствии с рекомендациями производителей антибактериального препарата для обработки томатов без ферментных добавок.

Материалы и методы

В работе использовались: Фитолавин (ГринБэлт, Россия) с действующим веществом фитобактериомицин (комплекс стрептотрициновых антибиотиков, с биологической активностью 120 000 ЕА/мл, 1 л препарата содержит 32 г действующего вещества, рекомендуемая доза для опрыскивания томатов — 2 мл/л), натриевая соль поли-L-аспарагиновой (PLD_{50} , $M=6800$ Да) и соль поли-L-глутаминовой (PLE_{50} , $M=7500$ Да) кислот (Alamanda Polymers, США) и другие реагенты (Sigma, США). Штамм бактерий *Xanthomonas campestris* В-9521 был получен из ВКПМ (Россия).

Для выделения фермента $\text{His}_6\text{-OPH}$ использовали рекомбинантные клетки *E. coli* SG13009[ρREP4] [4]. Выделение и очистка фермента, приготовление двух вариантов ПЭК с использованием поли-L-аспарагиновой (PLD_{50}) и поли-L-глутаминовой кислот (PLE_{50}), а также определение активности полученных ферментных препаратов проводились согласно известным методикам [8].

В качестве модельного тест-объекта в исследованиях был выбран районированный сорт томатов Де Барао (всего 30 кустов) (рис. 1а). После 30 суток выращивания в лабораторных условиях при комнатной температуре саженцы высаживались в 3 теплицы (группа 1, группа 2, группа 3) по 10 кустов.

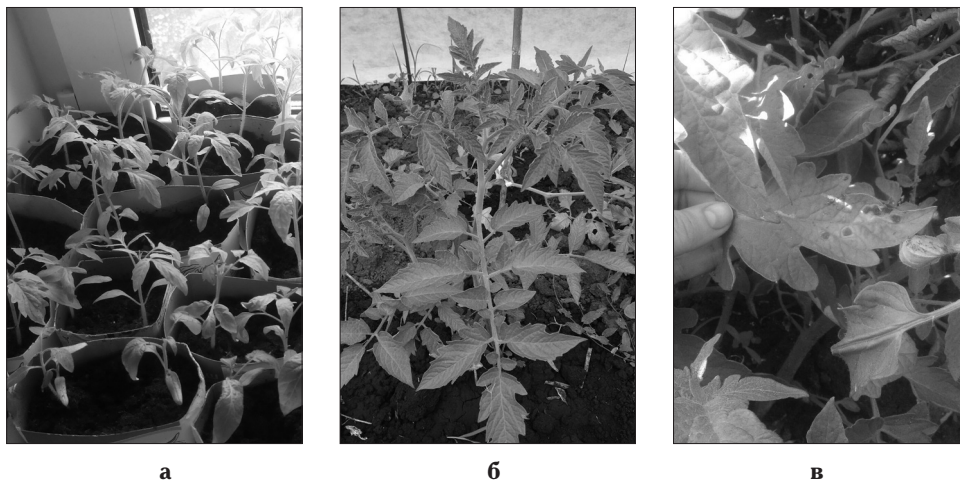


Рис. 1. Саженцы томатов сорта Де Барао после 30 суток выращивания в лабораторных условиях (а); группа № 1 — контроль (б) и группы № 2 и № 3 выглядели одинаково — обработка одним раствором Фитолавина (2 мл/л) и раствором Фитолавина (1 мл/л) с добавлением раствора ПЭК фермента $\text{His}_6\text{-OPH/PLE}_{50}$ (в)

Затем через 1 неделю (период адаптации) каждая группа опрыскивалась при использовании 1 л суспензии клеток бактерий *Xanthomonas campestris* В-9521 (1×10^6 КОЕ/л), а еще через 1 неделю те же растения обрабатывались водными растворами только одного коммерческого препарата Фитолавина или содержащими комплекс фермента His₆-ОРН/PLE₅₀ и Фитолавин, концентрация которого была снижена в 2 раза. В результате в эксперименте были растения: группа № 1 — обработанные только суспензией бактериальных клеток (контроль); группа № 2 — обработанные суспензией бактериальных клеток с последующим нанесением на растения только раствора Фитолавина, приготовленного в концентрации, рекомендованной производителем (2 мл/л); группа № 3 — обработанные суспензией бактериальных клеток с последующим нанесением на растения раствора Фитолавина с концентрацией, сниженной в 2 раза по отношению к рекомендованной производителем и использованной в группе № 2 (1 мл/л или 32 мг действующего вещества/л), с добавлением ПЭК фермента His₆-ОРН/PLE₅₀.

После проведения обработки саженцев томатов рабочими водными растворами наблюдение за состоянием растений проводилось в течение 90 суток.

Результаты и обсуждение

Первоначально было проведено исследование влияния самого препарата Фитолавина на лактоназную активность фермента His₆-ОРН и двух вариантов его ПЭК. Эти эксперименты, в которых ферментные препараты экспонировались в присутствии антибактериального вещества, проводились при рН среды 7,4, который отличался от оптимального для действия самого фермента значения рН (10,5) [12], так как эти условия более соответствовали естественным. При этом изучалась кинетика изменения активности фермента при 28 °С. Было установлено, что после 6 ч экспонирования активность фермента, как в присутствии Фитолавина, так и в его отсутствие, сохранялась более чем на 60% (рис. 2).

Однако при этом величина остаточной активности фермента, а также двух вариантов его полиэлектролитных комплексов, в присутствии Фитолавина, как и ранее при исследовании свойств фермента в присутствии других антибиотических веществ [8], была на 6–7% выше, чем при его отсутствии в среде экспонирования. То есть присутствие Фитолавина при экспонировании фермента в среде с нейтральным значением рН, а также

в реакционной среде фермента с ацилгомосеринлактоном однозначно позитивно сказывалось на проявлении им каталитической активности. Из полученных кинетических данных (см. рис. 2) следовало, что оба исследуемых варианта ПЭК (His₆-ОРН/PLD₅₀ и His₆-ОРН/PLE₅₀) обладали более высокой остаточной активностью в сравнении с чистым ферментом в присутствии Фитолавина. В этой связи для последующей обработки сельскохозяйственных растений (саженцев томатов) против бактериоза далее использовался именно ПЭК на основе поли-L-глутаминовой кислоты (His₆-ОРН/PLE₅₀), сохранивший максимальную остаточную активность в проведенных экспериментах.

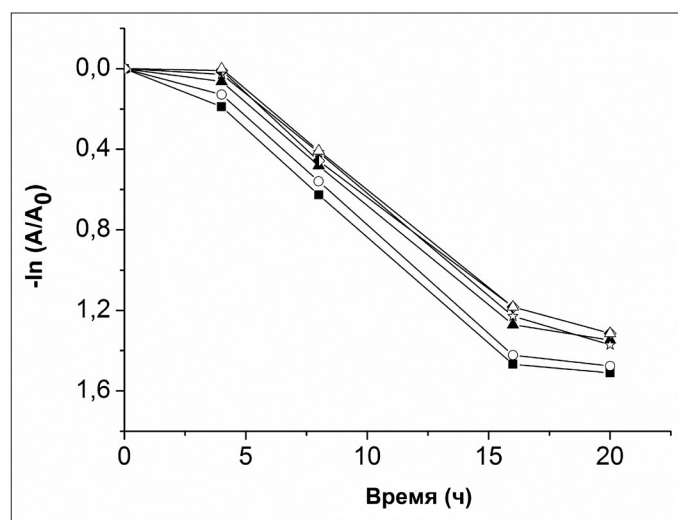


Рис. 2. Кинетика изменения лактоназной активности чистого His₆-ОРН и фермента в составе ПЭК в присутствии Фитолавина (концентрация действующего вещества Фитолавина — 32 мг/л) и в его отсутствие в среде экспонирования при рН 7,4

В ходе исследований, связанных с обработкой саженцев томатов суспензией клеток бактериальных патогенов и ферментным препаратом в сочетании с Фитолавином (см. рис. 1), было установлено, что в группе № 1 (контроль) растения покрылись темными пятнами, что свидетельствовало о развитии на них бактериоза. Сами кусты были меньшего размера в сравнении с саженцами из других групп, и количество плодов на них было минимальным. При этом в группе № 2 (обработка только раствором Фитолавина в концентрации 2 мл/л) проявления бактериального заражения кустов отмечено не было, и то же самое наблюдалось в группе № 3 (обработка раствором Фитолавина со сниженной в 2 раза концентрацией (1 мл/л) при добавлении ПЭК фермента His₆-ОРН/PLE₅₀).

Заключение

Таким образом, была изучена кинетика изменения лактоназной активности фермента гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы (His₆-ОРН) и его полиэлектролитных комплексов с поли-L-аспарагиновой (His₆-ОРН/PLD₅₀) и поли-L-глутаминовой (His₆-ОРН/PLE₅₀) кислотами в присутствии комплекса стрептотрициновых антибиотиков, входящих в состав препарата Фитолавина. Показано, что комбинирование Фитолавина с His₆-ОРН и его полиэлектролитными комплексами в составе водных сред не оказывает негативного влияния на активность фермента и в целом сопровождается его стабилизацией. При этом полиэлектролитные комплексы фермента по сравнению с его высокоочищенной формой характеризуются повышенной стабильностью действия при значениях рН среды 7,4, которые существенно ниже рН оптимума действия самого фермента (10,5).

Отсутствие бактериального поражения растений в результате их обработки ферментным препаратом в сочетании с коммерческим препаратом Фитолавином, концентрация раствора которого в ходе выполнения эксперимента была снижена в 2 раза по сравнению с рекомендуемой его разработчиками, позволяет сделать вывод о перспективности использования предлагаемого подхода в агротехнологиях.

Обсуждаемый подход к применению оригинальных биопрепаратов на основе фермента His₆-ОРН в сочетании с антимикробными препаратами открывает перспективу создания новых способов эффективных действий против бактериоза растений. Представленные биопрепараты, обеспечивающие гидролиз лактонсодержащих индукторов формирования устойчивых популяций грамотрицательных бактериальных клеток-патогенов *Xanthomonas campestris* (черная бактериальная пятнистость), можно рассматривать как альтернативу дорогостоящим коммерческим препаратам лактоназ, выделяемых из грамположительных клеток рода *Bacillus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №16-14-00061).

Литература

1. Егорова М.С., Игнатов А.Н., Мазурин Е.С. Видовое разнообразие фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*, поражающих растения семейства мятликовые // Защита картофеля. — 2014. — № 2. — С. 35–39.

2. Игнатов А.Н., Егорова М.С., Ходынкина М.В. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России // Защита и карантин растений. — 2015. — № 5. — С. 6–9.
3. Efremenko E.N., Lyagin I.V., Klyachko N.L., Bronich T., Zavyalova N.V., Jiang Y., Kabanov A.V. A simple and highly effective catalytic nanozyme scavenger for organophosphorus neurotoxins // Journal of Controlled Release. — 2017. — Vol. 247. — P. 175–187.
4. Efremenko E.N., Votchitseva J.A., Aliev T.K., Varfolomeev S.D. Recombinant plasmid DNA pTES-His-OPH and producer of oligohistidine containing organophosphate hydrolase. RU Patent. 2005. 2,255,975.
5. Hong K.-W., Koh C.-L., Sam C.-K., Yin W.-F., Chan K.-G. Quorum quenching revisited — from signal decays to signalling confusion // Sensors. — 2012. — Vol. 12. — P. 4661–4696.
6. Kiran S., Sharma P., Harjai K., Capalash N. Enzymatic quorum quenching increases antibiotic susceptibility of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* // Iranian Journal of Microbiology. — 2011. — Vol. 3(1). — P. 1–12.
7. Li X.C., Wang C., Mulchandani A., Ge X. Engineering soluble human paraoxonase 2 for quorum quenching // ACS Chemical Biology. — 2016. — Vol. 11(11). — P. 3122–3131.
8. Maslova O., Aslanli A., Stepanov N., Lyagin I., Efremenko E. Catalytic characteristics of new antibacterials based on hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase // Catalysts. — 2017. — Vol. 7(9). — P. 271; doi:10.3390/catal7090271.
9. Miller M.B., Bassler B.L. Quorum sensing in bacteria // Annu. Rev. Microbiol. — 2001. — Vol. 55. — P. 165–199.
10. Sirotkina M., Efremenko E.N. Rhodococcus lactonase with organophosphate hydrolase (OPH) activity and His₆-tagged OPH with lactonase activity: evolutionary proximity of the enzymes and new possibilities in their application // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2014. — Vol. 98(6). — P. 2647–2656.
11. Teplitski M., Mathesius U., Rumbaugh K.P. Perception and degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signals by mammalian and plant cells // Chemical Reviews. — 2010. — Vol. 111(1). — P. 100–116.
12. Votchitseva Y.A., Efremenko E.N., Aliev T.K., Varfolomeyev S.D. Properties of hexahistidine-tagged organophosphate hydrolase // Biochemistry (Mos.). — 2006. — Vol. 71(2). — P. 167–172.
13. Whitehead N.A., Barnard A.M.L., Slater H., Simpson N.J.L., Slamond G.P.C. Quorum-sensing in gram-negative bacteria // FEMS Microbiol. Rev. — 2001. — Vol. 25(4). — P. 365–404.
14. Wright G.D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance // Chemical Communications. — 2011. — Vol. 47(14). — P. 4055–4061.

POLYFUNCTIONAL ENZYME BIOPREPARATION BASED ON HEXAHISTIDINE-CONTAINING ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE, ACTING AGAINST BACTERIOSIS OF PLANTS

A.G. ASLANLI, O.V. MASLOVA, O.V. SENKO, E.N. EFREMENKO

M.V. Lomonosov Moscow State University

The possible combining of antibacterial commercial preparation Phytolavin polyelectrolytic complexes (PEC) of hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase ($\text{His}_6\text{-OPH}$) with poly-ions such as poly-L-aspartic acid ($\text{His}_6\text{-OPH/PLD}_{50}$) or poly-L-glutamic acid ($\text{His}_6\text{-OPH/PLE}_{50}$) was investigated. It was shown that application of $\text{His}_6\text{-OPH}$ in the form of PEC in the presence of Phytolavin provided the stability of the enzymatic lactonase activity at neutral pH values in the hydrolytic reaction with N-acyl homoserine lactone triggering formation of increased bacterial cell resistance against the action of antibiotics. The existing of not only principle opportunity but efficiency in the use of combination of enzymatic PEC with Phytolavin to eliminate the development of bacterial damage of tomatoes caused by bacteria *Xanthomonas campestris* was studied. It was revealed that combination of enzymatic PEC obtained using poly-L-glutamic acid ($\text{His}_6\text{-OPH/PLE}_{50}$) with antibacterial Phytolavin enables 2-fold-reducing the concentration of the latter one in relation to recommendations of its producers to obtain same result in prevention of bacterial damage in the presence of only Phytolavin.

Keywords: hexahistidine containing organophosphorus hydrolase, bactericidal preparation Phytolavin, lactonase activity, *Xanthomonas campestris*.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ биоПАВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД И СЕДИМЕНТОВ БАЛТИЙСКОГО МОРЯ

К.В. ПЕТРИКОВ*, А.А. ВЕТРОВА, А.А. ИВАНОВА,
Я.А. ДЕЛЕГАН, А.Б. ГАФАРОВ, С.Л. СОКОЛОВ

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

Коллекция углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из проб поверхностных вод и донных осадков Балтийского моря, была изучена на предмет образования биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ). Из 178 протестированных микроорганизмов 12 штаммов продемонстрировали высокую поверхностную активность (поверхностное натяжение культуральной среды ниже 40 мН/м). По результатам анализа внеклеточных липидных экстрактов этих штаммов методом тонкослойной хроматографии было выбрано два микроорганизма для более детального определения структуры продуцируемых ими биоПАВ. Было показано, что штамм *Rhodococcus* sp. 66s образует два гомологичных сукциноилтрегалопида. Для штамма *Rhodococcus* sp. 74w было показано образование липопептида, предположительно, нового, ранее не описанного строения.

Ключевые слова: биоремедиация, нефтеструктуры, биосурфактанты, липопептиды, гликолипиды, *Rhodococcus*.

Введение

Способность синтезировать биологические поверхностно-активные вещества (биоПАВ или биосурфактанты) обнаруживается у самых различных микроорганизмов: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* и т.д. [3]. Считается, что эта способность является важным свойством, обеспечивающим микроорганизмам возможность эффективно потреблять гидрофобные органические субстраты, в частности, углеводороды, и поэтому образование биоПАВ считается характерной особенностью углеводородокисляющих бактерий [3]. Интерес к биоПАВ, образуемых микроорганизмами-нефтеструктурами, связан с двумя направлениями. Во-первых, несмотря на непрерывно увеличивающийся поток работ, посвященных биосурфактантам, остается множество открытых вопросов, связанных с особенностями свойств и структуры этих веществ, их влиянием на метаболизм бактерий, с ролью в микробных популяциях, с путями биосинтеза и со многим другим. Так что изучение этих

вопросов дополняет и расширяет имеющиеся научные знания и, безусловно, носит фундаментальный характер. С другой стороны, исследование биоПАВ и микроорганизмов-продуцентов обладает высокой практической значимостью. БиоПАВ могут служить заменой синтетических сурфактантов, так как имеют ряд важных преимуществ: они обладают значительно более низкой токсичностью по сравнению с рядом широко используемых синтетических ПАВ [6] они легко разлагаются, что позволяет применять их без нанесения вреда окружающей среде [14], а для получения биоПАВ можно использовать переработку дешевого возобновляемого сырья (например, отходы пищевой промышленности) [15]. Потенциально используемые биосурфактанты обладают высоким потенциалом для применения в таких областях промышленности, как нефтедобывающая, пищевая, фармацевтическая [8, 23].

Штаммы-продуценты биоПАВ находят широкое применение в биотехнологии защиты окружающей среды. Как известно, ликвидация нефтяных загрязнений относится к наиболее актуальным проблемам экологии. Среди методов, применяемых для очистки территорий и акваторий от этих загрязнений, особое место уделяется биологическим способам ремедиации с использованием активных микроорганизмов-нефтеструктуров. Такие методы обеспечивают безопасную для окружающей среды, технически простую и экономически выгодную очистку. Наличие у микроорганизмов, используемых

© 2017 г. Петриков К.В., Ветрова А.А., Иванова А.А., Делеган Я.А., Гафаров А.Б., Соколов С. Л.

* Автор для переписки:

Петриков Кирилл Владимирович

к.х.н., научный сотрудник лаборатории биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
E-mail: bioscience.kp@gmail.com

в биопрепаратах, способности к образованию биоПАВ является фактором, позволяющим увеличить эффективность ремедиации [13].

Таким образом, актуальность всестороннего изучения микроорганизмов, образующих биоПАВ, очевидна.

В рамках этого направления одной из наименее разработанных тем остается распространение продуцентов биоПАВ в окружающей среде. В настоящее время очень сложно дать даже приблизительную его оценку, поскольку в подавляющем большинстве работ выделяют единственный штамм-продуцент и далее изучают только его, но лишь единичные публикации описывают скрининг на предмет способности к синтезу биосурфактантов у больших коллекций микроорганизмов, выделенных из определенных биотопов, с последующей их характеристикой, позволяющей выявить какие-либо общие закономерности распространенности продуцентов среди тех или иных групп микроорганизмов. Задача усложняется еще и тем, что образование биоПАВ очень неоднородно: микроорганизмы одного рода могут синтезировать биоПАВ различных типов и, наоборот, похожие типы биоПАВ обнаруживаются у совершенно разных родов. Помимо этого, регулярно появляются публикации, посвященные либо обнаружению синтеза биоПАВ у какого-либо вида микроорганизма, для которого ранее это не было показано [10, 21], либо описанию биоПАВ новой, впервые обнаруженной структуры [11, 17]. Все это говорит о необходимости поиска продуцентов биоПАВ и дальнейшего их изучения.

Целью настоящей работы явилась характеристика коллекции углеводородокисляющих бактерий, выделенных из воды и седиментов Балтийского моря, на предмет способности к образованию биоПАВ.

Материалы и методы

Штаммы бактерий и условия их культивирования

Исследуемые штаммы были взяты из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН.

В качестве питательной среды использовали минеральную среду Эванса [7] следующего состава (на 1 л воды): K_2HPO_4 — 8,71 г; 5 М раствор NH_4Cl — 1 мл; 0,1 М раствор Na_2SO_4 — 1 мл; 62 мМ раствор $MgCl_2$ — 1 мл; 1 мМ раствор $CaCl_2$ — 1 мл; 0,005 мМ раствор $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ — 1 мл; раствор микроэлементов — 1 мл; $HCl_{конц.}$ — до $pH=7,5$. Состав раствора микроэлементов в 1%-ном растворе HCl (г/л): ZnO — 0,41; $FeCl_3$ — 2,9; $MnCl_2$ — 1,28; $CuCl_2$ — 0,13; $CoCl_2$ — 0,26; H_3BO_3 —

0,06, В качестве источника углерода и энергии вносили гексадекан в количестве 2% об.

Культивирование проводили при 24 °С на орбитальной качалке ($n=200$ об./мин) в течение 5 суток.

Измерение поверхностного натяжения

Поверхностное натяжение культуральной жидкости измеряли методом Дю Нуи (отрыв кольца) на тензиометре К6 («Kruss», ФРГ) при температуре 25 °С. Поверхностное натяжение раствора сравнения (минеральная среда Эванса) — 72 мН/м.

Выделение биоПАВ

Культуральную среду освобождали от микробных клеток центрифугированием в течение 40 мин при 4200 об./мин. на центрифуге J6-M1 («Beckman Coulter», США), $t=4$ °С. Полученный бесклеточный супернатант подкисляли концентрированной соляной кислотой до $pH=2$. Раствор оставляли на ночь при $t=4$ °С. После проводили экстракцию метил-третбутиловым эфиром в объемном соотношении 1:1. Органический слой собирали, растворитель удаляли на роторном испарителе.

Тонкослойная хроматография

Разделение проводили на алюминиевых пластинах с силикагелем 60 («Merck», ФРГ), элюируя смесью хлороформ:метанол:вода (65:15:2 об.).

Для обнаружения гликолипидов пластинки обрабатывали нафтольным реагентом (0,5 г α -нафтола в 100 мл смеси метанол-вода 1:1), затем 10% серной кислотой и нагревали 2 мин при 110 °С [1]. Для обнаружения липопептидов пластинку обрабатывали свежеприготовленным 0,25%-ным раствором нингидрина в ацетоне и нагревали в течение 5 мин при 110 °С [1].

Аминокислотный анализ

Для определения аминокислот отбирали 100 мг липидного экстракта, добавляли 2 мл 6Н HCl и проводили гидролиз при 105 °С в течение 24 ч. Затем пробу анализировали на аминокислотном анализаторе «Sykam» (ФРГ).

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрические измерения проводились на установке с ионной ловушкой LCQ Deca XP («Thermo Finnigan», США). Образцы растворяли в метаноле. Ионизацию образцов проводили методом электроспрея.

Результаты и обсуждение

Анализ данных литературы говорит о том, что образование биоПАВ чаще всего встречается среди бактерий-нефтедеструкторов. Поэтому в подавляющем

большинстве работ первоначальную селекцию микроорганизмов проводили по способности к деградации нефти, нефтепродуктов или отдельных углеводородов и лишь затем среди выделенных штаммов искали продуценты биоПАВ [3]. Аналогичный подход был использован в нашей работе. В ней для скрининга были взяты 178 бактериальных штаммов, выделенных ранее из проб воды и донных осадков Балтийского моря по способности к деградации нефти и ее компонентов [2]. Пробы отбирались в двух районах: в условно чистом, вдали от каких-либо источников загрязнений, и в загрязненном, находящемся в районе порта.

Известно, что активное образование биоПАВ у многих микроорганизмов происходит только при наличии в среде культивирования гидрофобного субстрата, таких как различные нефтяные углеводороды, обычно алканы или полиароматические углеводороды [22]. Поскольку все анализируемые штаммы являлись углеводородокисляющими, то для скрининга культивирование проводили на минеральной среде с гексадеканом.

Для оценки биосурфактантообразующей способности микроорганизмов используют целый ряд различных методик [22]. Однако среди всех возможных характеристик поверхностное натяжение культуральной среды является наиболее точным количественным параметром, свидетельствующим о наличии в растворе поверхностно-активных соединений. В большинстве работ к эффективным продуцентам биоПАВ относят микроорганизмы, демонстрирующие снижение поверхностного натяжения до 40 мН/м [16].

В результате проведенных нами исследований из 178 протестированных штаммов 12 (7%) продемонстрировали высокую поверхностную активность (табл. 1). Несмотря на то, что образование биоПАВ относят к механизмам, обеспечивающим деструкцию гидрофобных субстратов, процент продуцентов биоПАВ среди углеводородокисляющих бактерий обычно оказывается совсем небольшим. Например, при выделении бактерий из образцов чистой и загрязненной почвы из засушливых регионов юго-западной части США всего 45 из 1305 штаммов (менее 4%) продемонстрировали эффективное снижение поверхностного натяжения [4]. Следует отметить, что морская вода и осадки часто являются источниками выделения разнообразных продуцентов биоПАВ. При скрининге микроорганизмов, выделенных из прибрежных осадков Арктики и Антарктики, 18 штаммов из 199 (9%) были отнесены к продуцентам биоПАВ [16]. В работе [5] из 176 углеводородокисляющих штаммов, выделенных из нефтезагрязненных участков

береговой линии Норвегии, у 18 штаммов (10%) была отмечена поверхностная активность, но лишь для двух было показано снижение поверхностного натяжения ниже 40 мН/м. Как видно, полученный в нашем исследовании процент продуцентов биоПАВ оказался достаточно типичным и хорошо согласующимся с результатами других аналогичных работ. Распределение продуцентов биоПАВ по типам проб достаточно равномерное: по 6 штаммов выделено из чистых и загрязненных проб, по 5 и 7 штаммов — из проб воды и осадков, соответственно. Это свидетельствует о том, что такой признак, как образование биоПАВ, встречается в разных экологических нишах и поддерживается в популяции независимо от наличия в окружающей среде поллютантов.

Таблица 1

Поверхностное натяжение культуральной среды наиболее активных штаммов при росте в минеральной среде на гексадекане

| Штамм | Из какой пробы выделен | Поверхностное натяжение, мН/м |
|--------|------------------------|-------------------------------|
| 10s | осадок, чистая | 33±1 |
| 13s | осадок, чистая | 40±1 |
| 66s | осадок, чистая | 38±1 |
| 85s | осадок, загрязненная | 35±1 |
| 32s-2 | осадок, загрязненная | 35±1 |
| 81s | осадок, загрязненная | 36±1 |
| 29s | осадок, загрязненная | 36±1 |
| 54w(1) | вода, чистая | 34±1 |
| 67s | вода, чистая | 36±1 |
| 20s | вода, чистая | 39±1 |
| 36s-1 | вода, загрязненная | 36±1 |
| 74w | вода, загрязненная | 39±1 |

Для определения структуры продуцируемых биоПАВ проводилась наработка культуральной жидкости с последующей экстракцией липосодержащих компонентов. Наиболее распространенными классами биоПАВ являются гликолипиды и липопептиды, поэтому сконцентрированные экстракты анализировали тонкослойной хроматографией с двумя типами проявляющих реагентов: на углеводный компонент гликолипидов (α -нафтол) и на аминокислотные группы липопептидов (нингидрин). По интенсивности окраски хроматограмм судили о содержании компонентов. Для дальнейшего анализа были выбраны экстракты штаммов 66s и 74w, обладавшие наиболее четкими и интенсивно окрашенными сигналами на углеводы и на аминокислоты, соответственно (рис. 1). Оба этих штамма ранее были идентифицированы как *Rhodococcus* sp. (данные не опубликованы).

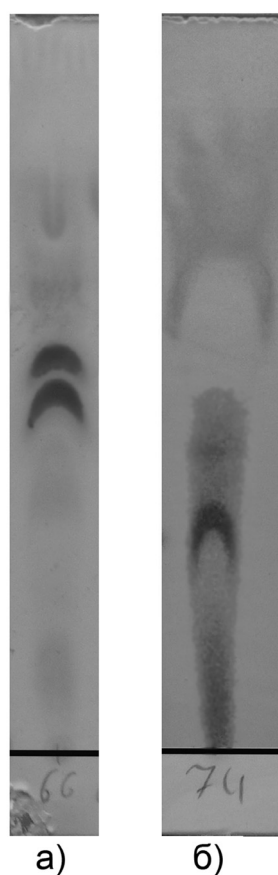


Рис. 1. Хроматограммы экстрактов: а) штамма *Rhodococcus* sp. 66s с проявлением на гликолипиды (α -нафтол + серная кислота); б) штамма *Rhodococcus* sp. 74w с проявлением на липопептиды (нингидрин)

Для представителей рода *Rhodococcus* характерно образование гликолипидных биоПАВ, в которых углеводная часть представлена остатком трегалозы [9]. В работе [16] методом ТСХ было продемонстрировано образование гликолипидных биоПАВ всеми родококками (14 штаммов), выделенными из седиментов арктической и антарктической областей, однако анализа структуры не осуществлялось.

В нашей работе структурный анализ липидного экстракта штамма *Rhodococcus* sp. 66s проводили с помощью масс-спектрометрии в условиях регистрации положительных и отрицательных ионов. В масс-спектрах образца при положительной ионизации образца можно выделить два наиболее интенсивных сигнала: m/z 871 и m/z 899 (рис. 2а). При отрицательной ионизации также присутствуют два сигнала: m/z 847 и m/z 875 (рис. 2б). Соответственно в первом случае наблюдаются псевдомолекулярные ионы $[M+Na]^+$, а во втором — $[M-H]^-$; следовательно, молекулярная масса соответствующих этим ионам соединений составляет 848 и 876 Да. Поскольку разница в массах между со-

седними сигналами составляет 28 Да, что соответствует молярной массе двух метиленовых групп $-CH_2-$, можно предположить, что эти два соединения являются гомологами. Значения m/z , полученные для анализируемого экстракта, совпадают со значениями, приведенными в работах (Tuleva et al., 2008) [24] и (Rapp and Gabriel-Jurgens, 2003) [20]. Для более точного установления структуры провели фрагментацию этих двух ионов. Полученная картина фрагментации также совпала с результатами вышеупомянутых работ. В MS/MS спектре псевдомолекулярного иона $[M+Na]^+$ с m/z 899 наблюдаются пики с m/z 799, m/z 781, m/z 755, m/z 727, которые соответствуют протонированным осколкам, образовавшимся путем отщепления фрагментов ангидрида янтарной кислоты (-100 Да), янтарной (-118 Да), октановой (-144 Да) и декановой кислот (-172 Да), соответственно (рис. 2в). Ион с m/z 583 соответствует соединению, образованному после разрыва гликозидной связи в трегалолипиде, в результате чего отщепляется глюкопиранозидный фрагмент, ацилированный декановой кислотой (-316 Да). Это предполагает наличие у одного глюкопиранозного кольца единственного остатка декановой кислоты, а у второго — по одному остатку янтарной, октановой и декановой кислоты.

В результате фрагментации псевдомолекулярного иона $[M+Na]^+$ с m/z 871 в спектре MS/MS появились пики с m/z 771, m/z 753, m/z 727, m/z 699 (рис. 2г), которые образовались путем отщепления тех же фрагментов, что и при распаде молекулярного иона с m/z 899. Вместо пика с m/z 583 появился пик с m/z 555, что на 28 Да легче; следовательно, он соответствует глюкопиранозе, ацилированной янтарной и двумя октановыми кислотами.

Полученные результаты хорошо согласуются с литературными. В работе [24] микроорганизм *R. wratislaviensis* при культивировании на н-гексадекане продуцировал два тетраэфира трегалозы. Масс-спектрометрия с ионизацией электроспреем в положительном режиме показала наличие двух соединений, которым соответствовали псевдомолекулярные ионы $[M+Na]^+$ с m/z 899 и 871. Их фрагментация давала картину, аналогичную полученной нами. Использование в той же работе ЯМР-анализа позволило более точно установить распределение остатков карбоновых кислот в молекулах биоПАВ. У трегалолипида массой 876 Да одно глюкопиранозное кольцо ацилировано остатком декановой кислоты в положении C-2', а другое — остатком янтарной в положении C-2 и одним остатком декановой и одним остатком октановой кислот — в положениях

С-3 и С-4. Трегалоллипид массой 848 Да был гомологичен первому и отличался наличием второго остатка октановой кислоты вместо декановой в положении С-3 или С-4. Аналогичная структура гликолипидов была показана при анализе биоПАВ, продуцируемых штаммом *Rhodococcus* sp. MS11 в работе [20].

На основании полученных нами результатов и имеющихся опубликованных данных можно заключить, что штамм *Rhodococcus* sp. s66 при росте на гексадекане продуцирует два гликолипида: 2-сукциноил-3,4-октаноил-деканоил-2'-деканолитрегалозой и 2-сукциноил-3,4-диоктаноил-2'-деканолитрегалозой (рис. 3).

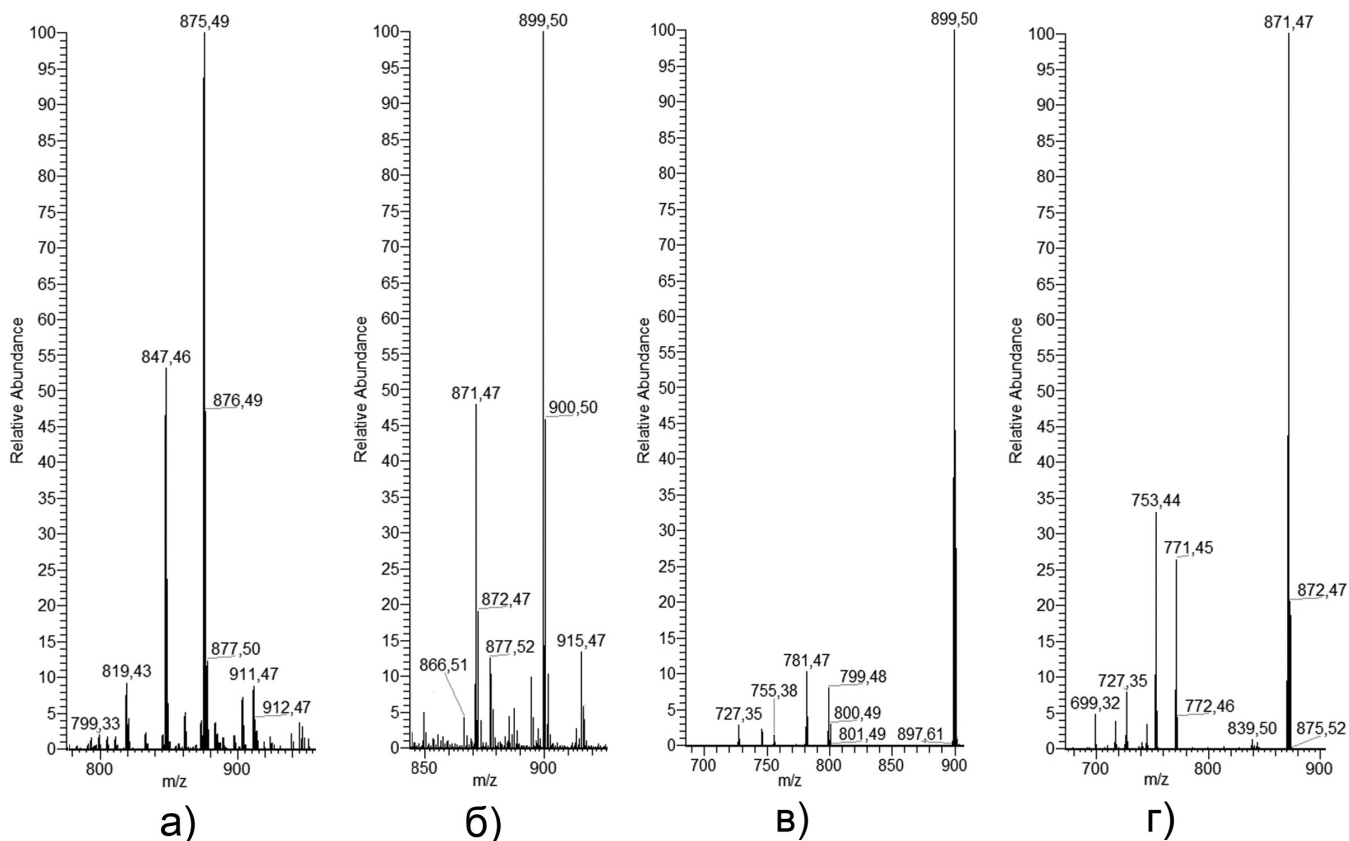


Рис. 2. Масс-спектры липидного экстракта штамма *Rhodococcus* sp. s66s: а) отрицательная ионизация; б) положительная ионизация; в) фрагментация псевдомолекулярного иона $[M+Na]^+$ 899; г) фрагментация псевдомолекулярного иона $[M+Na]^+$ 871

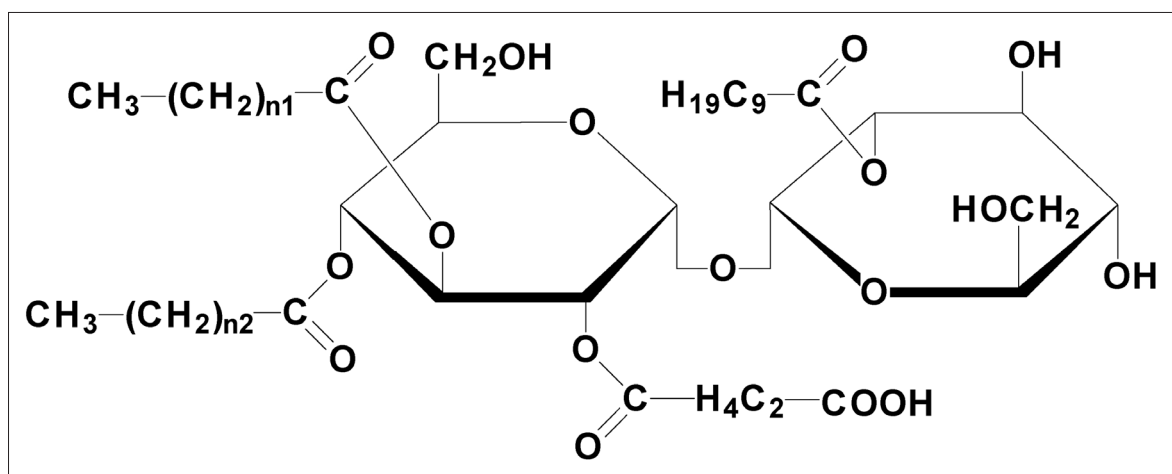


Рис. 3. Структура гликолипидов, продуцируемых штаммом *Rhodococcus* sp. s66s (2-сукциноил-3,4-октаноил-деканоил-2'-деканолитрегалоза: $n_1 = 6, n_2 = 8$; 2-сукциноил-3,4-диоктаноил-2'-деканолитрегалоза: $n_1 = n_2 = 6$)

Синтез липопептидов наблюдается у различных родов бактерий: *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus* и т.д. [12]. Однако в отношении рода *Rhodococcus* имеется единственное упоминание о синтезе липопептида выделенным из глубоководных донных отложений штаммом *Rhodococcus* sp. TW53 [18]. Предварительный анализ структуры продуцируемого им биоПАВ, родофактина, позволил установить, что в составе присутствовал следующий олигопептидный участок: аланин — изолейцин — аспарагиновая кислота — метионин — пролин.

Аминокислотный анализ выделенного из штамма *Rhodococcus* sp. 74w экстракта (табл. 2) продемонстрировал наличие 11 доминирующих по содержанию аминокислот. Все они встречаются в составе известных липопептидов, продуцируемых микроорганизмами других родов [19], однако ни пролин, ни изолейцин, обнаруженные ранее в родофактине, не присутствуют в полученном нами экстракте в значительных количествах. Это свидетельствует об отличиях в строении биоПАВ, продуцируемого штаммом *Rhodococcus* sp. 74w.

Таблица 2

Основной аминокислотный состав липидного экстракта штамма *Rhodococcus* sp. 74w

| Аминокислота | Содержание аминокислоты в пробе, % от суммарного количества аминокислот по массе |
|--------------------------------|--|
| Глицин | 27,1 |
| Аланин | 21,1 |
| Треонин | 13,4 |
| Лейцин | 8,4 |
| Цистеин | 6,5 |
| Серин | 5,8 |
| Валин | 4,1 |
| Глутаминовая к-та + глутамин | 3,7 |
| Аспарагиновая к-та + аспарагин | 3,6 |

Заключение

В ходе выполненных исследований была проведена характеристика коллекции бактерий-нефтедеструкторов на наличие штаммов-продуцентов биоПАВ. 12 штаммов из 178 (7%) продемонстрировали наличие поверхностной активности при росте на гексадекане, снижая поверхностное натяжение среды до 40 мН/м. При этом распределение продуцентов было почти одинаковым среди бактерий, выделенных из разных типов проб (чистых или загрязненных,

взятых из поверхностных вод или из донных седиментов). Все эти штаммы являются перспективными для использования в технологиях биоремедиации.

После ТСХ-анализа липидных экстрактов штаммов-продуцентов было отобрано два штамма для характеристики структуры продуцируемых биоПАВ. Установлено, что *Rhodococcus* sp. 66s продуцирует два сукциноилтрегалопида, типичных для представителей этого рода. Для штамма *Rhodococcus* sp. 74w было показано образование липопептидного биоПАВ, структура которого, предположительно, отличается от ранее описанных. Таким образом, штамм *Rhodococcus* sp. 74w является перспективным для дальнейших исследований как представитель продуцентов нового типа биоПАВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, уникальный идентификатор — RFMEFI61615X0038, и РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00610 мол_а.

Литература

1. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. Т. 1. — М.: Мир, 1981. — 606 с.
2. Соколов С.Л., Сазонова О.И., Гафаров А.Б., Иванова А.А., Ветрова А.А., Присяжная Н.В., Кошелева И.А., Боронин А.М. Оценка деградативного потенциала нефтеокисляющих микроорганизмов Балтийского моря в модельных микрокосмах // Биотехнология. — 2017. — Vol. 33. — No. 4. — P. 76–84.
3. Bento F.M., de Oliveira Camargo F.A., Okeke B.C., Frankenberger Jr., W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil // Microbiol. Res. — 2005. — Vol. 160. — No. 3. — P. 249–255.
4. Bodour A.A., Drees K.P., Maier R.M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — Vol. 69. — No. 6. — P. 3280–3287.
5. Dang N.P., Landfald B., Willassen N.P. Biological surface-active compounds from marine bacteria // Environ. Technol. — 2016. — Vol. 37. — No. 9. — P. 1151–1158.
6. Edwards K.R., Lepo J.E., Lewis M.A. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species // Mar. Pollut. Bull. — 2003. — Vol. 46. — No. 10. — P. 1309–1316.
7. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. The continuous cultivation of microorganisms: 2. Construction of a chemostat // Methods Microbiol. — 1970. — Vol. 2. — P. 277–327.
8. Fracchia L., Banat J.J., Cavallo M., Ceresa C., Banat I.M. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds // AIMS Bioeng. — 2015. — Vol. 2. — No. 3. — P. 144–162.

9. Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Smyth T.J.P., Banat I.M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2010. – Vol. 112. – No. 6. – P. 617–627.
10. Jain R.M., Mody K., Joshi N., Mishra A., Jha B. Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources // Colloids Surfaces B Biointerfaces – 2013. – Vol. 108. – P. 199–204.
11. Jang J.Y., Yang S.Y., Kim Y.C., Lee C.W., Park M.S., Kim J.C., Kim I.S. Identification of orfamide A as an insecticidal metabolite produced by *Pseudomonas protegens* F6 // J. Agric. Food Chem. – 2013. – Vol. 61. – No. 28. – P. 6786–6791.
12. Kügler J.H., Le Roes-Hill M., Sylđatk C., Hausmann R. Surfactants tailored by the class *Actinobacteria* // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 212.
13. Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 97. – No. 6. – P. 2327–2339.
14. Lima T.M.S., Procópio L.C., Brandão F.D., Carvalho A.M.X., Tótola M.R., Borges A.C. Biodegradability of bacterial surfactants // Biodegradation – 2011. – Vol. 22. – No. 3. – P. 585–592.
15. Makkar R.S., Cameotra S.S., Banat I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production // AMB Express. – 2011. – Vol. 1. – No. 5. – P. 1–19.
16. Malavenda R., Rizzo C., Michaud L., Gerçe B., Bruni V., Sylđatk C., Hausmann R., Lo Giudice A. Biosurfactant production by Arctic and Antarctic bacteria growing on hydrocarbons // Polar Biol. – 2015. – Vol. 38. – No. 10. – P. 1565–1574.
17. Niescher S., Wray V., Lang S., Kaschabek S.R., Schlömann M. Identification and structural characterisation of novel trehalose dinocardiomycolates from n-alkane-grown *Rhodococcus opacus* 1CP // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 70. – No. 5. – P. 605–611.
18. Peng F., Wang Y., Sun F., Liu Z., Lai Q., Shao Z. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53 // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 105. – No. 3. – P. 698–705.
19. Raaijmakers J.M., de Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics // FEMS Microbiol. Rev. – 2010. – Vol. 34. – No. 6. – P. 1037–1062.
20. Rapp P., Gabriel-Jurgens L.H.E. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase // Microbiology. – 2003. – Vol. 149. – No. 10. – P. 2879–2890.
21. Saimmai A., Rukadee O., Onlamool T., Sobhon V., Maneerat S. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by a new and promising strain of *Oleomonas sagaranensis* AT18 // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 28. – No. 10. – P. 2973–2986.
22. Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.M., Chopade B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review // Crit. Rev. Biotechnol. – 2010. – Vol. 30. – No. 2. – P. 127–144.
23. Silva R. de C.F.S., Almeida D.G., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – Vol. 15. – No. 7. – P. 12523–12542.
24. Tuleva B., Christova N., Cohen R., Stoev G., Stoineva I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain // J. Appl. Microbiol. – 2008 – Vol. 104. – No. 6. – P. 1703–1710.

STUDY OF THE STRUCTURE OF BIOSURFACTANTS SYNTHESIZED BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM SURFACE WATERS AND SEDIMENTS OF THE BALTIC SEA

K.V. PETRIKOV, A.A. VETROVA, A.A. IVANOVA,
Ya.A. DELEGAN, A.B. GAFAROV, S.L. SOKOLOV

G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino

A collection of hydrocarbon oxidizing microorganisms isolated from surface water samples and bottom sediments of the Baltic Sea has been studied for the formation of biological surfactants (Biosurfactants). Of the 178 microorganisms tested, 12 strains showed high surface activity (surface tension of the culture medium below 40 mN/m). Based on the results of the analysis of extracellular lipid extracts of these strains, two microorganisms were selected by thin layer chromatography for a more detailed determination of the structure of the biosurfactants produced by them. It was shown that the strain of *Rhodococcus* sp. 66s forms two homologous succinoyl trehalolipids. For the strain *Rhodococcus* sp. 74w, the formation of a lipopeptide, presumably a new, previously not described structure, was shown.

Keywords: bioremediation, oil destructors, biosurfactants, lipopeptides, glycolipids, *Rhodococcus*.

БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ АЛЬГИНАТА, ПРОДУЦИРУЕМОГО КЛЕТКАМИ *AZOTOBACTER VINELANDII* В ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФОРМЕ

Н.А. СТЕПАНОВ, Е.Н. ЕФРЕМЕНКО*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

В статье представлены результаты исследований и сравнительного анализа характеристик процесса получения коммерчески значимого продукта — альгината — при использовании в периодических условиях клеток бактерий *Azotobacter vinelandii* В-10436 в суспензионном и иммобилизованном в криогель поливинилового спирта (ПВС) виде. Было показано, что концентрация альгината при применении иммобилизованных клеток была выше в 1,2 раза в сравнении со свободными клетками при одинаковых условиях проведения процесса. Была продемонстрирована высокая продуктивность процесса получения альгината (0,035 г/л/ч) в среде, содержащей 30 г/л сахарозы, с использованием иммобилизованных клеток наряду с их продолжительным функционированием без потери метаболической активности в течение как минимум 5 рабочих циклов. По сравнению с аналогами продуктивность разработанного биокатализатора была в 4 раз выше, чем у клеток, иммобилизованных в агаровый композитный мембранный материал. Образцы альгината, продуцируемого иммобилизованными клетками *Azotobacter vinelandii* В-10436, характеризовались более высокой молекулярной массой (300–500 кДа) по сравнению с образцами полимера, синтезируемого свободными клетками (170–350 кДа).

Ключевые слова: альгинат, иммобилизованные клетки, криогель поливинилового спирта, *Azotobacter vinelandii*.

Введение

Альгинаты представляют собой полисахариды, состоящие из остатков маннуровой и гулуруновой кислот [13], характеристики которых сильно варьируют по соотношению и расположению остатков маннуровой и гулуруновой кислот [10]. Альгинаты и их соли широко используются в качестве стабилизаторов, загустителей и гелеобразователей в пищевой промышленности, фармацевтической промышленности, при производстве косметических средств, для производства раневых повязок, систем доставки лекарств и в регенеративной тканевой инженерии, а также как носители для иммобилизации клеток и ферментов [7, 8, 12].

Альгинаты получают в основном экстракцией из некоторых видов бурых водорослей, где содержание этих полисахаридов может достигать 40% от суммы сухих веществ в их биомассе [5]. Однако альгинаты, получае-

мые из водорослей, представляют собой полисахариды с широким диапазоном молекулярной массы и различным соотношением маннуроносовой и гулуруносовой кислот в зависимости от места и времени их культивирования, что ограничивает их применение, например, в фармакологии, где необходимы полимеры определенной молекулярной массы и состава [3]. Некоторые виды бактерий, принадлежащие к родам *Azotobacter* [15] и *Pseudomonas* [4], могут синтезировать альгинаты с более определенным композиционным составом без его сезонных изменений [9]. Бактериальные альгинаты обычно имеют более высокую молекулярную массу, чем полученные из водорослей. Так, молекулярная масса альгинатов водорослей варьирует в диапазоне 48–186 кДа, тогда как у бактериальных полимеров это значение может быть в несколько раз выше [11]. При этом основное внимание уделяется клеткам бактерий *Azotobacter* как перспективным продуцентам альгината [18].

На синтез и свойства этих полисахаридов значительное влияние оказывают условия культивирования клеток-продуцентов (рН, температура, состав среды, аэрация) [16, 19]. Существенной проблемой получения альгината являются накопление полимера в процессе роста клеток и увеличение их концентрации в среде. Это приводит к тому, что часть потребляемого субстрата клетки расходуют на накопление своей биомассы, а не

© 2017 г. Степанов Н.А., Ефременко Е.Н.

* Автор для переписки:

Ефременко Елена Николаевна

доктор биол. наук, профессор, зав. лабораторией экобиокатализа кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН

E-mail: elena_efremenko@list.ru

на синтез целевого полимера [14]. Для интенсификации процесса получения альгината привлекательным подходом представляется использование клеток в сконцентрированной форме. Повышение концентрации клеток в реакторе приводит к снижению скорости их размножения и увеличению конверсии потребленного субстрата в целевой продукт. Такое состояние клеток можно поддерживать благодаря их иммобилизации, однако сегодня подобные исследования единичны [6, 17], что связано, прежде всего, с использованием носителей, имеющих маленький размер пор, ограничивающий массообменные процессы, играющие существенную роль для клеток в процессах биосинтеза полисахаридов.

В связи с этим в настоящей работе была исследована возможность применения криогеля поливинилового спирта (ПВС) в качестве носителя для иммобилизации клеток *Azotobacter vinelandii*, продуцирующих альгинат. Интерес к этому исследованию был обусловлен тем, что криогель ПВС имеет высокопористую структуру, которая обеспечивает благоприятные условия для массообменных процессов с участием различных иммобилизованных микроорганизмов, и является тем носителем, который ранее был уже успешно применен для иммобилизации клеток-продуцентов таких полисахаридов, как декстран и пуллулан [1, 2].

Материалы и методы

В работе использовался штамм бактерий *Azotobacter vinelandii* В-10436, который был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Культивирование клеток проводилось в аэробных условиях с использованием термостатируемых шейкер-инкубаторов «Adolf Kuhner AG» (Швейцария) и «BioSan ES-20» (Литва), обеспечивающих возможность постоянного перемешивания культуральной жидкости (250 об/мин).

Для накопления бактериальной биомассы при 29 ± 1 °С использовалась питательная среда следующего состава (г/л): сахароза — 20; дрожжевой экстракт — 6; K_2HPO_4 — 0,9; KH_2PO_4 — 0,1; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,1; Na_2MoO_4 — 0,005; $FeSO_4 \times 7H_2O$ — 0,01; рН $7,2 \pm 0,1$. Культивирование вели в течение 21 ч при 200 об/мин.

Рост клеточной популяции контролировался при 540 нм на спектрофотометре Agilent UV-8453 (Германия), а точная концентрация клеток определялась по калибровочным графикам, устанавливающим зависимость величины оптического поглощения от точно известной концентрации клеток в анализируемом образце.

Для получения иммобилизованных клеток к водному раствору ПВС (13 мас.%) добавлялась биомасса клеток бактерий (30 мас.% влажный вес), предварительно отделенная от культуральной среды центрифугированием (Avanti J 25, Beckman Coulter) при 8000 об/мин в течение 10 мин, и перемешивалась до получения однородной массы, которая затем использовалась для формирования гранул путем розлива суспензии клеток в водном растворе ПВС по 0,5 мл в 96-луночные планшеты. Планшеты далее замораживались при -20 °С, выдерживались в замороженном состоянии в течение 24 ч, а затем размораживались при 8 °С в течение 8–12 ч. Образовавшиеся гранулы криогеля ПВС с клетками, включенными в носитель при его формировании в ходе процесса замораживания-оттаивания, использовались в экспериментах. Величина рН в экспериментах контролировалась потенциометрически (рН-метр PBL, Швейцария).

Для получения альгината использовалась среда следующего состава (г/л): сахароза — 20; дрожжевой экстракт — 3; K_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,4; $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0,2; NaCl — 0,2; Na_2MoO_4 — 0,003; $FeSO_4 \times 7H_2O$ — 0,003; CaCl₂ — 0,5, рН $7,2 \pm 0,1$. Процесс велся при 29 ± 1 °С в течение 96 ч в колбе Эрленмейера объемом 250 мл с объемом среды 25 мл при 200 об/мин.

Концентрация сахарозы определялась с помощью жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1100 с амперометрическим детектором (США) и анионообменной колонкой Dionex Carborak PA-20.

Альгинат из культуральной жидкости выделялся следующим образом: в культуральную жидкость (10 мл) добавляли 1 мл (10 мМ) 4Na-ЭДТА (тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты), выдерживали в течение 5 минут и центрифугировали при 15000 об/мин в течение 20 мин. Полученный супернатант, содержащий альгинат, осаждали с использованием охлажденного 95% этанола (соотношение 1:3), а затем центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин, супернатант сливали и процедуру повторяли. Полученный осадок высушивался при 80 °С до постоянной массы. Для определения сухого веса навеску биомассы клеток, отделенных от культуральной жидкости центрифугированием (10000 об/мин., 5 мин) на центрифуге Avanti J25 (Beckman Coulter), доводили до постоянной массы высушиванием. Гранулу биокатализатора также высушивали до постоянной массы; зная начальные концентрации клеток и массу полимера, используемую при формировании гранул, рассчитывали концентрации клеток в биокатализаторе по сухому весу.

Молекулярная масса альгината, синтезированного клетками в свободном и иммобилизованном виде, определялась с использованием гель-фильтрационной хроматографии с использованием колонок Ultrahydrogel 500 на ВЭЖХ с дифференциальным рефрактометрическим детектором (Waters 2414). Элюирование проводили 0,1 М NaNO₃ при 35 °С и скорости потока 0,9 мл/мин.

Результаты и обсуждение

Для оценки эффективности синтеза альгината иммобилизованными клетками процесс проводился с

использованием среды, содержащей 20 г/л сахарозы (рН 7,2), в течение 120 ч при температуре 29±1 °С (рис. 1).

Параллельно был проведен процесс в аналогичных условиях с использованием свободных клеток. Начальная концентрация клеток в среде была одинаковой и составляла 0,2 г (сух. вес)/л. Концентрация свободных клеток в среде в конце процесса была практически одинаковой в обоих случаях (3,6±1 г/л). При этом практически вся сахароза, исходно вносимая в среду, потреблялась иммобилизованными клетками уже к 72 ч, что у свободных клеток отмечалось лишь на 1 сутки позже (см. рис. 1).

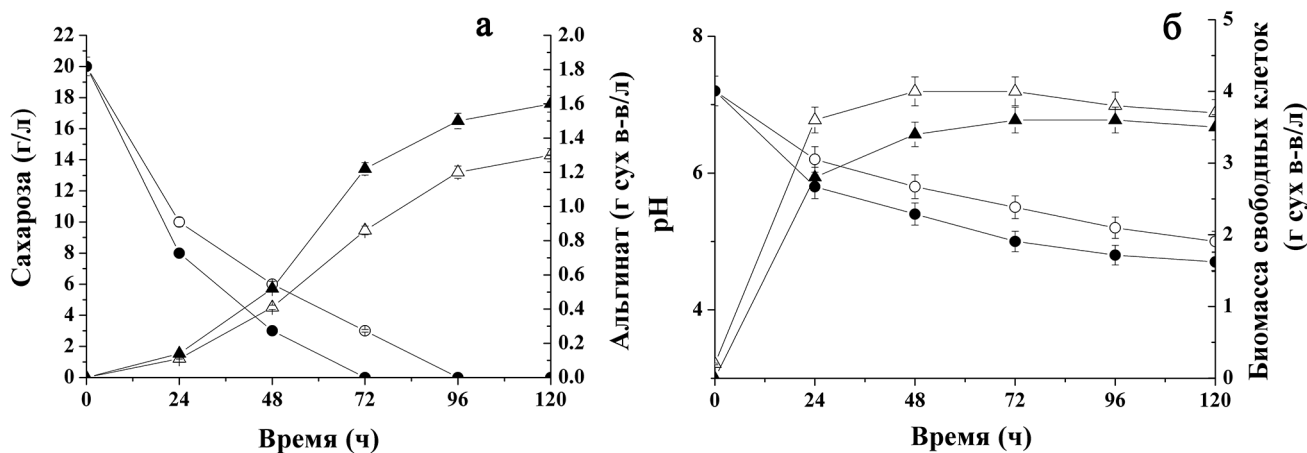


Рис 1. Кинетика процесса потребления сахарозы и накопления альгината в среде (а), изменение рН среды и накопление свободных клеток (б) при культивировании клеток *Azotobacter vinelandii* В–10436 в свободной (○, Δ) и иммобилизованной форме (●, ▲)

Это свидетельствовало о том, что клетки после процедуры иммобилизации, состоящей в замораживании клеточной суспензии в растворе ПВС с одновременным образованием криогелевой матрицы вокруг них, были метаболически активными и процессы клеточного метаболизма не были диффузионно ограниченными (рис. 2).

Величина рН среды снижалась в процессе культивирования иммобилизованных клеток значительно в сравнении со свободными, и после 120 ч значение этого параметра достигало 4,8±1, что свидетельствовало о более интенсивном образовании метаболитов.

Было установлено, что концентрация альгината, накапливающегося при использовании иммобилизованных клеток, выше в 1,2 раза в сравнении с результатом, получаемым в среде со свободными клетками. Следует отметить, что при использовании клеток *A. vinelandii*, иммобилизованных в известном исследовании [17] в агаровый композитный материал, был получен иной результат — там концентрация альгината была ниже в сравнении со свобод-

ными клетками на 8%. Теми же авторами отмечалось, что бактериальные клетки растут в течение 72 ч, и большая часть полисахарида накапливается при переходе клеток в стационарную фазу роста. Максимальная концентрация альгината (0,9 г/л) накапливалась к 100-му часу процесса, при этом потребление сахарозы в начале процесса было медленнее в сравнении со свободными клетками.

Таким образом, в сравнении с аналогом в данном исследовании с использованием клеток, иммобилизованных в криогель ПВС, потребление сахарозы происходило быстрее в сравнении со свободными клетками, и концентрация альгината, полученная к 96-му часу культивирования, была в 1,7 раза выше, чем при использовании агарового носителя.

При определении средней молекулярной массы полученных образцов полисахаридов было показано, что этот параметр в случае использования иммобилизованных клеток был в диапазоне 300–500 кДа, а альгинаты, полученные при культивировании свободных клеток,

характеризовались более низкой молекулярной массой (170–350 кДа). Подобная тенденция отмечалась и ранее при использовании клеток, иммобилизованных в агаровый композитный материал для получения альгината, где средний молекулярный вес полисахарида составил 200–300 кДа и 168 ± 58 кДа, соответственно, при использовании иммобилизованных и свободных клеток [6, 17].

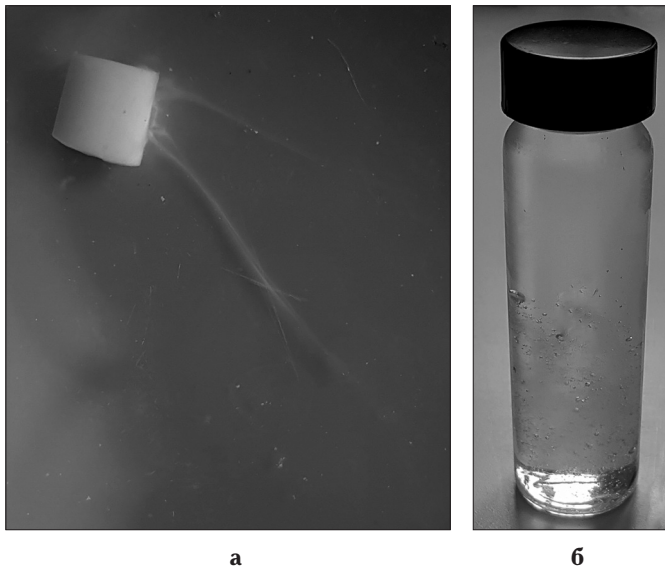


Рис. 2. Визуализация выхода альгината из гранулы с иммобилизованными клетками продуцента (а) и выделение синтезированного полимера в результате обработки культуральной среды этанолом (б)

В ряде работ для свободных клеток (для иммобилизованных клеток такая информация в литературе отсутствует) отмечалось, что 6–8 об% концентрация клеточного инокулята в среде является оптимальной для синтеза альгината [16, 20]. Увеличение концентрации инокулята в среде свыше 6% приводит к снижению выхода полисахарида.

Поскольку исходная концентрация клеток в среде является важным фактором для процесса, то в этой работе также было исследовано влияние варьирования концентрации исходно вводимых в среду иммобилизованных клеток от 0,4 до 4 г сух в-в/л на характеристики процесса получения альгината (табл. 1). Было установлено, что при увеличении концентрации иммобилизованных клеток в среде в диапазоне от 0,4 до 2,4 г/л повышается скорость накопления и выход альгината. При этом накопление свободных клеток в среде было практически одинаковым во всех образцах. Сахароза потреблялась полностью иммобилизованными клетками уже к 48 ч культивирования, а максимальная концентрация полисахарида накапливалась к 72 ч процесса. Самая высокая

продуктивность процесса 0,029 г/л/ч была отмечена при исходной концентрации иммобилизованных клеток в среде 2,4 г сух. в-в/л.

Таблица 1

Характеристики процесса получения альгината при культивировании иммобилизованных клеток, введенных исходно в среду в разных концентрациях при постоянной концентрации сахарозы (20 г/л)

| Концентрация клеток, г сух. в-в/л | Альгинат, г сух. в-в/л | Продуктивность процесса по альгинату, г/л/ч | Концентрация свободных клеток в среде, г сух в-в/л |
|-----------------------------------|------------------------|---|--|
| 0,4 | $1,65 \pm 0,02$ | $0,023 \pm 0,002$ | $3,8 \pm 0,4$ |
| 0,8 | $1,71 \pm 0,03$ | $0,024 \pm 0,001$ | $4,1 \pm 0,4$ |
| 1,6 | $1,92 \pm 0,03$ | $0,027 \pm 0,002$ | $4,5 \pm 0,5$ |
| 2,4 | $2,06 \pm 0,04$ | $0,029 \pm 0,001$ | $4,2 \pm 0,5$ |
| 3,2 | $1,93 \pm 0,03$ | $0,027 \pm 0,001$ | $4,0 \pm 0,4$ |
| 4,0 | $1,85 \pm 0,03$ | $0,026 \pm 0,001$ | $4,0 \pm 0,4$ |

Увеличение концентрации иммобилизованных клеток в среде свыше этого значения приводило к уменьшению продуктивности процесса, что, вероятно, было связано с лимитированием иммобилизованных клеток по субстрату, либо с затруднением массообменных процессов из-за увеличения вязкости среды.

Также было исследовано влияние исходной концентрации сахарозы, вносимой в среду, на выход альгината при постоянной исходной концентрации иммобилизованных клеток в среде (2,4 г сух. в-в/л). Для этого проварьировали концентрацию сахарозы в диапазоне от 25 до 50 г/л (табл. 2).

Таблица 2

Характеристики процесса получения альгината при культивировании иммобилизованных клеток при варьировании концентрации сахарозы в среде от 25 до 50 г/л

| Концентрация сахарозы, г/л | Альгинат, г сух. в-в/л | Продуктивность процесса по альгинату, г/л/ч |
|----------------------------|------------------------|---|
| 25 | $2,12 \pm 0,03$ | $0,029 \pm 0,001$ |
| 30 | $2,52 \pm 0,04$ | $0,035 \pm 0,002$ |
| 40 | $2,53 \pm 0,05$ | $0,036 \pm 0,001$ |
| 50 | $2,52 \pm 0,03$ | $0,035 \pm 0,001$ |

Было показано, что с исходной концентрацией сахарозы в среде 30 г/л наблюдалось увеличение концентрации альгината; при этом продуктивность процесса

по целевому продукту возрастала в 1,2 раза в сравнении с концентрацией 20 г/л (см. табл. 1). С увеличением исходной концентрации сахарозы свыше 30 г/л не происходило увеличения продуктивности процесса и повышения уровня накопления целевого продукта с учетом потребленного субстрата.

При исследовании возможности многократного использования иммобилизованных клеток *A. vinelandii* В-10436 для получения альгината они после каждого рабочего цикла продолжительностью 72 ч промывались стерильным раствором 0,9% NaCl и помещались в свежую питательную среду, содержащую 30 г/л сахарозы (рис. 3). Процесс велся при 29 ± 1 °С, 200 об/мин, рН среды 7,0. Было показано, что иммобилизованные клетки сохраняют 100% метаболическую активность даже после 5 рабочих циклов (суммарно 360 ч использования). Уровень накопления альгината при этом составлял $2,5 \pm 0,1$ г/л.

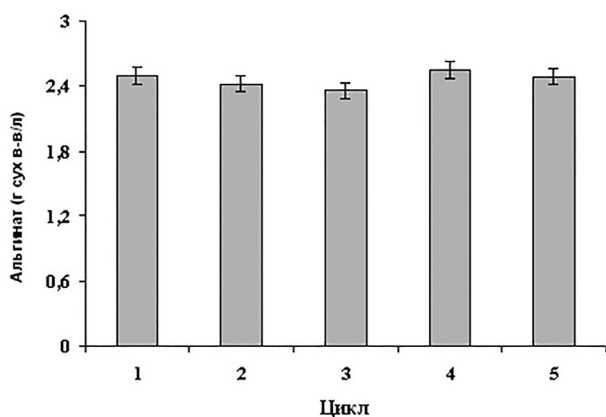


Рис. 3. Многократное использование иммобилизованных в криогель ПВС клеток *A. vinelandii* В-10436 в процессе получения альгината в среде, содержащей 30 г/л сахарозы (продолжительность каждого цикла – 72 ч)

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований были продемонстрированы возможность и высокая эффективность применения иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. vinelandii* В-10436 в процессе получения альгината. Иммобилизованные клетки характеризуются существенно более высоким выходом конечного продукта по сравнению со свободными клетками. Кроме того, была показана возможность многократного применения иммобилизованных в криогель ПВС клеток с сохранением 100% их метаболической

активности в течение как минимум 5 рабочих циклов, осуществляемых в периодических условиях культивирования клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 16-08-00457).

Литература

1. Сенько О.В., Ефременко Е.Н. Высококонцентрированные популяции клеток *Aureobasidium pullulans* в биокаталитических процессах получения пуллулана // Катализ в промышленности. – 2017. – № 2. – С. 166–170.
2. Степанов Н.А., Сенько О.В., Ефременко Е.Н. Биокаталитическое получение внеклеточного экзополисахарида – декстрана, продуцируемого клетками *Leuconostoc mesenteroides* // Катализ в промышленности. – 2017. – № 2. – С. 161–165.
3. Galindo E., Peña C., Núñez C., Segura D., Espín G. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* // Microb. Cell Fact. – 2007, – Vol. 6. – P. 7.
4. Hay I.D., Gatland K., Campisano A., Jordens J.Z., Rehm B.H.A. Impact of alginate overproduction on attachment and biofilm architecture of a supermucoid *Pseudomonas aeruginosa* strain // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – Vol. 75(18). – P. 6022–6025.
5. Hay I.D., Rehman Z.U., Moradali M.F., Wang Y., Rehm B.H.A. Microbial alginate production, modification and its applications // Microb. Biotechnol. – 2013. – Vol. 6(6). – P. 637–650.
6. Lebrun L., Junter G-A., Jouenne T., Mignot L. Exopolysaccharide production by free and immobilized microbial cultures // Enzyme Microb. Technol. – 1994. – Vol. 16(12). – P. 1048–1054.
7. Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: properties and biomedical applications // Prog. Polym. Sci. – 2012. – Vol. 37(1). – P. 106–126.
8. Lim G.J., Zare S., Van Dyke M., Atala A. Cell microencapsulation // Adv. Exp. Med. Biol. – 2010. – Vol. 670. – P. 126–136.
9. Maleki S., Almaas E., Zotchev S., Valla S., Ertesvåg H. Alginate biosynthesis factories in *Pseudomonas fluorescens*: Localization and correlation with alginate production level // Appl. Environ. Microbiol. – 2016. – Vol. 82(4). – P. 1227–1236.
10. Pacheco-Leyva I., Guevara Pezoa F., Díaz-Barrera A. Alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*: Overview of molecular mechanisms in connection with the oxygen availability // Int. J. Polym. Sci. – 2016. – Vol. 2016, Article ID 2062360, 12 pages. doi:10.1155/2016/2062360.
11. Peña C., Miranda L., Segura D., Núñez C., Espín G., Galindo E. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly-β-hydroxybutyrate and alginate

- biosynthesis // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — Vol. 29(5). — P. 209–213.
12. *Rehm B.H.A.* Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications // Nat. Rev. Microbiol. — 2010 — Vol. 8(8). — P. 578–592.
 13. *Remminghorst U., Rehm B.H.A.* Bacterial alginates: from biosynthesis to applications // Biotechnol. Lett. — 2006. — Vol. 28(21). — P. 1701–1712.
 14. *Sabra W., Zeng A.P.* Microbial production of alginates: physiology and process aspects / In: *Rehm B.H.A.* (ed.). *Alginates: Biology and Applications*. Microbiology Monographs 13. — Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. — P. 153–173.
 15. *Saeed S., Hashmi A.S., Haq I., Tayyab M., Awan A.R., Anjum A.A., Firyal S.* Bioconversion of agricultural by-products to alginate by *Azotobacter vinelandii* and physico-chemical optimization for hyper-production // J. Anim. Plant Sci. — 2016. — Vol. 26(5). — P. 1516–1521.
 16. *Saeed S., Hashmi A.S., Ul-Haq I., Tayyab M., Awan A.R., Anjum A.A., Firyal S.* Hyperproduction of alginate by mutated strain of *Azotobacter vinelandii* through submerged fermentation // Pakistan J. Zool. — 2016. — Vol. 48(5). — P. 1585–1589.
 17. *Saude N., Junter G.-A.* Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter vinelandii* // Process. Biochem. — 2002. — Vol. 37(8). — P. 895–900.
 18. *Then C., Othman Z., Mustapha W.A.W., Roji Sarmidi M., Aziz R., El Enshasy H.A.* Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* in semi-industrial scale using batch and fed-batch cultivation systems // J. Adv. Sci. Res. — 2012. — Vol. 3(4). — P. 45–50.
 19. *Trujillo-Roldán M.A., et al.* The production, molecular weight and viscosifying power of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* is affected by the carbon source in submerged cultures // Dyna (Medellin, Colombia). — 2015. — Vol. 82(194). — P. 21–26.
 20. *Vermani M.V., Kelkar S.M., Kamat M.Y.* Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate // Lett. Appl. Microbiol. — 1997. — Vol. 24. — P. 379–383.

BIOCATALYTIC PREPARATION OF ALGINATE PRODUCED BY *AZOTOBACTER VINELANDII* CELLS IN IMMOBILIZED FORM

N.A. STEPANOV, E.N. EFREMENKO

M.V. Lomonosov Moscow State University

This paper presents the results of investigation and comparative analysis of process characteristics of commercially important alginate production by using *Azotobacter vinelandii* B-10436 cells in periodic conditions in forms of free and immobilized into poly(vinyl alcohol) cryogel. It was shown that alginate concentration was 1.2 times higher when immobilized cells were used in comparison with suspended cells under identical process conditions. The high process productivity was revealed (0.035 g/l/h) on a medium containing 30 g/l of sucrose under for immobilized cells in addition to their prolonged operation activity without any loss of metabolic activity for at least 5 working cycles. In comparison with analogues the productivity of developed biocatalyst was 4 times higher than that of cells immobilized in agar composite membrane material. Samples of alginate produced by immobilized cells *Azotobacter vinelandii* B-10436 had higher molecular weight (300–500 kDa) as compared to the polymer synthesized by free cells (170–350 kDa).

Keywords: alginate, immobilized cells, poly(vinyl alcohol), cryogel, *Azotobacter vinelandii*.

ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ ПВС-КСАНТАНА И АНАЛИЗ ИХ ПРИМЕНИМОСТИ КАК НОСИТЕЛЕЙ ХЛОРОФИЛЛА

Н.П. БАБИЧЕНКО¹, А.Ю. ШАТАЛОВА², П.М. ГОТОВЦЕВ^{2*}, Г.У. БАДРАНОВА²,
Я.Э. СЕРГЕЕВА², К.В. ГОРИН², Р.Г. ВАСИЛОВ²

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,

²НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Полимерные гидрогели широко применяются в медицине и в фармакологии в качестве матриц-носителей лекарственных веществ. В настоящей работе была произведена экстракция додеканолом суммарных пигментов с преобладанием смеси хлорофиллов из биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* штамма GKV1. Были синтезированы гидрогели на основе поливинилового спирта и ксантана в различных соотношениях 1:0,75, 1:0,5 и 1:0,25 с добавлением экстракта суммарных пигментов (ЭСП) с преобладанием смеси хлорофиллов. Было установлено, что у синтезированных гидрогелей имеется способность к набуханию и резкому увеличению массы в водной среде, а затем — уменьшению массы и выделению ЭСП и смеси хлорофиллов: особенно у гидрогелей PVA (2,5%):XNT (2,5%) в соотношении 1:0,75 и 1:0,5, добавленных в них при синтезе. Это позволяет в дальнейшем использовать гидрогели в качестве материалов доставки биокосмецевтических средств, таких как хлорофилл.

Ключевые слова: полимерный гидрогель, поливиниловый спирт, ксантан, хлорофиллы, матрица-носитель, набухаемость.

Введение

Все чаще в качестве биоматериалов в медицине используются полимерные материалы, среди которых на сегодняшний день наиболее универсальными и перспективными являются полимерные гидрогели благодаря своей безопасности, хорошей биосовместимости, отсутствию токсичности и инертности по отношению к активным химическим веществам. Гидрогели представляют собой трехмерные, поперечно связанные сети различных полимеров, растворимых в воде, которые могут быть созданы фактически из любого растворимого в воде полимера, охватывая широкий спектр дополнительных химических составов и проявляя различные физические свойства. Кроме того, гидрогели могут быть организованы во многие физические формы, например, пленки, и могут включать в себя микро- или наночастицы, биоме-

дицинские препараты, различные субстанции. Гидрогели обычно используются в общей клинической практике, научно-экспериментальной и реконструктивной медицине [23], в лабораторной диагностике [39], при клеточной иммобилизации [17] и разделении биомолекул или клеток [6]. Уникальные физические свойства гидрогелей вызвали особый интерес в применении доставки лекарственных средств. Их пористая структура может легко деформироваться благодаря плотности связей между звеньями в матрице гидрогеля и способности гидрогелей набухать и увеличиваться в водной среде, окружающей их. Их пористость также позволяет внедрять лекарственные средства в матрицу гидрогеля и в последующем выделять препарат со скоростью, зависящей от коэффициента проникновения микромолекулы или макромолекулы через сеть гидрогеля.

Применение гидрогелей актуально в фармакологии, используя их как средство доставки лекарственных средств, а также некоторого «хранилища препарата», предполагающего, что лекарственные средства медленно извлекаются, поддерживая высокую местную концентрацию препарата в окружающих тканях на длительный период. Они могут также использоваться для системной доставки лекарств. Биосовместимость гидрогеля обусловлена его способностью содержать в себе большое

© 2017 г. Бабиченко Н.П., Шаталова А.Ю., Готовцев П.М., Бадранова Г.У., Сергеева Я.Э., Горин К.В., Васильев Р.Г.

* Автор для переписки:

Готовцев Павел Михайлович

кандидат технических наук

НИЦ «Курчатовский институт»

123182 Москва, пл. Академика Курчатова, 1

E-mail: gotovtsevpm@gmail.com

количество воды и быть сходным по физико-химическим свойствам и составу с природным внеклеточным матриксом. Способность к разложению микроорганизмами или саморазложению может быть спровоцирована в гидрогеле физическими и химическими путями (например, изменением рН, температуры или действием электрического поля). Гидрогели также довольно часто деформируются и могут соответствовать форме поверхности, к которой они были приспособлены. Например, биосвязывающие свойства некоторых гидрогелей могут быть полезными при фиксации их на определенных негоризонтальных поверхностях. Несмотря на эти многие положительные характеристики, гидрогели также имеют некоторые недостатки: ограниченные количества и концентрации препарата, проникающего в гидрогель, особенно в случае гидрофобных соединений; содержание значительного количества воды и крупные размеры пор большинства гидрогелей часто приводят к относительно быстрому выходу препарата из их матриц [15].

Гидрогели подразделяют на два вида: физические (физическая «сшивка») и химические (химическая «сшивка»). Физические гидрогели относятся к обратимым, в этом случае сетка гидрогеля закреплена за счет переплетения молекул и/или ионных, водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Такие гидрогели негомогенны вследствие наличия кластеров переплетений молекул или доменов ионных ассоциатов. Свободные концы цепей и петли молекулярных цепей также являются переходными дефектами сетки в гидрогелях данного типа. Эти гидрогели могут быть разрушены при изменении физических условий — ионной силы, рН, температуры, при воздействии давлением или добавлении растворов веществ, конкурирующих с полимерными лигандами. Кроме того, физические гидрогели могут образовываться в результате реакций гидрофобных полимеров [35]. Например, если при гидролизе полиакрилонитрила нитрильные группы остаются в достаточном количестве, они могут стабилизировать гидрогель за счет гидрофобных взаимодействий, таким образом, формируя физический гидрогель [39]. Одним из способов физической сшивки является метод замораживания/оттаивания, где важную роль играет количество циклов замораживания-оттаивания синтезированных гидрогелей. Было изучено, что гидрогели на основе поливинилового спирта (ПВС, polyvinyl alcohol, PVA), полученные циклами замораживания-оттаивания, имеют большой потенциал для медико-биологических целей и доставки лекарственных средств из-за регулируемых механических свойств и параметров набухания [14]. Эти гидрогели были созданы, подвергая водные растворы PVA повторными

циклами замораживания (при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) и оттаивания (при комнатной температуре), что приводило к образованию кристаллитов, которые придают материалу нерастворимость в воде. Эти физические PVA-гидрогели показали, что в них усиливается набухание и повышается механическая прочность по сравнению с традиционными гидрогелями, полученными с помощью химического метода. Прочность, устойчивость и набухание гелей зависят от концентрации раствора, времени замораживания и количества циклов замораживания-оттаивания [13, 36, 38]. Реологические исследования PVA-гидрогелей, полученных от 1 до 5 циклами замораживания-оттаивания, привели к выводу, что в PVA-гидрогелях увеличивается жесткость структуры, когда увеличивается число циклов замораживания-оттаивания. Поэтому PVA-гидрогели можно рассматривать как сложные системы, структура и макроскопические свойства которых зависят от ряда явлений (кристаллизации, образования водородных связей), возникающих в процессе гелеобразования [30]. Таким образом, вышеописанные свойства и стабильность PVA-гидрогелей делают их подходящими кандидатами для использования в области фармацевтики [36].

В отличие от физических гидрогелей, химические являются необратимыми и представляют собой ковалентно сшитые сетки. В сшитом состоянии для химических гидрогелей величина достигаемого равновесного набухания зависит от плотности сшивки (оцениваемой по молекулярной массе фрагмента цепи между сшивками). Подобно физическим гидрогелям, химические — негомогенны. Они, как правило, содержат области с низким набуханием в воде и высокой плотностью сшивки, называемые кластерами, которые распределены внутри. В ряде случаев в зависимости от строения растворителя, температуры и концентрации растворенных веществ при формировании гидрогеля может иметь место фазовое разделение и могут формироваться заполненные водой пустоты или поры. В химических гидрогелях свободные концы цепей являются дефектами сетки, не вносящими вклад в ее эластичность [2].

Для повышения стабильности и улучшения реологических свойств гидрогеля проводят совместный синтез PVA с природными полисахаридами, например, каррагинаном (CRG) или ксантаном (XNT). Полисахариды представляют собой большой класс природных биополимеров, обладающих пригодными физико-химическими свойствами для использования в фармацевтической и косметической промышленности в качестве эксципиентов. При этом полисахариды обладают хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью, отсутствием

иммуногенной активности и токсичности, а также большой гидрофильностью и гелеобразовательной способностью, в связи с чем их можно использовать в качестве агента для гелеобразования, повышающего вязкость гидрогеля и обеспечивающего длительное удерживание, контролируемое высвобождение лекарственного средства или косметической активной субстанции и возможность пролонгации действия препарата [12, 26]. Раствор полисахаридов может использоваться в производстве соединений в целях поглощения и удержания влаги, а также удешевления производства [9]. Небольшие изменения внешних параметров, таких как концентрация PVA, pH и температура, оказывают значительное влияние на способность гидрогелей к набуханию. Так как эти параметры могут влиять на скорость высвобождения и концентрацию лекарственного средства, они должны быть хорошо подобраны и исследованы [7, 37].

Интересным применением гидрогелей могло бы стать насыщение их каким-либо пигментом, который далее постепенно бы высвобождался. В настоящей работе был рассмотрен природный зеленый пигмент — хлорофилл, относящийся к магниевому производному порфирина и играющий центральную роль в фотосинтезе растений и фототрофных микроорганизмов [8]. Однако хлорофилл достаточно неустойчив при изменении температуры и pH, что ограничивает его применение в чистом виде. В связи с этим все чаще используют металлокомплексы производных хлорофилла *a*, образующихся путем замещения Mg^{2+} в молекуле хлорофилла ионами переходных металлов (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}), формируя при этом более прочную связь, что придает им большую стабильность и устойчивость особенно к кислотам и высоким температурам [21]. Так, например, хлорофилла медный комплекс — натуральный краситель зеленого цвета по сравнению с хлорофиллом обладает более высокой термо- и светостойкостью, он нерастворим в воде, хорошо растворим в водно-спиртовых растворах, растительных маслах [1].

На сегодняшний день в государственном реестре лекарственных препаратов зарегистрированы две формы лекарственных средств, содержащих смесь хлорофиллов: «Хлорофиллипт» и «Хлорофиллин ОЗ», которые предназначены для наружного лечения ран различного происхождения, в том числе ожогов и язв [16]. Высокая и разнообразная биологическая активность, отсутствие токсичности и побочных явлений, а также хорошая совместимость с компонентами фармацевтического и косметического сырья послужили надежной базой для использования хлорофилла *a* и его производных не только в качестве наружных лечебных препаратов, но

и в косметических средствах различного назначения (кремы, зубные пасты, гели, маски, дезодоранты) в качестве красителя, дезодорирующего, противовирусного, противогрибкового средства. Также производные хлорофилла *a* способствуют восстановлению водно-липидного баланса кожи [1]. Описана антиоксидантная активность производных хлорофилла *a*, при этом наибольшей активностью обладают феофорбид *b* и феофитин *b*, а медный хлорофиллин показал наиболее сильную антиоксидантную активность по сравнению с природными производными хлорофилла *a* [22]. В 2015 году было опубликовано исследование о влиянии медно-натриевого хлорофиллина, заключенного в липосомы, в результате которого установлено, что данный комплекс уменьшает клинические проявления фотостарения кожи [33]. Была также выявлена способность производных хлорофиллина ингибировать гиалуронидазу, что также указывает на возможность использовать данные производные в средствах для омоложения кожи [28].

На протяжении последних десятков лет в разных областях медицины, в том числе дерматологии и косметологии, применяется фотодинамическая терапия (ФДТ), основанная на способности некоторых препаратов-фотосенсибилизаторов избирательно накапливаться в дефектных тканях и под действием лазерного излучения определенной длины волны вырабатывать синглетный кислород, оказывающий цитотоксический эффект. Производные хлорофилла *a* хорошо зарекомендовали себя при ФДТ акне, проявляя не только противовоспалительный эффект [18, 40], но и способствуя уменьшению комедонов и жирности кожи [34]. В исследовании [31] показано, что при ФДТ на основе хлорина e_6 в кератиноцитах, инфицированных *Propionibacterium acnes*, стимулируется выработка коллагена и уменьшается экспрессия матриксных металлопротеиназ, что позволяет использовать производные хлорофилла *a* для омоложения кожи лица у больных с акне. В лечении злокачественных новообразований кожи путем ФДТ используют такие производные хлорофилла *a*, как феофорбид *a*, хлорин e_6 , радахлорин [20, 32, 41]. При этом отмечено, что у фотосенсибилизаторов на основе производных хлорофилла *a* есть ряд преимуществ: минимальный риск побочных эффектов, более быстрое время наступления действия и эффекта по сравнению с другими фотосенсибилизаторами, также являясь более экономичным сырьем по сравнению с последними [19]. Обращает на себя внимание, что все фотосенсибилизаторы требуют системного способа доставки. Однако в 2015 г. корейские ученые опубликовали данные об успешном использовании трансдермального

фотосенсибилизатора на основе хлорина e_6 при ФДТ меланомы кожи [5].

Таким образом, гели на основе PVA+полисахарид могут стать перспективными в фармацевтической и косметологической области как носители хлорофилла и/или его производных.

Целью настоящей работы было выделение ЭСП из биомассы микроводоросли; синтез гидрогелей как носителей биокосметевтических субстанций (хлорофилла) из смеси PVA и XNT, а также оценка набухаемости и устойчивости гидрогелей в зависимости от циклов замораживания-оттаивания в водной среде и выделения хлорофиллов из гидрогеля.

Материалы и методы

Материалы

Реактивы:

- поливиниловый спирт (ХимМед, Россия);
- растворы $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05М и Na_2SO_4 0,05М были получены из солей, поставленных компаний ХимМед (Россия);
- ксантан (Special Ingredients, UK);
- биомасса микроводоросли *Chlorella vulgaris* GKV1 (коллекция отдела биотехнологий и биоэнергетики, НИЦ «Курчатовский Институт»);
- додеканол (ХимМед, Россия).

Культивирование микроводоросли *Chlorella vulgaris* GKV1

Микроводоросли *C. vulgaris* выращивали на питательной среде, состоявшей из (г/л): KNO_3 , 1,25; KH_2PO_4 , 1,25; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1; $CaCl_2$, 0,0835; H_3BO_3 , 0,1142; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0498; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0882; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,0144; MoO_3 , 0,0071; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,0157; $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 0,0049; EDTA·2Na, 0,5. Все соли приобретались в ХимМед (Россия). Среда для культивирования — фильтрованная вода, начальное значение pH 7. Инокулят получали в колбах Эрленмейера на 250 мл, а затем проводили культивирование в колбах на 1000 мл и на 5000 мл. Культивирование вели при постоянном перемешивании среды за счет барботирования атмосферного воздуха (250 мл/мин) при постоянной температуре (24 ± 1 °C) и круглосуточном освещении 3000 лк. Культуру водорослей (с концентрацией $20 \cdot 10^6$ кл/мл) собирали в конце экспоненциальной фазы [11].

Экстракция смеси суммарных пигментов додеканолом из биомассы водорослей

Выделение суммарных пигментов из биомассы микроводоросли *C. vulgaris* GKV1 проводили согласно

методике [25], используя в качестве экстрагента додеканол. К 6 г (в пересчете на сухой вес) биомассы добавили 20 мл додеканола. Процесс экстракции проводили при температуре 4 °C в течение 48 часов. Биомассу водорослей осаждали центрифугированием (5 мин, 7500 об./мин), полученный экстракт суммарных пигментов (ЭСП) в додеканоле переносили в отдельную колбу. Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Thermo Scientific Genesis 10S-UV-Vis (США).

Синтез гидрогелей PVA (2,5%):XNT (2,5%) в различных соотношениях

Навески PVA массой 3,375 г и XNT массой 0,625 г растворяли в разных колбах дистиллированной водой по 135 и 25 мл соответственно. Раствор с XNT нагревали в течение 1 часа на магнитной мешалке при $t=70$ °C, 360 об./мин. Одновременно раствор с PVA нагревали в течение 3–4 часов на магнитной мешалке при $t=70$ °C, 360 об./мин.

Соотношение PVA и XNT и метод синтеза гидрогелей выбирались с учетом результатов, представленных в статье [4].

Полученные гидрогели PVA (2,5%) и XNT (2,5%) синтезировали друг с другом в разных соотношениях (PVA:XNT 1:0,75 / 1:0,5 / 1:0,25), чтобы получить следующие гидрогели различных концентраций: гидрогель PVA (2,5%) объемом 15 мл нагревали с гидрогелем XNT (2,5%) объемом 11,25 / 7,5 / 3,75 мл, соответственно, на магнитной мешалке при $t=70$ °C, 360 об./мин в течение 3 часов. За 15 мин. до конца синтеза добавляли в смесь 15 мл смеси суммарных пигментов в додеканоле. Далее полученный гидрогель разделяли на три равные части, распределив по трем чашкам Петри, и подвергали 1-му, 2-му и 3-му циклам замораживания-оттаивания соответственно.

После осуществления данных циклов замораживания-оттаивания все девять образцов гидрогелей были помещены в суховоздушный термостат Binder (Германия) при $t=40$ °C до полного высыхания.

Способность полученных гидрогелей PVA (2,5%):XNT (2,5%) различных соотношений к набуханию в водной среде

Были вырезаны образцы каждого из девяти видов готовых гидрогелей и была измерена их масса. Исследуемые образцы погружали в дистиллированную воду, измеряли массу через некоторые промежутки времени, тем самым проверяя, какое примерное количество жидкости способны набрать в себя данные гидрогели (свойство набухания) и какое выделить. Для обнаружения присутствия смеси пигментов в среде, выделяющейся из ги-

дрогелей, состоящей из додеканола и дистиллированной воды, были сняты спектры поглощения.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований было проведено изучение стабильности синтезированных гидрогелей при их погружении в органические растворители, используемые для экстракции пигментов. На основании литературных данных нами были выбраны следующие растворители: ацетон, гексан, метанол, этанол, этилацетат и додеканол. Исследуемые образцы гидрогеля (площадью $\approx 2 \text{ см}^2$) предварительно помещали в чашки Петри, куда далее добавляли растворитель. Результаты опыта представлены в таблице 1. Из данной таблицы видно, что 5 образцов гидрогелей, погруженных в ацетон, гексан, метанол, этанол и этилацетат, разрушались в течение 10 минут, тогда как для образца гидрогеля, погруженного в додеканол, не отмечено никаких визуальных деформаций на протяжении всего опыта. Следует отметить, что додеканол нетоксичен, часто используется в парфюмерии, что делает его пригодным для употребления в качестве экстрагента пигментов, применяющихся в биокосметике.

Таблица 1

Исследования стабильности синтезированного гидрогеля PVA (2,5%):XNT (2,5%) + хлорофилл (в додеканоле + $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M) 3 цикла в различных органических растворителях

| Растворитель, мл | Время до разрушения, мин | Результат |
|------------------|--------------------------|---|
| Этанол, 5 | 3 | Образец сжался и стал очень тонким и хрупким, после чего разрушился при радиальном вращении чашки Петри |
| Метанол, 5 | 2 | Образец сжался и стал очень тонким и хрупким, после чего разрушился при радиальном вращении чашки Петри |
| Гексан, 5 | 10 | Образец стал расслаиваться и разрушился до взвеси мелкого размера |
| Ацетон, 5 | 4 | Образец стал молочно-белого цвета, прилип к дну чашки Петри и легко разрушился при физическом воздействии |
| Этилацетат, 5 | 1 | Образец быстро разрушился и образовал коллоидную взвесь в среде |
| Додеканол, 5 | — | В течение всего опыта видимых разрушений образца не наблюдалось |

В нашей работе в качестве биокосметической субстанции использовали суммарные пигменты микроводоросли *S. vulgaris*, для экстракции которых служил додеканол. Спектр поглощения суммарных пигментов микроводоросли *S. vulgaris* в додеканоле представлен на рисунке 1.

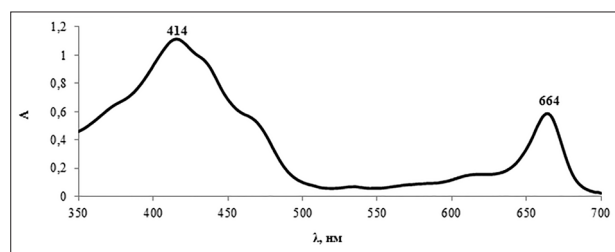


Рис. 1. Спектр поглощения суммарных пигментов *S. vulgaris* в додеканоле

Основываясь на спектральных данных, можно сказать, что в ЭСП преобладают хлорофиллы (в частности, хлорофилл *a*), на что указывает наличие максимумов поглощения при 414 и 664 нм. Хотя спектр поглощения ЭСП снимали в додеканоле, литературных сведений для которого нет, отмеченные максимумы поглощения соответствуют максимумам поглощения хлорофилла *a*, для которого, например, в метаноле характерно наличие двух максимумов при 417 и 665 нм соответственно [24].

Синтез гидрогелей из смеси поливинилового спирта (PVA) и ксантана (XNT) с исходной концентрацией 2,5% масс. проводили по методике, разработанной на основе публикаций [3, 10, 27] (рис. 2).

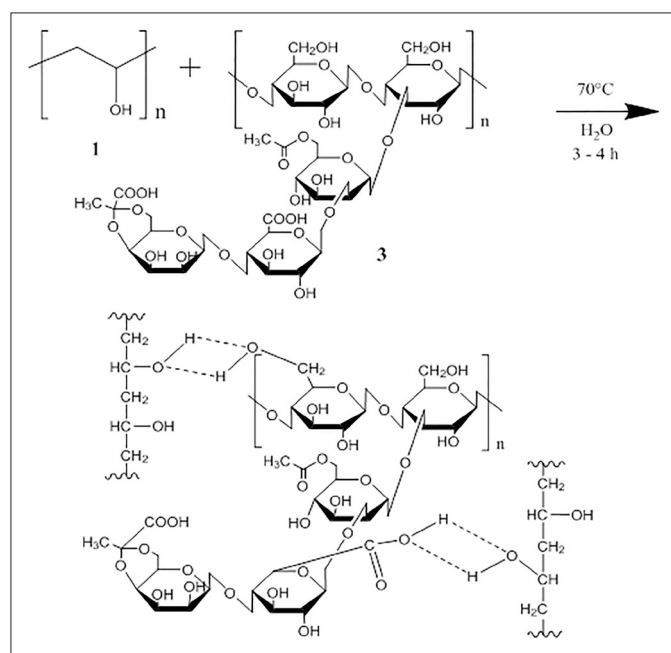


Рис. 2. Схема синтеза PVA-XNT гидрогеля

Чтобы создать более плотную и упорядоченную структуру, приготовленные гидрогели были подвергнуты 3 циклам замораживания-оттаивания. Это позволяет сохранять их форму на более длительное время в разных водных средах и содержать в себе лекарственный препарат для контролируемого выпуска на месте применения.

Изучены способности синтезированных гидрогелей из смеси и PVA (2,5%):XNT (2,5%) в различных соотношениях к набуханию в водной среде. Масса PVA (2,5%):XNT (2,5%) гидрогелей сначала увеличивалась, но впоследствии уменьшалась, потому что происходил обратный выход дистиллированной воды из матрицы гидрогеля (рис. 3 – А, Б, В).

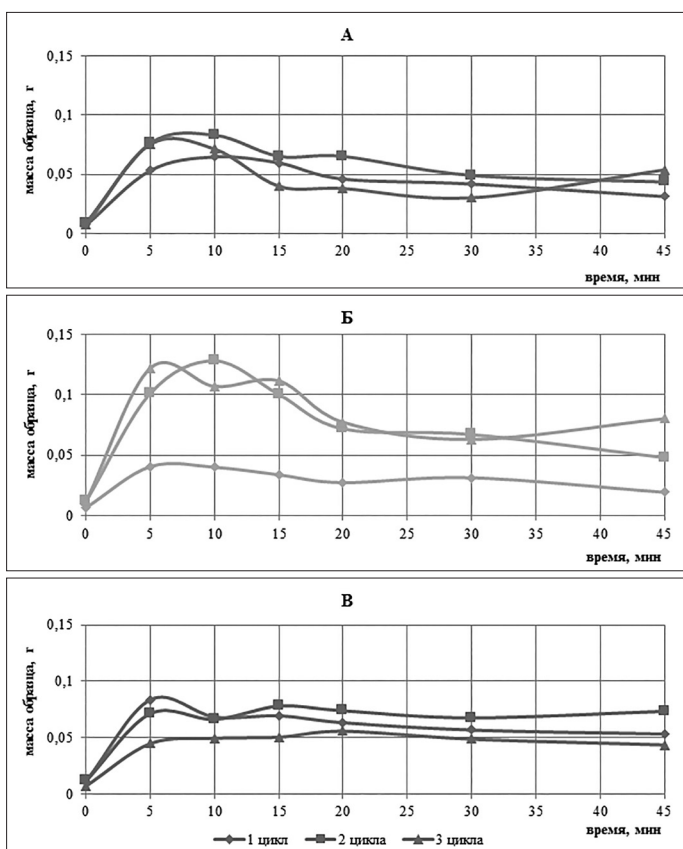


Рис. 3. Зависимость массы гидрогелей + ЭСП от времени нахождения в дистиллированной воде с разными циклами замораживания-оттаивания:

- А – PVA (2,5%):XNT (2,5%) 1:0,75;
- Б – PVA (2,5%):XNT (2,5%) 1:0,5;
- В – PVA (2,5%):XNT (2,5%) 1:0,25

Несмотря на различие количества циклов (от одного до трех) замораживания-оттаивания, все гидрогели PVA (2,5%):XNT (2,5%) + ЭСП при погружении в дистиллированную воду не разрушались, не слоились, слабо окрашивали ее в бледно-зеленый цвет, что может

быть следствием того, что ЭСП выделился из матрицы данных гидрогелей.

Подтверждением этого являются спектральные данные, полученные на спектрофотометре (табл. 2–4), снятые на 45- и 90-й минуте времени пребывания гидрогелей в дистиллированной воде. Из них видно, что спектр поглощения ЭСП наиболее ярко выражен на 90-й минуте присутствия гидрогелей (1:0,75 и 1:0,5) в воде, при одном диапазоне длин волн (λ_{max}). Это говорит о том, что на 90-й минуте измерения в окружающей дистиллированной воде содержится большая концентрация хлорофилла, чем на 45-й минуте.

Стоит отметить, что в синтезированных гидрогелях с низкой концентрацией ксантана PVA (2,5%):XNT (2,5%) = 1:0,25 выход ЭСП хуже, чем с более высокой концентрацией ксантана PVA (2,5%):XNT (2,5%) = 1:0,75 и 1:0,5, что подтверждается спектральными данными, приведенными в таблицах 2–4. В спектрах (см. табл. 4) практически отсутствуют характерные пики смеси хлорофиллов, а сам спектр нечеткий. Нечеткость спектра можно предположительно охарактеризовать тем, что при малых концентрациях ксантана структура гидрогелей очень плотная, не дает обратного выхода воды и ЭСП из матрицы гидрогеля, что не позволяет снять четкие спектры поглощения выделяющихся пигментов и определить максимумы поглощения.

Таблица 2
Спектры поглощения выделившегося ЭСП из гидрогелей PVA (2,5%):XNT (2,5%) = 1:0,75

| λ [нм], (А) | λ _{max} [нм], (А) | |
|-------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | 45 мин | 90 мин |
| 1 цикл | 435 (0,07); 663 (0,039) | 432 (0,169); 665 (0,106) |
| | 2 цикла | 436 (0,064); 662 (0,038) |
| 3 цикла | | 435 (0,035); - |

Таблица 3

Спектры поглощения выделившегося ЭСП с преобладанием смеси хлорофиллов из гидрогелей PVA (2,5%):XNT (2,5%) = 1:0,5

| | | |
|--|---|---|
| | λ_{\max} [нм], (А) | |
| | 45 мин 433 (0,117); 664 (0,079) | 90 мин 435 (0,116); 664 (0,073) |
| | λ_{\max} [нм], (А) | |
| | 45 мин 431 (0,068); 664 (0,039) | 90 мин 431 (0,096); 663 (0,063) |
| | λ_{\max} [нм], (А) | |
| | 45 мин - | 90 мин 433 (0,047); 662 (0,03) |

ладанием смеси хлорофиллов из биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* штамма GKV1. Были синтезированы гидрогели на основе поливинилового спирта и ксантана в различных соотношениях 1:0,75, 1:0,5 и 1:0,25 с добавлением ЭСП с преобладанием смеси хлорофиллов. Была изучена прочность структуры синтезированных гидрогелей, варьируя количество циклов замораживания-оттаивания.

Было установлено, что у синтезированных гидрогелей имеется способность к набуханию и резкому увеличению массы в водной среде, а затем уменьшению массы и выделению ЭСП (особенно у гидрогелей PVA (2,5%):XNT (2,5%) в соотношении 1:0,75 и 1:0,5), добавленных в них при синтезе, что дает возможность в дальнейшем использовать гидрогели в качестве материалов доставки биокосмецевтических средств, таких как, например, хлорофилл.

Таким образом, в результате проведенных исследований показана перспективность разработки гидрогелевых систем – носителей различных субстанций. Эти системы могут найти широкое применение в медицине и космецевтике.

Литература

1. Пучкова Т. Энциклопедия ингредиентов для косметики и парфюмерии. – М: Школа косметических химиков, 2015. – 408 с.
2. Хмельницкий С.И., Лесовой Д.Е. Перспективы использования суперпористых гидрогелей и их композиций на основе поливинилового спирта в новых медицинских технологиях // Газета «Новости медицины и фармации». – 2008. – № 3. – С. 234.
3. Alupej I.C., Popa M., Hamcerencu M., Abadie M.J.M. Superabsorbant hydrogels based on xanthan and poly(vinyl alcohol). 1. The study of the swelling properties // European Polymer Journal. – 2002. – Vol. 38. – P. 2313–2320.
4. Badranova G.U., Gotovtsev P.M., Zubavichus Y.V., Staroselskiy I.A., Vasiliev A.L., Trunkin I.N., Fedorov M.V. Biopolymer-based hydrogels for encapsulation of photocatalytic TiO₂ nanoparticles prepared by the freezing/thawing method // Journal of Molecular Liquids. – 2016. – Vol. 223. – P. 16–20.
5. Beack S., Kong W.H., Jung H.S., Do I.H., Han S., Kim H., Kim K.S., Yun S.H., Hahn S.K. Photodynamic therapy of melanoma skin cancer using carbon dot - chlorin e6 - hyaluronate conjugate // Acta Biomater. – 2015. – Vol. 26. – P. 295–305.
6. Bennett S.L., Melanson D.A., Torchiana D.F., Wiseman D.M., Sawhney A.S. Next-generation hydrogel films as tissue sealants and adhesion barriers // Journal of Cardiac Surgery. – 2003. – Vol. 18(6). – P. 494–499.

Таблица 4

Спектры поглощения выделившегося ЭСП из гидрогелей PVA (2,5%):XNT (2,5%) = 1:0,25

| | | |
|--|--|---|
| | λ_{\max} [нм], (А) | |
| | 45 мин 432 (0,06); 662 (0,035) | 90 мин 432 (0,107); 663 (0,066) |
| | λ_{\max} [нм], (А) | |
| | 45 мин 432 (0,035); - | 90 мин 430 (0,101); 663 (0,06) |
| | λ_{\max} [нм], (А) | |
| | 45 мин - | 90 мин 430 (0,034); - |

Заключение

В выполненной работе была произведена экстракция додеканолом суммарных пигментов (ЭСП) с преоб-

7. *Bueno V.B., Bentini R., Catalani L.H., Petri D.F.S.* Synthesis and swelling behavior of xanthan-based hydrogels // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – Vol. 92. – P. 1091–1099.
8. *Chen M., Schliep M., Willows R.D., Cai Z-L., Neilan B.A., Scheer H.* A red-shifted chlorophyll // *Science*. – 2010. – Vol. 329(5997). – P. 1318–1319.
9. *Distantina S., Rochmadi R., Fahrurrozi M., Wiratni W.* Synthesis of hydrogel film based on carrageenan extracted from *Kappaphycus alvarezii* // *Modern Applied Science*. – 2013. – Vol. 7(8). – P. 22–30.
10. *Giannouli P., Morris E.R.* Cryogelation of xanthan // *Food Hydrocolloids*. – 2003. – Vol. 17. – P. 495–501.
11. *Gorin K.V., Sergeeva Y.E., Butylin V.V., Komova A.V., Pojidaev V.M., Badranova G.U., Shapovalova A.A., Konova I.A., Gotovtsev P.M.* Methods coagulation/flocculation and flocculation with ballast agent for effective harvesting of microalgae // *Bioresource Technology*. – 2015. – Vol. 293. – P. 178–184.
12. *Goswami S., Naik S.* Natural gums and its pharmaceutical application // *Journal of Scientific and Innovative Research*. – 2014. – Vol. 3(1). – P. 112–121.
13. *Hassan C., Peppas N.A.* Cellular PVA hydrogels produced by freeze/thawing // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2000. – Vol. 76. – P. 2075–2079.
14. *Hassan C.M., Stewart J.E., Peppas N.A.* Diffusional characteristics of freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogels: applications to protein controlled release from multilaminate devices // *European J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2000. – Vol. 49. – P. 161–165.
15. *Hoare T.R., Kohane D.S.* Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges // *Polymer*. – 2008. – Vol. 49. – P. 1993–2007.
16. <http://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>.
17. *Jen A.C., Wake M.C., Mikos A.G.* Review: hydrogels for cell immobilization // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1996. – Vol. 50(4). – P. 357–364.
18. *Jeon Y.M., Lee H.S., Jeong D., Oh H.K., Ra K.H., Lee M.Y.* Antimicrobial photodynamic therapy using chlorin e6 with halogen light for acne bacteria-induced inflammation // *Life Science*. – 2015. – Vol. 124. – P. 56–63.
19. *Kim M., Jung H.Y., Park H.J.* Topical PDT in the treatment of benign skin diseases: principles and new applications // *Int. J. Mol. Sci*. – 2015. – Vol. 16. – P. 23259–23278.
20. *Kochneva E.V., Filonenko E.V., Vakulovskaya E.G., Scherbakova E.G., Seliverstov O.V., Markichev N.A., Reshetnikov A.V.* Photosensitizer radachlorin: skin cancer PDT phase II clinical trials // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2010. – Vol. 7. – Is. 4. – P. 258–267.
21. *Kupper H., Küpper F., Spiller M.* Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants // *Journal of Experimental Botany*. – 1996. – Vol. 47. – No. 295 – P. 259–266.
22. *Lanfer-Marquez U.M., Barros R.M.C., Sinnecker P.* Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives // *Food Research International*. – 2005. – Vol. 38(8–9). – P. 885–891.
23. *Lee K.Y., Mooney D.J.* Hydrogels for tissue engineering // *Chemical Reviews*. – 2001. – Vol. 101(7). – P. 1869–1880.
24. *Lichtenthaler H.K., Buschmann C.* Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy / In: *Wrolstad R.E., Acree T.E., An H., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F. and Sporns P.* (Eds.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry (CPFA)*. – John Wiley and Sons, New York, 2001. – F4.3.1–F4.3.8.
25. *Lichtenthaler H.K.* Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods in Enzymology*. – 1987. – Vol. 148(34). – P. 350–382.
26. *Li L., Ni R., Shao Y., Mao S.* Carrageenan and its applications in drug delivery // *Carbohydrate Polymers*. – 2014. – Vol. 103. – P. 1–11.
27. *Li Y., Maciel D., Rodrigues J., Shi X., Tomás H.* Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery // *Chemical Reviews*. – 2015. – Vol. 115(16). – P. 8564–8608.
28. *McCook J.P., Dorogi P.L., Vasily D.B., Cefalo D.R.* In vitro inhibition of hyaluronidase by sodium copper chlorophyllin complex and chlorophyllin analogs // *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. – 2015. – Vol. 8. – P. 443–448.
29. *Park J.H., Tai G.Z., Lee B.K., Park S.H., Jang J.Y., Lee J.S., ... Kim M.S.* Preparation and investigation of hydrolyzed polyacrylonitrile as a preliminary biomedical hydrogel // *Biomaterials Research*. – 2015. – Vol. 19. – P. 20. doi: 10.1186/s40824-015-0043-1.
30. *Ricciardia R., Gailleta C., Ducouret G., Lafumab F., Laurepre F.* Investigation of the relationships between the chain organization and rheological properties of atactic poly(vinyl alcohol) hydrogels // *Polymer*. – 2003. – Vol. 44. – P. 3375–3380.
31. *Ryu A.R., Lee M.Y.* Chlorin e6-mediated photodynamic therapy promotes collagen production and suppresses MMPs expression via modulating AP-1 signaling in P. acnes-stimulated HaCaT cells // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2017. – Vol. 20. – P. 71–77.
32. *Sheleg S.V., Zhavrid E.A., Khodina T.V., Kochubeev G.A., Istomin Y.P., Chalov V.N., Zhuravkin I.N.* Photodynamic therapy with chlorin e6 for skin metastases of melanoma // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. – 2004. – Vol. 20. – P. 21–26.
33. *Sigler M.L., Stephens T.J.* Assessment of the safety and efficacy of topical copper chlorophyllin in women with photodamaged facial skin // *Journal of Drugs in Dermatology*. – 2015. – Vol. 14(4). – P. 401–404.

34. Song B.H., Lee D.H., Kim B.C., Ku S.H., Park E.J., Kwon I.H., Kim K.H., Kim K.J. Photodynamic therapy using chlorophyll-a in the treatment of acne vulgaris: a randomized, single-blind, split-face study // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2014. – Vol. 71(4). – P. 764–771.
35. Stauffer S.R., Peppas N.A. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing // *J. Polymer*. – 1992. – Vol. 33. – P. 3932.
36. Tamura K., Ike O., Hitomi S., Isobe J., Shimizu Y., Nambu M. A new hydrogel and its medical application // *Trans-Am. Soc. Artif. Intern. Organs*. – 1986. – Vol. 32. – P. 605–608.
37. Tanaka T., Lu T., Yuasa S., Yamaura K. Structure and properties of PVA and K-carrageenan blends // *Journal of Polymer International*. – 2001. – Vol. 50(10). – P. 1103–1108.
38. Terao T., Maeda S., Saika A. High-resolution solid-state carbon-13 NMR of poly(vinyl alcohol): enhancement of tacticity splitting by intramolecular hydrogen bonds // *Macromolecules*. – 1983. – Vol. 16. – P. 1535–1538.
39. Van der Linden H.J., Herber S., Olthuis W. Stimulus-sensitive hydrogels and their applications in chemical (micro) analysis // *P. Analyst*. – 2003. – Vol. 128. – P. 325–331.
40. Wang Y.-Y., Ryu A.-R., Jin S., Jeon Y.-M., Lee M.-Y. Chlorin e6-mediated photodynamic therapy suppresses *P. acnes*-induced inflammatory response via NFκB and MAPKs signaling pathway // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12(1). – e0170599.
41. Yoon H.E., Oh S.H., Kim S.A., Yoon J.H., Ahn S.G. Pheophorbide a-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis via the activation of MAPKs in human skin cancer cells // *Oncol. Rep.* – 2014. – Vol. 31(1). – P. 137–144.

PREPARATION OF PVA-XANTHAN HYDROGELS AND ANALYSIS OF THEIR APPLICABILITY AS CARRIERS OF CHLOROPHYLL

N.P. BABICHENKO¹, A.Yu. SHATALOVA², P.M. GOTOVTSSEV², G.U. BADRANOVA²,
Ya.E. SERGEEVA², K.V. GORIN², R.G. VASILOV²

¹ D.I. Mendeleev Russian Chemical-Technological University,

² National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow

Polymeric hydrogels are widely used in medicine and in pharmacology as drug carrier matrices. In the present study, dodecanol extraction of the total pigments with the predominance of a mixture of chlorophylls from the biomass microalga of *Chlorella vulgaris* strain GKV1 was carried out. Hydrogels based on polyvinyl alcohol and xanthan were synthesized in various ratios of 1:0.75, 1:0.5 and 1:0.25, with the addition of an extract of total pigments (ETP) with a predominance of a mixture of chlorophylls. It was found that the synthesized hydrogels have the ability to swell and drastically increase the mass in the aqueous medium, and then – to reduce the mass and release of ETP and a mixture of chlorophylls: especially for hydrogels PVA (2.5%):XNT (2.5%) in ratio of 1:0.75 and 1:0.5, added to them in the synthesis. This allows further use of hydrogels as delivery materials for biocosmetic agents, such as chlorophyll.

Keywords: polymeric hydrogel, polyvinyl alcohol, xanthan, chlorophylls, matrix-carrier, swelling.

БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СИЛИКАГЕЛИ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ПРОЦЕССА БРОЖЕНИЯ

О.А. КАМАНИНА*, Д.Г. ЛАВРОВА, В.А. АРЛЯПОВ, О.Н. ПОНАМОРЕВА

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула

Синтезированы «живые» гибридные материалы путем иммобилизации дрожжей в органомодифицированные силикагели с использованием мягких методов золь-гель химии из тетраэтоксисилана и метилтриэтоксисилан в присутствии структуроуправляющего агента — полиэтиленгликоля (ПЭГ). В условиях основного катализа фторидом натрия при нейтральных значениях рН формируются фрактальные гели, что приводит к самопроизвольному образованию материалов со структурой «клетка в оболочке». Иммобилизованные в силикагели клетки метилотрофных дрожжей применили в качестве биораспознающего элемента при разработке микробного сенсора для определения содержания этанола в продуктах брожения.

Ключевые слова: золь-гель метод, силикагели, инкапсулированные живые клетки, метилотрофные дрожжи, биосенсор, ПЭГ.

Введение

В процессе эволюции природных систем живые организмы развивают различные минерализованные структуры. Примерами таких структур являются силикатные оболочки диатомовых водорослей. Важнейшая функция подобных систем — защита организмов и генетического материала своего вида от неблагоприятных условий. Это послужило примером для получения искусственных живых гибридных материалов путем включения клеток в силикагели [6, 7, 9, 16]. Преимущество неорганических полимерных материалов, таких как силикагели, заключается в их механической прочности, стабильности, инертности и благоприятном для большинства микроорганизмов химическом окружении; однако их применение существенно ограничено из-за низкой скорости пассивной диффузии питательных и газообразных субстратов через эти материалы. Особый интерес представляет иммобилизация биоматериала в гибридные кремнийорганические матрицы, которые имеют ряд преимуществ перед органическими и неорганическими полимерами: сохраняя все свойства, присущие силикагелям, формируется менее жесткая

структура матрицы, которая обеспечивает эффективную защиту биоматериала от внешних факторов, высокую скорость прохождения диффузионных потоков и благоприятное окружение для живых клеток [19].

Для получения органосиликатных материалов можно применять мягкие методы золь-гель химии, которые широко используются в технологии получения силикагелей, не требуют энергоемкого, дорогого оборудования, являются экономичными и экологически чистыми [5, 4]. В подавляющем большинстве случаев золь-гель технологии используют для иммобилизации ферментов [8, 18, 19]. Применение матриц на основе органомодифицированных силикагелей для иммобилизации живых клеток представляет собой относительно новое направление исследований в прикладной биотехнологии и является перспективным для разработки эффективных биокатализаторов на основе микроорганизмов [3, 21], в том числе при создании биосенсоров [10, 11, 12].

В нашем научном коллективе разработаны новые подходы для иммобилизации дрожжевых клеток в органомодифицированные силикагели с применением методов золь-гель химии, дающие возможность получать структуры «клетка в оболочке» [13, 14, 15, 17]. Выявлено, что использование силановых прекурсоров тетраэтоксисилана (ТЭОС)/ метилтриэтоксисилана (МТЭС) в соотношении 15/85 об. % приводит к эффективному образованию капсулы вокруг дрожжевых клеток в условиях основного катализа [13, 15]. Нам впервые удалось визуализировать с использованием световой микроскопии этапы формирования золь-гель капсулы вокруг клеток дрожжей [17].

© 2017 г. Каманина О.А., Лаврова Д.Г., Арляпов В.А., Понаморев О.Н.

* Автор для переписки:

Каманина Ольга Александровна

к.х.н., ассистент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»

E-mail: o.a.kamanina@gmail.com

Образующаяся матрица эффективно защищает клетки дрожжей от вредных факторов окружающей среды [14]. Разработанный гетерогенный биокатализатор на основе инкапсулированных метилотрофных дрожжей применили при разработке биосенсора для анализа метанола [17] и биофильтра для очистки метанолсодержащих стоков [14].

В настоящей статье представлены результаты разработки биосенсора на основе инкапсулированных в органодефицированные силикагели дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 для мониторинга процесса брожения, которые являются продолжением предыдущих исследований и расширяют возможности применения гибридных материалов со структурой «клетка в оболочке».

Материалы и методы

Штамм микроорганизмов

В работе использовали метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 (далее — *Og. polymorpha*) (Всероссийская коллекция микроорганизмов ИБФМ РАН). Культивирование метилотрофных дрожжей проводили по методике, описанной в статье [20].

Иммобилизация дрожжей в органодефицированные силикагели

К 0,1 см³ 20%-ного раствора полиэтиленгликоля 3000 Да (Ferak Berlin) в фосфатном буферном растворе прибавляли 0,25 см³ суспензии дрожжевых клеток ($1,3 \pm 0,1 \times 10^9$ КОЕ/см³) в фосфатном буферном растворе (20 ммоль/дм³, рН 7,6) и перемешивали в течение 3 минут (Elmi CM-70M07), добавляли 0,5 см³ смеси тетраэтоксисилана (ТЭОС) (Sigma) и метилтриэтоксисилана (МТЭС) (Sigma) и вновь перемешивали в течение 3 минут. Затем добавляли 0,025 см³ 0,2 моль/дм³ раствора катализатора NaF, перемешивали 15 минут, отбирали 0,005 см³, наносили на пористый стекловолоконный фильтр (Whatman GF/A, Sigma) и подсушивали 15 минут.

Биосенсорные измерения

Фрагмент стекловолоконного фильтра с иммобилизованными клетками (3×3 мм) помещали на поверхность кислородного электрода Кларка и фиксировали с помощью нейлоновой сетки. Полученный рецепторный элемент перед использованием промывали натрий-калиевым фосфатным буферным раствором (рН=7,6) в течение 5 мин.

В качестве преобразователя использовали многофункциональный анализатор рН-метр-иономер-БПК-термооксиметр Эксперт-001 («Эконикс-эксперт»,

Россия) в режиме «термооксиметр», что позволило проводить непрерывную регистрацию сигнала. Управление прибором осуществлялось с помощью встроенной программы «EXR2PR». Перед непосредственным измерением проводили промывку системы натрий-калиевым фосфатным буферным раствором (20 ммоль/дм³, рН 7,6). Измеряемым параметром являлась максимальная скорость изменения концентрации растворенного кислорода при добавлении субстратов.

Сканирующая электронная микроскопия

Образцы для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) покрывали платиново-углеродной смесью в вакуумно-напылительной установке JEE-4X («JEOL», Япония). Электронно-микроскопический анализ образцов проводили на приборе JSM-6510 LV («JEOL», Япония).

Хроматографические измерения

Определение содержания этилового спирта в образцах проводили газохроматографическим методом на хроматографе «Кристал-5000.2» (Хроматэк, Россия) с использованием пламенно-ионизационного детектора и капиллярной колонки DB-FFAP (50 м×0,32 мм×0,50 мкм) (Agilent, США). Условия анализа: температура термостата колонки — 70 °С, температура испарителя — 200 °С, температура детектора — 250 °С, скорость потока газа-носителя (гелия) — 0,10 дм³/час.

Моделирование процесса брожения

Образец пшеничной муки суспендировали в теплой дистиллированной воде и нагревали до 90 °С. В полученную массу добавляли ферментный препарат Termamyl («Novozymes A/S», Дания) и термостатировали 2 часа при перемешивании. После этого отбирали первую пробу, реакционную массу охлаждали до 60 °С и добавляли ферментный препарат SAN Super 360L («Novozymes A/S», Дания), помещали в термостат и перемешивали 2 часа. Затем охлаждали колбу до 30 °С, добавляли дрожжевой препарат SuperStart (Россия) и термостатировали 120 часов для брожения.

Результаты и обсуждение

В условиях основного катализа фторидом натрия в системе силановые прекурсоры ТЭОС/МТЭС в соотношении 15/85 об.% с ПЭГ 3000 формируется фрактальная структура геля, представляющая собой связанные в единую сеть частицы золя размером 2–5 мкм (рис. 1а). При участии клеток дрожжей в этом процессе происходит изменение структуры геля так, что на поверхности клеток формируется капсула из сферических

частиц силикагеля (рис. 1б). Спустя 1 час после начала реакции у поверхности клеток появляются сферические частицы диаметром около 0,3 мкм, через 5 часов все клетки дрожжей упакованы в капсулы. Было показано, что сформировавшаяся органосиликатная матрица сохраняет свою структуру во времени [17].

Для получения плоских биочувствительных поверхностей в качестве каркаса использовали стекловолоконный фильтр (рис. 1в), на который помещали силикагель с иммобилизованными микроорганизмами; при этом происходило заполнение пор стекловолоконного фильтра золь-гель материалом (рис. 1г).

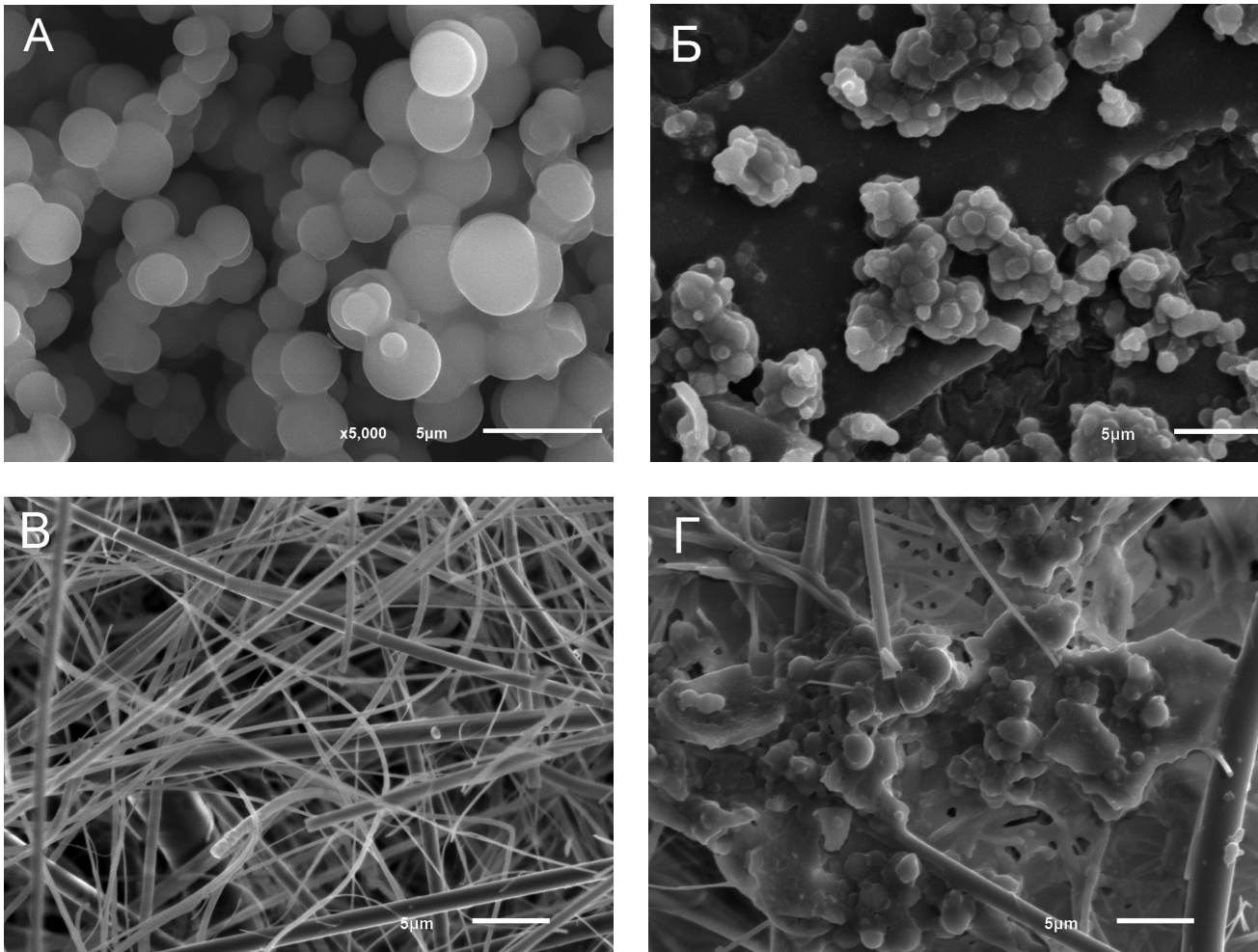


Рис. 1. Иллюстрации СЭМ к тексту: а — изображение золь-гель матрицы, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии; б — изображение золь-гель матрицы с инкапсулированными дрожжами *Ogataea polymorpha*; в — микрофотография стекловолоконного фильтра Whatman GF/A; г — микрофотография стекловолоконного фильтра Whatman GF/A с иммобилизованными в золь-гель матрицы метилотрофными дрожжами

Плоские элементы на основе стекловолоконного фильтра использовали для модификации поверхности кислородного электрода, что позволило обеспечить сопряжение биохимических реакций иммобилизованных дрожжей с кислородным электродом. Такая система представляет собой биосенсор, основанный на дыхательной активности микроорганизмов.

Дрожжи *Og. polymorpha* ВКМ Y-2559, индуцированные в процессе роста метанолом, практически не проявляют окислительной активности по отношению к углеводам и обладают высокой селективностью по отношению к этанолу и метанолу. Поэтому на их основе

разрабатывают биосенсоры по определению спиртов, в том числе для биотехнологического мониторинга [17, 22].

Спиртовое брожение упрощенно можно свести к следующей схеме: крахмалсодержащее сырье расщепляется до низкомолекулярных углеводов, служащих субстратом для микроорганизмов, которые, метаболизируя субстрат, выделяют этанол [1]. Для определения содержания этанола применяется газовая хроматография, являющаяся дорогостоящим методом, обслуживание которого требует высококвалифицированного персонала. Изменить сложившуюся ситуацию может анализ с применением биосенсоров, в котором доступность фи-

зико-химического преобразователя сигнала сочетается с селективностью иммобилизованного биологического компонента [2]. Вот почему разработанный биосенсор на основе инкапсулированных в органомодифицированные силикагели дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 применили для мониторинга процесса брожения.

Биосенсор охарактеризовали по отношению к этанолу (табл. 1). Для выявления влияния метода иммобили-

зации микроорганизмов на результаты биосенсорного анализа сравнили характеристики двух биосенсоров на основе дрожжей *Og. polymorpha* ВКМ У-2559, иммобилизованных разными способами: путем включения в органосиликатную золь-гель матрицу и включения микроорганизмов в слой ДЭАЭ-декстрана, ковалентно связанного с нитроцеллюлозной мембраной бензохиноном [22] (см. табл. 1).

Таблица 1

Параметры чувствительности и стабильности биосенсоров на основе дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559

| Метод иммобилизации | C_n , мкмоль/дм ³ | Коэффициент чувствительности | Долговременная стабильность, сутки |
|--|--------------------------------|--|------------------------------------|
| Инкапсулирование в золь-гель матрицу | 5 | $0,90 \pm 0,05$ мг O ₂ /ммоль·мин | 16 |
| Включение в слой ДЭАЭ-декстрана, ковалентно связанного с нитроцеллюлозной мембраной бензохиноном | 200 | $0,319 \text{ нА} \cdot \text{дм}^3 / \text{с} \cdot \text{ммоль}$ | 8 |

Таблица 2

Содержание этанола в образцах брожения при получении этилового спирта

| Время брожения, ч | Концентрации этанола, моль/дм ³ | |
|-------------------|--|-------------------|
| | С помощью биосенсора | ГХ |
| 2 | $0,02 \pm 0,01$ | $0,020 \pm 0,003$ |
| 24 | $0,05 \pm 0,01$ | $0,043 \pm 0,001$ |
| 48 | $0,17 \pm 0,01$ | $0,168 \pm 0,001$ |
| 72 | $0,21 \pm 0,02$ | $0,205 \pm 0,003$ |

Как видно из таблицы 1, биосенсор на основе инкапсулированных в золь-гель матрицу дрожжей характеризуется более стабильной и эффективной работой и может быть употреблен для мониторинга содержания этанола в биотехнологических процессах.

В качестве референтного метода определения содержания этанола использовали метод газовой хроматографии (ГХ) (табл.2).

Статистический анализ результатов определения этанола показал, что концентрации этанола, определяемые с помощью биосенсора на основе инкапсулированных метилотрофных дрожжей и методом ГХ, не отличаются

между собой. Биосенсор на основе метилотрофных дрожжей, инкапсулированных в кремнийорганическую матрицу, является перспективным инструментом для мониторинга спирта в биотехнологических производствах.

Заключение

Результаты, полученные в работе, убедительно доказывают возможность применения золь-гель технологии для инкапсулирования метилотрофных дрожжей в кремнийорганические матрицы, что расширяет диапазон методов иммобилизации микроорганизмов.

Показано, что иммобилизованные в силикагели клетки метилотрофных дрожжей возможно применять в качестве биораспознающего элемента при разработке микробного сенсора для мониторинга этанола в ходе брожения.

Исследование имеет практическое значение для применения гибридных кремнийорганических биоматериалов в биотехнологии, в том числе при разработке цельноклеточных биосенсоров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-38-00700 мол_а и при поддержке гранта РФФИ и Правительства Тульской области № 16-48-710959 р_а.

Литература

1. Ковалевский К.А. Технология бродильных производств. — Киев: ИНКОС, 2004. — 340 с.
2. Понаморева О.Н., Решетилов А.Н., Алферов В.А. Биосенсоры. Принципы функционирования и практическое применение. — Тула: Издательство Тульского государственного университета, 2007. — 255 с.
3. Ansari S.A., Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review // *Biotechnol Adv.* — 2012. — Vol. 30(3). — P. 512–523.
4. Arya S.K., Saha S., Ramirez-Vick J.E., Gupta V., Bhansali S., Singh S.P. Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications: Review // *Anal. Chim. Acta.* — 2012. — Vol. 737. — P. 1–21.
5. Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J. Recent bio-applications of sol-gel materials // *J. Mater. Chem.* — 2006. — Vol. 16. — P. 1013–1030.
6. Blondeau M., Coradin T. Living materials from sol-gel chemistry: current challenges and perspectives // *J. Mater. Chem.* — 2012. — Vol. 22. — P. 22335–22343.
7. Depagne C., Roux C., Coradin T. How to design cell-based biosensors using the sol-gel process // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2011. — Vol. 400. — P. 965–976.
8. Desimone M.F., Alvarez G.S., Foglia M.L., Diaz L.E. Development of sol-gel hybrid materials for whole cell immobilization // *Recent Pat. Biotechnol.* — 2009. — Vol. 3(1). — P. 55–60.
9. Dickson D., Ely R. Silica sol-gel encapsulation of cyanobacteria: lessons for academic and applied research // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — Vol. 97. — P. 1809–1819.
10. Gavlasova P., Kuncova G., Kochankova L., Mackova M. Whole cell biosensor for polychlorinated biphenyl analysis based on optical detection // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* — 2008. — Vol. 62(3). — P. 304–312.
11. Inama L., Diré S., Carturan G., Cavazza A. Entrapment of viable microorganisms by SiO₂ sol-gel layers on glass surfaces: trapping, catalytic performance and immobilization durability of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biotechnol.* — 1993. — Vol. 30(2). — P. 197–200.
12. Jia J., Tang M., Chen X., Qi L., Dong S. Co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on sol-gel derived composite material // *Biosens. Bioelectron.* — 2003. — 18(8). — P. 1023–1029.
13. Kamanina O.A., Fedoseeva D.G., Rogova T.V., Ponomareva O.N., Blokhin I.V., Machulin A.V., et al. Synthesis of organosilicon sol-gel matrices and preparation of heterogeneous biocatalysts based on them // *Russ. J. Appl. Chem.* — 2014. — Vol. 87(6). — P. 761–766.
14. Kamanina O.A., Lavrova D.G., Arlyapov V.A., Alferov V.A., Ponomareva O.N. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater // *Enzyme Microb. Technol.* — 2016. — Vol. 92. — P. 94–98.
15. Lavrova D.G., Kamanina O.A., Machulin A.V., Suzina N.E., Alferov V.A., Ponomareva O.N. Effect of polyethylene glycol additives on structure, stability, and biocatalytic activity of ormosil sol-gel encapsulated yeast cells // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* — 2017. doi: 10.1007/s10971-017-4333-z.
16. Meunier C.F., Dandoy P., Su B.L. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials // *J. Colloid Interface Sci.* — 2010. — Vol. 342. — P. 211–224.
17. Ponomareva O.N., Kamanina O.A., Alferov V.A., Machulin A.V., Rogova T.V., Arlyapov V.A., et al. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol-gels for the design of biosensors // *Biosens. Bioelectron.* — 2015. — Vol. 67. — P. 321–326.
18. Preda G., Bizerea O., Vlad-Oros B. Sol-gel technology in enzymatic electrochemical biosensors for clinical analysis / In: P.A. Serra (Ed.). *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity.* — InTech, Rijeka, Croatia, 2011. — P. 363–388.
19. Sakai-Kato K., Ishikura K. Integration of biomolecules into analytical systems by means of silica sol-gel technology // *Natl. Inst. Heal. Sci.* — 2005. — Vol. 6 — P. 70–75.
20. Suh S.-O., Zhou J.J. Methylotrophic yeasts near *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. // *FEMS Yeast Res.* — 2010. — Vol. 10(5). — P. 631–638.
21. Yang S., Jia W.Z., Qian Q.Y., Zhou Y.G., Xia X.H. Simple approach for efficient encapsulation of enzyme in silica matrix with retained bioactivity // *Anal. Chem.* — 2009. — Vol. 81(9). — P. 3478–3484.
22. Zaitsev M.G., Arlyapov V.A., Alferov V.A., Reshetilov A.N. Receptor elements for biosensors in two ways of methylotrophic yeast immobilization // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2012. — Vol. 48(5). — P. 519–524.

BIOSENSOR BASED ON METHYLOTROPHIC YEAST IMMOBILIZED IN MODIFIED SILICA GEL TO MONITOR THE FERMENTATION PROCESS

O.A. KAMANINA, D.G. LAVROVA, V.A. ARLYAPOV, O.N. PONAMOREVA

Tula State University, Tula

«Live» hybrid materials were synthesized by immobilizing yeast in organic-modified silica gel of tetraethoxysilane and methyltriethoxysilane in the presence of a polyethylene glycol (PEG) structuring agent using soft sol-gel chemistry methods. Under the conditions of the basic catalysis of sodium fluoride, fractal gels are formed at neutral pH values, which leads to the spontaneous formation of materials with the «cell-in-shell» structure. Methylophilic yeast cells immobilized in silica gel were used as a bio-recognition element in the development of a microbial sensor to determine the ethanol content of fermentation products.

Keywords: sol-gel method, silica gels, encapsulated living cells, methylophilic yeast, biosensor, PEG.

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И БЕЛКОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ГИППОКАМПЕ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

С.А. КРЫНСКИЙ¹, М.И. СОРОКИН¹, И.К. МАЛАШЕНКОВА¹,
Р.Г. ВАСИЛОВ¹, А.А. СЕЛИЩЕВА^{1,2*}

¹ *Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»*,

² *МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва*

Представлены результаты анализа экспрессии ключевых генов естественного иммунитета и воспаления, а также окислительного стресса в гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера при разных стадиях заболевания, проведенного по материалам базы данных открытого доступа GEO (GSE48350). Были установлены изменения экспрессии ряда генов, которые свидетельствуют об активации клеток микроглии и механизмов врожденного иммунного ответа, а также о снижении антиоксидантной защиты. Наиболее выраженные изменения экспрессии изучаемых генов отмечались при умеренной стадии болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, транскриптом, гиппокамп, окислительный стресс, микроглия, цитокины, толл-подобные рецепторы, рецепторы-«мусорщики».

Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) в настоящее время является наиболее частой причиной деменции у людей старше 65 лет. Выделяют две формы БА: с ранним (до 65 лет) и поздним (после 65 лет) началом, причем поздняя форма преобладает по частоте (более 90% случаев). Развитие БА с ранним началом обусловлено мутациями генов белка-предшественника амилоида (APP), пресенилина-1 или пресенилина-2 (Zou et al., 2014) [40]. Форма с поздним началом имеет многофакторную этиологию, патогенез ее доклинических и ранних этапов до сих пор в точности не известен. При создании моделей БА обычно используют животных с мутациями в генах предшественника амилоида APP, пресенилина-1 или -2, моделируя таким образом менее распространенную форму болезни. Морфологическими признаками деменции альцгеймеровского типа являются отложения в паренхиме и сосудах головного мозга токсичных для нейронов и клеток глии олигомеров бета-амилоида (A β) в виде бляшек и формирование нейрофибриллярных сплетений в нейронах. Амилоидные бляшки образуются в результате конформационных из-

менений A β , а нейрофибриллярные сплетения возникают вследствие гиперфосфорилирования тау-белка, одного из структурных компонентов микротрубочек. В настоящее время A β и тау-белок рассматриваются как основные факторы повреждения нейронов при болезни Альцгеймера (Butterfield, 1997 [10]; Mao, 2012 [20]). Согласно наиболее распространенной гипотезе амилоидного каскада, у предрасположенных лиц в результате конформационных изменений A β происходит образование его токсичных олигомеров. Кроме того, с метаболизмом A β связано образование активных форм кислорода (АФК), оказывающих повреждающее действие на клетки мозга (Huang et al., 1999 [16]; Степаничев и соавт., 2002 [3]; Smith et al., 1995 [30], 2002 [29]; Ещенко, 2004 [1]; Belkacemi, Ramassamy, 2012 [8]; Varage, Sonawane, 2015 [7]).

В последние годы интенсивно изучается роль нейровоспаления в патогенезе болезни Альцгеймера. Показано, что воспалительные механизмы участвуют в формировании амилоидных бляшек и усиливают повреждение нейронов олигомерами A β (Doens, Fernández, 2014) [15]. Основное значение в поддержании нейровоспаления принадлежит клеткам микроглии. На экспериментальных моделях болезни, в постмортальном мозге и в спинномозговой жидкости больных БА были выявлены признаки изменения активности микроглии: увеличение продукции провоспалительных цитокинов (ЦК) и снижение продукции трофических факторов. Предполагается, что в патогенезе БА участвуют ней-

2017 г. Крынский С.А., Сорокин М.И., Малашенкова И.К., Василев Р.Г., Селищева А.А.

* **Автор для переписки:**

Селищева Алла Анатольевна
инженер-исследователь, НИЦ «Курчатовский институт»
E-mail: aselo@yandex.ru.

ротропные вирусы, в частности, вирус простого герпеса (HSV1). Показано *in vitro*, что HSV1 увеличивает фосфорилирование внутриклеточного тау и увеличивает уровень $A\beta$ в нейронах (Conrady et al., 2010) [13]. В ходе развития БА воспалительный ответ клеток микроглии на инфекцию HSV1 может способствовать повреждению нейронов (Wes et al., 2016) [38].

Один из методов оценки функций микроглии — определение уровня РНК, преимущественно экспрессируемых этими клетками (Srinivasan et al., 2016) [31]. К настоящему времени описан характер экспрессии микроглией мРНК цитокинов и других белков воспаления в различных областях головного мозга (фронтальная кора, орбитофронтальная кора, энторинальная кора) при БА в зависимости от стадии заболевания (López González et al., 2016) [18]. Гиппокамп — область мозга, наиболее рано страдающая при болезни Альцгеймера (Miller et al., 2013) [22]. По данным литературы, не в полной мере описана экспрессия генов иммунного ответа и практически не охарактеризован генетический профиль микроглии в гиппокампе человека при разных стадиях БА. Также отсутствуют данные об особенностях экспрессии белков антиоксидантной защиты в гиппокампе при БА.

Целью работы была оценка экспрессии мРНК, ассоциируемых с воспалительным ответом и окислительным стрессом, в гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера в зависимости от стадии заболевания.

Материалы и методы

Был проведен анализ экспрессии генов иммунного статуса, воспаления и окислительного стресса, а также анализ активации молекулярных (сигнальных и метаболических) путей в гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера (основная группа) и у лиц без когнитивных расстройств, сопоставимых с основной группой по полу и возрасту. Данные по экспрессии генов и клиническая характеристика пациентов (табл. 1) получены из базы данных GEO (GSE48350). Критерием исключения был возраст менее 65 лет.

С учетом предполагаемой роли иммунных механизмов в патогенезе БА была изучена экспрессия 250 генов, кодирующих белки следующих функциональных групп: рецепторы образцов патогенности; цитокины и их рецепторы; поверхностные маркеры микроглии; транскрипционные факторы сигнальных путей воспалительного ответа; белки окислительного стресса (белки теплового шока, индуктор гипоксии, ферменты образования активных форм кислорода и антиоксидантные белки).

Процессинг и статистическая обработка результатов проводились с помощью программного обеспечения R (библиотека GEOquery). Достоверность полученных различий оценивалась с помощью непараметрических критериев Уилкоксона — Манна — Уитни и Краскела — Уоллиса. Множественные сравнения учитывались введением поправки по методу Беньямини — Хохберга. Для генов, экспрессия которых различалась в исследованных группах, рассчитывали соотношение экспрессии в основной и контрольной группах (коэффициент экспрессии). Для оценки активации сигнальных и метаболических путей в образцах использовали программное обеспечение OncoFinder (Buzdin et al., 2014) [11]. Данный метод позволяет количественно и качественно оценить уровень активации молекулярных путей, которые являются более стабильными биомаркерами, чем экспрессия индивидуальных генов (Borisov et al., 2014) [9]. Данный метод показал свою эффективность при поиске биомаркеров онкологических заболеваний (Lezhnina et al. 2014 [17]; Shepelin et al. 2016 [28]), при поиске биомаркеров, ассоциированных с клиническим исходом противораковой терапии (Artemov et al. 2015 [5]; Venkova et al. 2015 [37]), а также биомаркеров ряда других заболеваний (Alexandrova et al. 2016 [4]; Makarev et al. 2016 [19]).

Таблица 1

Характеристика пациентов, включенных в исследование

| Группы/ Характеристика | Тяжелая БА | Умеренная БА | Легкая БА | Контрольная группа |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Количество человек | 4 | 7 | 3 | 24 |
| Возраст, лет | 79 (76–86) | 87 (74–94) | 87 (76–94) | 83 (69–98) |
| Пол | 1 муж., 3 жен. | 3 муж., 4 жен. | 2 муж., 1 жен. | 13 муж., 11 жен. |
| Стадия болезни Альцгеймера по BRAAK | V–VI | IV–VI | III–IV | |
| MMSE | 0–9 | 11–19 | 22–27 | 28–30 |

Результаты

При анализе экспрессии изучаемых генов были выявлены различия в зависимости от стадии БА: при легкой стадии болезни достоверно изменялась экспрессия 2 генов, при умеренной БА была изменена экспрессия 139 генов, а при тяжелой стадии — 29 генов. При легкой

стадии БА наиболее выраженным изменением было более чем трехкратное увеличение экспрессии CD36, рецептора-мусорщика, обнаруживаемого на клетках макрофагального происхождения, $p < 0,01$ (Martin et al., 2016) [21]. По данным одной из работ, CD36 участвует в фагоцитозе макрофагами тромбоцитарных остатков в периваскулярных амилоидных бляшках, а также в переносе жирных кислот через клеточную мембрану. Показано, что в присутствии фибрилл $A\beta$ усиливается активация макрофагов, поддерживающая воспалительный процесс в бляшках (Tedgui, Mallat, 2002) [35]. Также при БА легкой стадии отмечалось повышение экспрессии NLRP7 ($p=0,007$), белка семейства NOD-like рецепторов, которые обеспечивают иммунный ответ на внутриклеточные патогены.

Соотношение уровней транскрипции мРНК, достоверно различавшихся между БА умеренной стадии и контрольной группой, приведено на рисунке 1 и в таблице 2.

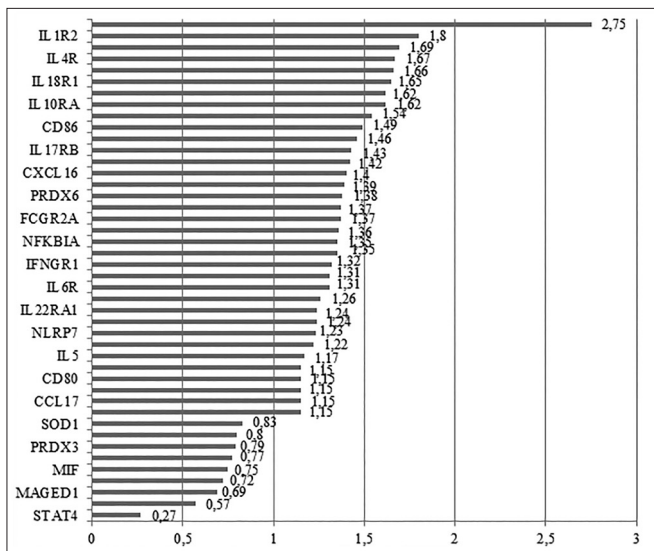


Рис. 1. Различия экспрессии генов иммунного ответа и антиоксидантной защиты в гиппокампе у пациентов с болезнью Альцгеймера умеренной стадии и в контрольной группе (показана экспрессия генов, для которых коэффициент экспрессии был меньше 0,85 или больше 1,15)

При умеренной БА обнаруженные изменения в основном касались нескольких функциональных групп генов. Так, была повышена экспрессия маркеров активации микроглии: AGER, C13A, CD40, CD80, CD86, MSR1, CD163 (рис. 2). Часть из этих маркеров являются рецепторами-мусорщиками (AGER, MSR1, CD163), другие участвуют в презентации антигена Т-клеткам, инициируя адаптивный иммунный ответ

(C13A, CD40, CD80, CD86). Следует отметить, что экспрессия CD163 была увеличена наиболее значительно из всех исследованных генов, коэффициент экспрессии составил 2,75. По данным Rey et al. [25], экспрессия микроглией этого поверхностного маркера, представляющего собой рецептор-мусорщик, который обладает иммунорегуляторными функциями, повышена при БА, в отличие от болезни Паркинсона.

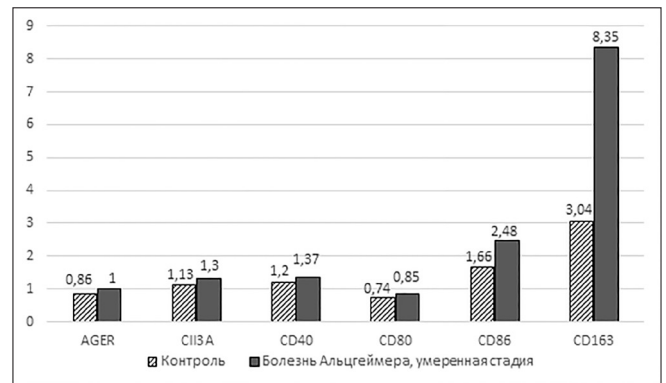


Рис. 2. Экспрессия маркеров активации микроглии при болезни Альцгеймера и в контрольной группе

Также при умеренной БА отмечалось повышение экспрессии ряда цитокинов и их рецепторов по сравнению с контрольной группой. Однако существенное (коэффициент экспрессии больше 1,2) и вместе с тем достоверное повышение экспрессии ЦК вместе с соответствующим рецепторным белком наблюдалось только для IL17D (1,37) и рецептора этого цитокина IL17RB (1,43), а также IL18 (1,66) и его рецептора IL18R1 (1,65) (рис. 3).

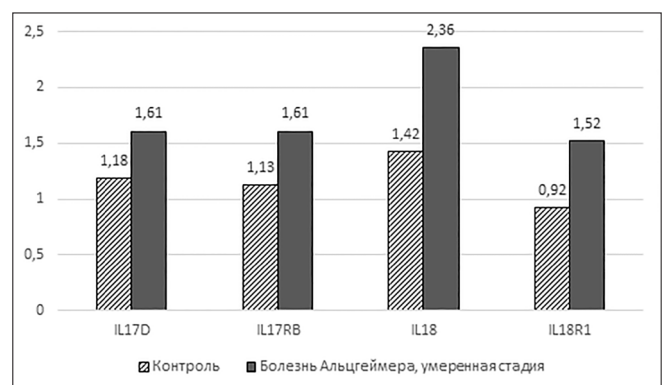


Рис. 3. Экспрессия цитокинов (IL-17D, IL-18) и их рецепторов при болезни Альцгеймера и в контрольной группе

IL-17D — экспрессируемый Т-клетками провоспалительный ЦК семейства IL-17. К данному семейству относятся 6 белков (IL-17A-F), схожих по структуре и функциям, которые необходимы для дифференцировки и

функциональной активности одного из подтипов CD4+ Т-клеток, Th17-клеток. Th17-клетки обеспечивают воспалительный ответ на внеклеточные патогены, участвуют в патогенезе псориаза, в ремоделировании бронхов при хронических воспалительных заболеваниях нижних дыхательных путей. Моделирование болезни Альцгеймера интрацеребральным введением A β крысам вызывает инфильтрацию Th17-клеток в паренхиме коры головного мозга (Zhang et al., 2013) [39]. IL-17D экспрессируется во многих тканях человека, включая кору головного мозга. К его эффектам относится увеличение синтеза провоспалительных факторов IL-6, IL-8 и GM-CSF эндотелиальными клетками. В то же время этот ЦК не влияет на пролиферацию мононуклеарных клеток крови (Starnes et al., 2002) [32]. По данным одной из работ, сывороточный уровень IL-17 повышен при болезни Альцгеймера (Chen et al., 2014) [12].

IL-18 — провоспалительный ЦК суперсемейства IL-1, синтезируемый в основном клетками моноцитарно-макрофагальной системы. Основная мишень действия IL-18 — Т-клетки, в которых он вызывает экспрессию ЦК IFN γ , что ведет к активации механизмов адаптивного иммунного ответа и стимулирует антигенпрезентирующие функции макрофагов. IL-18, возможно, принимает участие в патогенезе болезни Альцгеймера: показано, что в клеточной культуре он стимулирует синтез A β нейронами, и отмечается повышение уровня этого ЦК в головном мозге при болезни Альцгеймера; причем наиболее высокий уровень наблюдается в амилоидных бляшках (Ojala et al., 2009 [24]; Sutinen et al., 2012 [34]). Это может быть связано с местной воспалительной активацией микроглии, так как IL-18 является одним из характерных ЦК микроглии (Miyoshi et al., 2008) [23].

В некоторых парах цитокин-рецептор экспрессия рецепторов была повышена, а экспрессия соответствующих ЦК достоверно не изменялась, например, для IL1R1, IL1R2, IL4R, IL6R, IL10RA, TNFRSF1A, CSF2RA, FCGR2A, IFNGR1, IL22RA1 (см. рис. 1). Нельзя исключать, что такое повышение соответствует протеолитическому отщеплению цитокиновых рецепторов с поверхности клеток и имеет иммунорегуляторный характер.

Для нескольких ЦК достоверное повышение их экспрессии не сопровождалось изменением экспрессии их рецепторов. Наиболее заметными примерами такого рода являлись IL15 и IL-27B. IL-27B — цитокин, экспрессия которого впервые была описана в В-клетках, инфицированных вирусом Эпштейна — Барр. Он является одной из двух субъединиц IL-27, который вырабатывается активированными антигенпрезентирующими клетками,

включая микроглию, и стимулирует противовирусный адаптивный ответ. IL-15 — цитокин, играющий важную роль в механизмах врожденного и адаптивного иммунитета: он необходим для дифференцировки, выживания и функционирования CD4+ Th1-клеток, CD8+ Т-клеток памяти, NK-клеток, антигенпрезентирующих клеток (Малашенкова и соавт., 2014) [2].

Незначительно, но достоверно была повышена экспрессия целого ряда белков семейства интерферонов-альфа, обеспечивающих внутриклеточные механизмы противовирусной защиты: IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA7, IFNA8, IFNA14, IFNA16, IFNA17, их рецепторов IFNAR1 и IFNAR2, а также интерферона- λ 3 (IFNL3). В небольшой степени, но достоверно была повышена экспрессия генов NOD-like рецепторов врожденного иммунитета (NLRC4, NLRP5, NLRP7, NLRP8, NLRP10, NLRP11), осуществляющих защиту от внутриклеточных патогенов, наиболее значимая в случае NLRP7 (рис. 4).

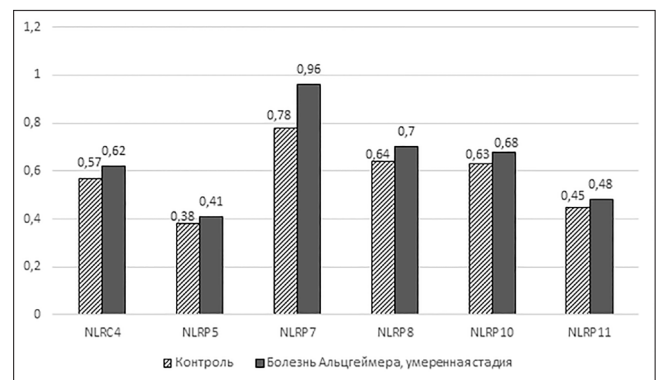


Рис. 4. Экспрессия белков семейства NOD-like рецепторов при болезни Альцгеймера и в контрольной группе

Представляет интерес обнаруженное при БА умеренной стадии снижение экспрессии фактора миграции макрофагов (MIF). Динамика уровня этого фактора была противоположной по отношению к большинству других провоспалительных цитокинов, экспрессия которых при БА повышалась. Уровень MIF уменьшался по мере прогрессирования заболевания: при тяжелой БА он был ниже, чем при умеренной. Литературные данные об уровне белка, кодируемого геном MIF, при болезни Альцгеймера противоречивы. По данным одной из работ, его концентрация в спинномозговой жидкости больных ниже, чем в контрольной группе, но позже коллективом с участием тех же авторов был показан противоположный результат: повышение MIF в спинномозговой жидкости при болезни Альцгеймера (Popp et al., 2008 [26]; Bacher et al., 2010 [6]). Также имеются некоторые косвенные

Обсуждение

данные об участии этого провоспалительного белка в патогенезе БА: *in vitro* добавление ингибитора MIF снижает токсичность A β в клеточных линиях нейронов человека и мыши (Bacher et al., 2010) [6].

При рассмотрении блока генов окислительного стресса и антиоксидантной активности обнаружено снижение экспрессии антиоксидантных ферментов перокси-редоксинов PRDX3, PRDX4, PRDX5 и супероксид-дисмутазы SOD1, что говорит о снижении активности антиоксидантной защиты. Однако экспрессия одного из белков этого семейства, PRDX6, была повышена (рис. 5). Ранее было показано взаимодействие PRDX6 при стрессе (облучение) с HSP60 (Sharapov et al., 2016) [27]. Изолированное повышение мРНК данного белка может быть обусловлено его полифункциональностью. В то же время не было изменений в экспрессии фактора индукции гипоксии HIF, белков теплового шока HSP и большинства субъединиц NADPH-оксидазы. Увеличивалась только мРНК цитозольного фактора нейтрофилов NCF4, ответственного за экспрессию субъединицы 40 NADPH-оксидазы. Исследование методом OncoFinder активности метаболического пути деградации свободных радикалов также показало отсутствие изменений при умеренной БА.

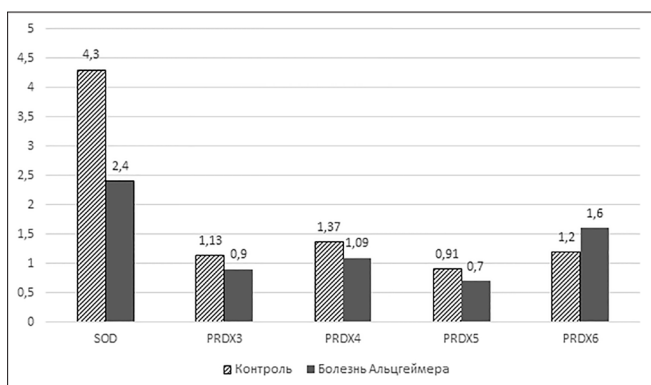


Рис. 5. Экспрессия факторов антиоксидантной защиты при болезни Альцгеймера и в контрольной группе

При тяжелой стадии БА изменения экспрессии генов, как правило, имели ту же направленность, что и при умеренной стадии, но были менее выраженными. При этой стадии было выявлено существенное, более 20% по сравнению с контролем, изменение экспрессии IL-15, IL22RA1, MIF, TLR4 ($p < 0,01$). Экспрессия Toll-like рецептора TLR4, распознающего липополисахарид грамотрицательных бактерий, а также экспрессия MIF, функции которого обсуждались выше, была при тяжелой стадии БА изменена сильнее, чем при умеренной (коэффициент экспрессии 1,63 и 1,21; 0,66 и 0,75 соответственно).

Авторы базы данных GEO (GSE48350) изучали полный транскриптом в различных областях коры головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера (верхняя лобная извилина, энторинальная кора, гиппокамп) (Cribbs et al., 2012) [14]. Проведенный ими анализ данных не включал в себя разделение пациентов на группы по тяжести заболевания и анализ экспрессии генов, кодирующих белки окислительного стресса. В данной работе была проведена оценка экспрессии мРНК, ассоциируемых с воспалительным ответом и окислительным стрессом, в гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера в зависимости от стадии заболевания. Были сформированы группы пациентов по стадиям БА, проведен анализ транскриптома гиппокампа пациентов с БА по перечню генов, в который включены гены белков воспаления, иммунного ответа и окислительного стресса. Анализ малого количества генов позволил обнаружить достоверные тонкие изменения экспрессии (см. табл. 2), которые при проведении мега-анализа полного транскриптома обычно не выявляются.

Следует отметить, что данные о причинах смерти пациентов с болезнью Альцгеймера отсутствовали в базе данных. Согласно литературным сведениям, основной причиной смерти при БА является пневмония (Todd et al., 2013) [36]. В контрольной группе без когнитивных расстройств наиболее частыми причинами смерти считаются сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. Поэтому можно предположить, что между основной и контрольной группами были различия по преобладающим причинам смерти, что могло повлиять на результаты данного анализа.

Согласно литературным данным, полученным в основном при исследованиях *in vitro* и на животных моделях, с возрастом происходит активация микроглии в мозгу, что сопровождается повышением чувствительности этих клеток к инфекционным и другим патологическим воздействиям (Wes et al., 2016) [38]. Однако при развитии БА активация микроглии увеличивается, что приводит к повышению уровня цитокинов, хемокинов и усилению синтеза АФК. Ранее было показано, что в лизатах различных областей коры головного мозга больных БА присутствуют продукты окисления ДНК, увеличено содержание конечного продукта перекисного окисления липидов 4-ноненаля, повышено содержание карбониллов в белках и 3-нитротирозина (Stewart, Heales, 2003) [33].

В результате проведенного микроанализа транскриптома гиппокампа головного мозга больных БА были установлены признаки активации микроглии и механизмов

врожденного иммунного ответа при сопутствующем снижении антиоксидантной защиты. Наиболее выраженные изменения, которые могут отражать повреждающее действие нейровоспаления, были при умеренной стадии БА. Увеличение экспрессии молекул, участвующих в

распознавании чужеродных внутриклеточных белков, презентации антигена и активации Т-клеток, которые были обнаружены в данной работе, позволяют предположить важную роль инфекционных факторов в развитии болезни Альцгеймера.

Таблица 2

Гены, транскрипция которых была достоверно изменена при болезни Альцгеймера умеренной степени

| Название гена | Расшифровка названия | Достоверность различий | Соотношение уровня транскрипции при БА умеренной стадии и в контрольной группе |
|---------------|--|----------------------------------|--|
| AGER (RAGE) | Advanced glycosylation end-product specific receptor | $\rho=0,0183$ | 1,13 |
| CCL13 | Лиганд хемокиновых рецепторов мотива С-С 13 | $\rho=0,0017$ | 1,08 |
| CCL17 | Лиганд хемокиновых рецепторов мотива С-С 17 | $\rho=0,0047$ | 1,15 |
| CCL22 | Лиганд хемокиновых рецепторов мотива С-С 22 | $\rho=0,0145$ | 1,24 |
| CCL26 | Лиганд хемокиновых рецепторов мотива СС26 | $\rho=0,0035$ | 1,22 |
| СИТА | Class II major histocompatibility complex transactivator | $\rho=0,0021$ | 1,15 |
| CD40 | Белок 5 семейства рецепторов фактора некроза опухолей | $\rho=0,027$ | 1,15 |
| CD80 | Фактор костимуляции CD80 | $\rho=0,00013$ | 1,15 |
| CD86 | Антиген активации Т-клеток CD86 | $\rho=0,0329$ | 1,49 |
| CD163 | Белок M130 1 типа суперсемейства богатых цистеином рецепторов-мусорщиков | $\rho=0,028$ | 2,75 |
| CRP | С-реактивный белок | $\rho=0,014$ | 1,05 |
| CSF2RA | Альфа-субъединица рецептора колониестимулирующего фактора | $\rho=0,015$ | 1,39 |
| CXCL16 | Лиганд хемокиновых рецепторов мотива С-Х-С16 | $\rho=0,0198$ | 1,4 |
| FCGR2A | Рецептор Fc-фрагмента IgG IIa | $\rho=0,0266$ | 1,37 |
| FLT1 | Родственная Fms тирозинкиназа 1 | $\rho=0,0061$ | 1,35 |
| IFNA1 | Интерферон-альфа1 | $\rho=0,0067$ | 1,12 |
| IFNA2 | Интерферон-альфа2 | $\rho=0,0004$ | 1,11 |
| IFNA4 | Интерферон-альфа4 | $\rho=0,0062$ | 1,06 |
| IFNA5 | Интерферон-альфа5 | $\rho=0,0026$ | 1,09 |
| IFNA7 | Интерферон-альфа7 | $\rho=0,0013$ | 1,15 |
| IFNA8 | Интерферон-альфа8 | $\rho=0,00005,$ $\rho=0,0249$ | 1,13 |
| IFNA14 | Интерферон-альфа14 | $\rho=0,0033$ | 1,1 |
| IFNA16 | Интерферон-альфа16 | $\rho=0,0029$ | 1,07 |
| IFNA17 | Интерферон-альфа17 | $\rho=0,0038$ | 1,07 |
| IFNA21 | Интерферон-альфа 21 | $\rho=0,0021$ | 1,08 |
| IFNAR2 | Субъединица 2 рецептора интерферонов-альфа и бета | $\rho=0,0056,$ $\rho=0,0249$ | 1,14 |
| IFNGR1 | Рецептор интерферона-гамма 1 | $\rho=0,0035$ | 1,32 |
| IFNL3 | Интерферон-лямбда 3 | $\rho=0,0035$ | 1,08 |
| IL1R1 | Рецептор интерлейкина-1 тип1 | $\rho=0,0169$ | 1,42 |
| IL1R2 | Рецептор интерлейкина-1 тип 2 | $\rho=0,0035$ | 1,8 |
| IL2 | Интерлейкин-2 | $\rho=0,0007;$ $\rho=0,0303$ | 1,13 |
| IL2RA | Субъединица альфа рецептора интерлейкина-2 | $\rho=0,0061$ | 1,05 |
| IL3 | Интерлейкин-3 | $\rho=0,0017$ | 1,07 |
| IL4 | Интерлейкин-4 | $\rho=0,0049$ | 1,1 |
| IL4R | Рецептор интерлейкина-4 | $\rho=0,0213$ | 1,67 |
| IL5 | Интерлейкин-5 | $\rho=0,00045$ | 1,17 |
| IL6R | Рецептор интерлейкина-6 | $\rho=0,0113$ | 1,31 |
| IL7 | Интерлейкин-7 | $\rho=0,0039$ | 1,13 |
| IL10 | Интерлейкин-10 | $\rho=0,0012$ | 1,1 |
| IL10RA | Субъединица альфа рецептора интерлейкина-10 | $\rho=0,0383$ | 1,62 |
| IL12B | Интерлейкин-12B | $\rho=0,0023,$ $\rho=0,0062$ | 1,11 |

| | | | |
|----------|---|--|------------|
| IL15 | Интерлейкин-15 | $\rho=0,0003$; $\rho=0,0022$ | 1,36 |
| IL16 | Интерлейкин-16 | $\rho=0,0088$ | 1,13 |
| IL17A | Интерлейкин-17А | $\rho=0,0023$; $\rho=0,0103$ | 1,1 |
| IL17D | Интерлейкин-17D | $\rho=0,0113$; $\rho=0,0103$ | 1,37 |
| IL17RB | Рецептор В интерлейкина-17 | $\rho=0,0113$ | 1,43 |
| IL18 | Интерлейкин-18 | $\rho=0,029$ | 1,66 |
| IL18R1 | Рецептор 1 интерлейкина-18 | $\rho=0,0266$ | 1,65 |
| IL20 | Интерлейкин-20 | $\rho=0,0013$ | 1,1 |
| IL20RB | Субъединица бета рецептора интерлейкина-20 | $\rho=0,00035$ | 1,09 |
| IL21 | Интерлейкин-21 | $\rho=0,0025$ | 1,08 |
| IL21R | Рецептор интерлейкина-21 | $\rho=0,0003$ | 1,11 |
| IL22 | Интерлейкин-22 | $\rho=0,00084$ | 1,1 |
| IL22RA1 | Субъединица альфа-1 рецептора интерлейкина-22 | $\rho=0,00257$; $\rho=0,008$ | 1,24 |
| IL23R | Рецептор интерлейкина-23 | $\rho=0,0012$ | 1,09 |
| IL24 | Интерлейкин-24 | $\rho=0,0012$ | 1,08 |
| IL27B | Интерлейкин-27B | $\rho=0,0044$ | 1,46 |
| IRF7 | Интерферон-регулирующий фактор 7 | $\rho=0,0002$ | 1,69 |
| LTB | Лимфотоксин-бета | $\rho=0,008$ | 1,12 |
| MAGED1 | Белок семейства MAGE D1 | $\rho=0,0035$ | 0,69 |
| MIF | Фактор ингибирования миграции макрофагов | $\rho=0,0019$; $\rho=0,0002$ | 0,75; 0,64 |
| MSR1 | Рецептор-мусорщик макрофагов 1 | $\rho=0,0017$ | 1,62 |
| NCF4 | Цитозольный фактор нейтрофилов 4 | $\rho=0,0157$ | 1,31 |
| NFKBIA | Ингибитор-альфа NFkB | $\rho=0,0015$ | 1,35 |
| NKIRAS1 | Взаимодействующий с ингибитором NFkB Ras-подобный белок 1 | $\rho=0,0004$ | 0,57 |
| NKRF | Фактор репрессии NFkB | $\rho=0,00005$ | 0,72 |
| NLRC4 | Содержащий CARD-домен белок семейства NLR 4 | $\rho=0,0059$ | 1,09 |
| NLRP5 | Содержащий пириновый домен белок семейства NLR 5 | $\rho=0,0033$ | 1,07 |
| NLRP7 | Содержащий пириновый домен белок семейства NLR 7 | $\rho=0,007$; $\rho=0,0002$; $\rho=0,0163$ | 1,23 |
| NLRP8 | Содержащий пириновый домен белок семейства NLR 8 | $\rho=0,0056$ | 1,1 |
| NLRP10 | Содержащий пириновый домен белок семейства NLR 10 | $\rho=0,0058$ | 1,08 |
| NLRP11 | Содержащий пириновый домен белок семейства NLR 11 | $\rho=0,0067$ | 1,05 |
| PRDX3 | Пероксиредоксин 3 | $\rho=0,0133$ | 0,79 |
| PRDX4 | Пероксиредоксин 4 | $\rho=0,0266$ | 0,8 |
| PRDX5 | Пероксиредоксин 5 | $\rho=0,0133$ | 0,77 |
| PRDX6 | Пероксиредоксин 6 | $\rho=0,0009$ | 1,38 |
| SOD1 | Супероксиддисмутаза 1 | $\rho=0,0005$ | 0,83 |
| STAT4 | Передатчик сигнала и активатор транскрипции 4 | $\rho=0,0011$ | 0,27 |
| TNFRSF1A | Рецептор суперсемейства TNF 1A | $\rho=0,0056$ | 1,54 |

Литература

- Ещенко Н.Д. Биохимия психических и нервных болезней. – Издательство Санкт-Петербургского государственного университета, 2004. – 204 с.
- Малашенкова И.К., Казанова Г.В., Дидковский Н.А. Интерлейкин-15: строение, сигналинг и роль в иммунной защите // Молекулярная медицина. – 2014. – № 3. – С. 9–20.
- Степанчиков М.Ю., Моисеева Ю.В., Гуляева Н.В. «Инъекционные» модели болезни Альцгеймера: окислительный стресс в механизме токсичности АF64А и β -амилоидного пептида у грызунов // Нейрохимия. – 2002. – Т. 19. – № 3. – С. 165–175.
- Alexandrova E., Nassa G., Corleone G., Buzdin A., Aliper A.M., Terekhanova N., Shepelin D., Zhavoronkov A., Tamm M., Milanese L., Miglino N., Weisz A., Borger P. Large-scale profiling of signalling pathways reveals an asthma specific signature in bronchial smooth muscle cells // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7(18). – P. 25150–25161.
- Artemov A., Aliper A., Korzinkin M., Lezhnina K., Jellen L., Zhukov N., Roumiantsev S., Gaifullin N., Zhavoronkov A., Borisov N., Buzdin A. A method for predicting target drug efficiency in cancer based on the analysis of signaling pathway

- activation // *Oncotarget*. — 2015. — Vol. 6(30). — P. 29347–29356.
6. Bacher M., Deuster O., Aljabari B., Egensperger R., Neff F., Jessen F., Popp J., Noelker C., Reese JP., Al-Abed Y., Dodel R. The role of macrophage migration inhibitory factor in Alzheimer's disease // *Mol. Med.* — 2010. — Vol. 16(3–4). — P. 116–121. doi: 10.2119/molmed.2009.00123.
 7. Barage S.H., Sonawane K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease // *Neuropeptides*. — 2015. — Vol. 52. — P. 1–18.
 8. Belkacemi A., Ramassamy C. Time sequence of oxidative stress in the brain from transgenic mouse models of Alzheimer's disease related to the amyloid- β cascade // *Free Radic. Biol. Med.* — 2012. — Vol. 52(3). — P. 593–600.
 9. Borisov N.M., Terekhanova N.V., Aliper A.M., Venkova L.S., Smirnov P.Y., Roumiantsev S., Korzinkin M.B., Zhavoronkov A.A., Buzdin A.A. Signaling pathway activation profiles make better markers of cancer than expression of individual genes // *Oncotarget*. — 2014. — Vol. 5(20). — P. 10198–10205.
 10. Butterfield D.A. beta-Amyloid-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease // *Chem. Res. Toxicol.* — 1997. — Vol. 10(5). — P. 495–506.
 11. Buzdin A.A., Zhavoronkov A.A., Korzinkin M.B., Venkova L.S., Zenin A.A., Smirnov P.Y., Borisov N.M. Oncofinder, a new method for the analysis of intracellular signaling pathway activation using transcriptomic data // *Front. Genet.* — 2014. — Vol. 5. — P. 55. doi: 10.3389/fgene.2014.00055.
 12. Chen J.M., Jiang G.X., Li Q.W., Zhou Z.M., Cheng Q. Increased serum levels of interleukin-18, -23 and -17 in Chinese patients with Alzheimer's disease // *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* — 2014. — Vol. 38(5–6). — P. 321–329.
 13. Conrady C.D., Drevets D.A., Carr D.J. Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: is an immune response a good thing? // *J. Neuroimmunol.* — 2010. — Vol. 220(1–2). — P. 1–9.
 14. Cribbs D.H., Berchtold N.C., Perreau V., Coleman P.D., Rogers J., Tenner A.J., Cotman C.W. Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study // *J. Neuroinflammation*. — 2012. — Vol. 9. — P. 179. doi: 10.1186/1742-2094-9-179.
 15. Doens D., Fernández P.L. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis // *J. Neuroinflammation*. — 2014. — Vol. 11. — P. 48. doi: 10.1186/1742-2094-11-48
 16. Huang X., Atwood C.S., Hartshorn M.A., Multhaup G., Goldstein L.E., Scarpa R.C., Cuajungco M.P., Gray D.N., Lim J., Moir R.D., Tanzi R.E., Bush A.I. The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction // *Biochemistry*. — 1999. — Vol. 38(24). — P. 7609–7616.
 17. Lezhnina K., Kovalchuk O., Zhavoronkov A.A., Korzinkin M.B., Zabolotneva A.A., Shegay P.V., Sokov D.G., Gaifullin N.M., Rusakov I.G., Aliper A.M., Roumiantsev S.A., Alekseev B.Y., Borisov N.M., Buzdin A.A. Novel robust biomarkers for human bladder cancer based on activation of intracellular signaling pathways // *Oncotarget*. — 2014. — Vol. 5(19). — P. 9022–9032.
 18. López González I., Garcia-Esparcia P., Llorens F., Ferrer I. Genetic and transcriptomic profiles of inflammation in neurodegenerative diseases: Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jakob and Tauopathies // *Int. J. Mol. Sci.* — 2016. — Vol. 17(2). — P. 206. doi: 10.3390/ijms17020206.
 19. Makarev E., Izumchenko E., Aihara F., Wysocki P.T., Zhu Q., Buzdin A., Sidransky D., Zhavoronkov A., Atala A. Common pathway signature in lung and liver fibrosis // *Cell Cycle*. — 2016. — Vol. 15(13). — P. 1667–1673.
 20. Mao P. Recent progress and concerns in dementia: distinguishing Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies via biochemical markers in the cerebrospinal fluid // *Advances in Biological Chemistry*. — 2012. — Vol. 2. — P. 176–190.
 21. Martin E., Boucher C., Fontaine B., Delarasse C. Distinct inflammatory phenotypes of microglia and monocyte-derived macrophages in Alzheimer's disease models: effects of aging and amyloid pathology // *Aging Cell*. — 2016. — Vol. 16(1). — P. 27–38. doi: 10.1111/accel.12522.
 22. Miller J.A., Woltjer R.L., Goodenbour J.M., Horvath S., Geschwind D.H. Genes and pathways underlying regional and cell type changes in Alzheimer's disease // *Genome Med.* — 2013. — Vol. 5(5). — P. 48. doi: 10.1186/gm452.
 23. Miyoshi K., Obata K., Kondo T., Okamura H., Noguchi K. Interleukin-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury // *J. Neurosci.* — 2008. — Vol. 28(48). — P. 12775–12787.
 24. Ojala J., Alafuzoff I., Herukka S.K., van Groen T., Tanila H., Pirttilä T. Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients // *Neurobiol. Aging*. — 2009. — Vol. 30. — P. 198–209.
 25. Pey P., Pearce R.K., Kalaitzakis M.E., Griffin W.S., Gentleman S.M. Phenotypic profile of alternative activation marker CD163 is different in Alzheimer's and Parkinson's disease // *Acta Neuropathol. Commun.* — 2014. — Vol. 2. — P. 21. doi: 10.1186/2051-5960-2-21.
 26. Popp J., Bacher M., Kölsch H., Noelker C., Deuster O., Dodel R., Jessen F. Macrophage migration inhibitory factor in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease // *J. Psychiatr. Res.* — 2009. — Vol. 43(8). — P. 749–753. doi: 10.1016/j.jpsychires.2008.10.006.
 27. Sharapov M.G., Gudkov S.V., Gordeeva A.E., Karp O.E., Ivanov V.E., Shelkovskaya O.V., Bruskov V.I., Novoselov V.I., Fesenko E.E. Peroxiredoxin 6 is a natural radioprotector // *Dokl. Biochem. Biophys.* — 2016. — Vol. 467(1). — P. 110–112.
 28. Shepelin D., Korzinkin M., Vanyushina A., Aliper A., Borisov N., Vasilov R., Zhukov N., Sokov D., Prassolov V., Gaifullin N., Zhavoronkov A., Bhullar B., Buzdin A.

- Molecular pathway activation features linked with transition from normal skin to primary and metastatic melanomas in human // *Oncotarget*. — 2016. — Vol. 7(1). — P. 656–670.
29. Smith M.A., Casadesus G., Joseph J.A., Perry G. Amyloid-beta and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain // *Free Radic. Biol. Med.* — 2002. — Vol. 33(9). — P. 1194–1199.
30. Smith M.A., Rudnicka-Nawrot M., Richey P.L., Praprotnik D., Mulvihill P., Miller C.A., Sayre L.M., Perry G. Amyloid-beta and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain // *J. Neurochem.* — 1995. — Vol. 64(6). — P. 2660–2666.
31. Srinivasan K., Friedman B.A., Larson J.L., Lauffer B.E., Goldstein L.D., Appling L.L., Borneo J., Poon C., Ho T., Cai F., Steiner P., van der Brug M.P., Modrusan Z., Kaminker J.S., Hansen D.V. Untangling the brain's neuroinflammatory and neurodegenerative transcriptional responses // *Nat. Commun.* — 2016. — Vol. 7. — P. 11295. doi: 10.1038/ncomms11295.
32. Starnes T., Broxmeyer H.E., Robertson M.J., Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis // *J. Immun.* — 2002. — Vol. 169(2). — P. 642–646.
33. Stewart V.C., Heales S.J.R. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration // *Free Radic. Biol. Med.* — 2003. — Vol. 34. — P. 287–303.
34. Sutinen E.M., Pirttilä T., Anderson G., Salminen A., Ojala J.O. Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid- β production in human neuron-like cells // *J. Neuroinflammation*. — 2012. — Vol. 9 — P. 199.
35. Tedgui A., Mallat Z. Platelets in atherosclerosis: a new role for beta-amyloid peptide beyond Alzheimer's disease // *Circ. Res.* — 2002. — Vol. 90(11). — P. 1145–1146.
36. Todd S., Barr S., Passmore A.P. Cause of death in Alzheimer's disease: a cohort study // *Quarterly Journal of Medicine*. — 2013. — Vol. 106(8). — P. 747–753. doi: 10.1093/qjmed/hct103.
37. Venkova L., Aliper A., Suntsova M., Kholodenko R., Shepelin D., Borisov N., Malakhova G., Vasilov R., Roumiantsev S., Zhavoronkov A., Buzdin A. Combinatorial high-throughput experimental and bioinformatic approach identifies molecular pathways linked with the sensitivity to anticancer target drugs // *Oncotarget*. — 2015. — Vol. 6(29). — P. 27227–27238.
38. Wes P.D., Holtman I.R., Boddeke E.W., Möller T., Eggen B.J. Next generation transcriptomics and genomics elucidate biological complexity of microglia in health and disease // *Glia*. — 2016. — Vol. 64(2). — P. 197–213.
39. Zhang J., Ke K.F., Liu Z., Qiu Y.H., Peng Y.P. Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of $\alpha\beta 1$ -42-induced Alzheimer's disease model rats // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8(10). — e75786.
40. Zou Z., Liu C., Che C., Huang H. Clinical genetics of Alzheimer's disease // *Biomed. Res. Int.* — 2014. — 291862. doi: 10.1155/2014/291862.

Список сокращений:

АФК — активные формы кислорода;

А β — бета-амилоид;

БА — болезнь Альцгеймера;

мРНК — матричная РНК;

АРР — белок-предшественник амилоида;

GM-CSF — колониестимулирующий фактор гранулоцитов и моноцитов;

HSV1 — вирус простого герпеса 1 типа;

ЦК — цитокины.

EXPRESSION OF INFLAMMATORY MARKERS AND PROTEINS OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN THE HIPPOCAMPUS IN ALZHEIMER'S DISEASE

S.A. KRYNSKIY¹, M.I. SOROKIN¹, I.K. MALASHENKOVA¹, R.G. VASILOV¹, A.A. SELISCHEVA^{1,2}¹ National Research Centre «Kurchatov Institute»,² M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow.

The results of the analysis of the expression of key genes of natural immunity and inflammation, as well as oxidative stress in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease at different stages of the disease, based on materials from the GEO open access database (GSE48350) are presented. Changes in the expression of a number of genes have been established, which indicate the activation of microglial cells and the mechanisms of the innate immune response, as well as the reduction of antioxidant protection. The most pronounced changes in the expression of the studied genes were observed in the moderate stage of Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, transcriptome, hippocampus, oxidative stress, microglia, cytokines, Toll-like receptors, receptors-«scavengers».

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНСТРУМЕНТАРИЯ БАЗЫ ДАННЫХ DEPPDB ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РОЛИ ЭЛЕКТРОСТАТИКИ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ПРОКАРИОТ

А.А. ОСИПОВ^{1*}, Е.А. КРУТИНИНА², Г.Г. КРУТИНИН²,
П.М. БЕСКАРАВАЙНЫЙ², С.Г. КАМЗОЛОВА²

¹ *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва;*

² *Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл.*

ДНК — сильно отрицательно заряженная молекула, и ее электростатические, так же, как и прочие физические, свойства определяют взаимодействия с белками, в том числе регулируемыми транскрипцию. Инструментарий базы данных DEPPDB представляет доступ к информации об электростатических и других физических свойствах всех полных секвенированных геномов, наряду с их последовательностями, аннотированными биологическими и структурными свойствами функциональных элементов и целых геномов. База может служить основой для проведения фундаментальных исследований роли электростатики и других физических свойств геномной ДНК при регуляции транскрипции.

Ключевые слова: физические свойства ДНК, электростатика, прокариоты, регуляция транскрипции, биологические базы данных.

Введение

Давно уже стала общим местом констатация безнадёжного отставания изучения биохимии и генетики организмов традиционными методами от лавинообразного увеличения количества их целиком прочитанных геномов. Среди методов биоинформатики, имеющих дело с этими геномами, важное место занимает анализ физических свойств геномной ДНК и ее элементов. Эти свойства играют ключевую роль во взаимодействии ДНК с белками, в частности, регулируемыми транскрипцию, и зависят от ее химического состава, то есть — от первичной последовательности оснований. Благодаря диссоциации фосфатных групп ДНК является одним из наиболее сильно отрицательно заряженных биополимеров, при этом распределение потенциала на ее поверхности гетерогенно в силу геометрических параметров оснований. Белки также относятся к заряженным полимерам, электростатические профили которых отличаются неоднородностью в распределении потенциала, причем характерно, что в

случае ДНК-связывающих белков участки, вовлеченные во взаимодействие с ДНК, положительно заряжены. Эти специфические особенности электростатических характеристик двух взаимодействующих между собой биомолекул определяют один из основных механизмов, участвующих в ДНК-белковом узнавании.

Разработка простого метода расчета распределения электростатического потенциала для нуклеотидных последовательностей ДНК практически любой длины [17] позволила провести целый ряд исследований по выяснению роли электростатических сил в реализации функциональной активности ДНК, осуществляемой самыми разными ДНК-белковыми парами, на примере целых прокариотических геномов. Программы, созданные на основе этого метода, легли в основу базы данных (БД) всех полных секвенированных геномов DEPPDB [14, 15], в которой представлена информация об электростатических и других физических свойствах всех полных секвенированных геномов, наряду с их последовательностями и аннотированными биологическими и структурными свойствами целых геномов и их функциональных элементов. DEPPDB организована по таксономическому принципу, что позволяет проводить анализ свойств геномных элементов как для индивидуальных геномов, так и целых таксономических групп, открывая возможности для эволюционного анализа. База дополнена обширным аппаратом анализа и визуализации

© 2017 г. Осипов А.А., Крутина Е.А., Крутинин Г.Г., Бескаравайный П.М., Камзолова С.Г.

* **Автор для переписки:**

Осипов Александр Александрович

к.б.н., ст.н.с.,

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

E-mail: aosypov@gmail.com

данных и послужила основой для проведения целого ряда фундаментальных исследований [1, 2, 4, 5–16].

В настоящей работе представлены основные группы инструментов базы, служащих для изучения роли электростатики в регуляции транскрипции прокариот.

Материалы и методы

Последовательности всех полных секвенированных геномов и их аннотации, включая аннотации элементов геномов, взяты из базы данных NCBI RefSeq (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/>) [18, 19] и частично из BioCyc (<http://biocyc.org>) [3]. Ряд данных был получен из литературных источников. Данные пополняются и обновляются на регулярной основе.

Описания таксонов и идентификаторы, позволяющие сформировать иерархическую древовидную структуру раздела и приписать геномы таксонам, взяты из базы данных NCBI Taxonomy (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/taxonomy/>) [19].

Электростатический потенциал вокруг молекул геномной ДНК рассчитывался с помощью метода [17], использующего расчет по закону Кулона полноатомной модели ДНК с использованием подгоночных параметров зарядов и диэлектрической проницаемости для согласования с расчетами, полученными решением уравнения Пуассона — Больцмана.

Расчет других физических и геометрических свойств основан на моно-, ди- и тринуклеотидном составе, за исключением ряда особых случаев (например, изгибности или свободной энергии двойной спирали и др.).

Результаты

Инструментарий базы данных DEPPDB

Весь обширный инструментарий базы можно подразделить на следующие основные функциональные группы.

Инструменты подготовки данных. Данная группа инструментов предназначена для конвертирования данных из формата баз данных, доступных через Интернет, как правило, в виде набора текстовых файлов, в формат, пригодный для загрузки в разработанную реляционную БД DEPPDB и расчета исследуемых физических свойств. Это набор программ на языке Perl — парсеры форматов NCBI RefSeq, NCBI Taxonomy, BioCyc и ряда других.

Инструменты расчета потенциала. Эта группа инструментов предназначена для расчета профиля

электростатического потенциала вдоль молекулы ДНК и служит как для автоматического массового расчета при первичном заполнении базы, так и для текущих нужд — расчета единичных последовательностей, представленных пользователем, например, — для анализа электростатики мутантных последовательностей.

Инструменты расчета других физических свойств. Так же, как и инструменты расчета потенциала, они подразделяются на инструменты первичного заполнения и расчета по запросу. На данный момент доступны расчеты физических и геометрических свойств последовательности ДНК и комплементарной ей РНК, основанных на моно- и динуклеотидных последовательностях, из которых эти свойства и формируются. Список свойств доступен через интерфейс базы, постоянно пополняется и включает в себя, например, такие свойства, как изгибность, термодинамическую устойчивость, ширину бороздок и т.д., определенные разными способами. Данные берутся из литературы и насчитывают свыше сотни позиций.

Инструменты визуализации и анализа данных. Указанная группа инструментов предназначена для анализа данных и представления его результатов и самих данных в удобном для восприятия виде. Часть этих инструментов используется при первичном заполнении базы, предоставляя статистические параметры аннотированных геномов и их элементов, часть — для текущего анализа и его визуализации.

Это, прежде всего, инструменты, позволяющие осуществлять разнообразный поиск, а также навигацию по таксономическому дереву. Конечным итогом является демонстрация свойств таксонов, геномов, которые в них входят, и аннотированных функциональных и структурных элементов этих геномов вместе с разнообразными статистиками их электростатических и других физических свойств.

Далее следуют инструменты визуализации профилей электростатики и других физических свойств, дополненные визуализацией разметки генома по его функциональным элементам. Они позволяют проводить визуальный анализ соответствующих свойств в привязке к функциональному контексту генома параллельно с визуализацией самой последовательности и дополнены инструментами кросс-корреляционного анализа профилей. К этой же группе можно отнести инструменты расчета и визуализации статистических параметров множества последовательностей. Это могут быть как обобщенные профили элементов генома, дающие возможность выявить характерные черты, отличающие различные части этих элементов от средних значений для генома, так и

обобщенные или наложенные индивидуальные профили для произвольно указанных пользователем координат, отсутствующих в базе. Такой анализ позволяет рассчитать и визуализировать описательные статистики полученных наборов, например, усредненные профили с доверительными интервалами и стандартными отклонениями, процентилями и даже гистограммами плотностей, корреляции средних для профилей и т.д.

Следующая группа инструментов анализирует и визуализирует корреляции между интегральными свойствами целых геномов и их элементов. Типичным представителем служит инструмент, анализирующий и визуализирующий зависимость между средним значением электростатического потенциала целого генома и его АТ составом. Такие инструменты доступны для всех физических свойств. Имеется также универсальный инструмент анализа и визуализации корреляций наборов произвольных данных, получаемых запросом к БД, что позволяет анализировать, например, гипотетическую корреляцию средней длины генов и АТ состава генома. Поскольку база данных является реляционной, таким способом можно анализировать абсолютно все свойства, которые в ней содержатся.

В силу того, что БД DEPPDB организована по таксономическому принципу, инструменты анализа и визуализации позволяют работать с функциональными и структурными элементами геномов не только внутри одного организма, но и для целых таксономических групп, например, сравнивать на одном графике усредненные начала генов для всех классов бактерий или архей или анализировать зависимость физических свойств генома от его среднего АТ состава, сравнивая бактерий и митохондрии.

Все визуализации всех данных БД DEPPDB доступны через Интернет на сайте базы <http://deppdb.rsp.ru/>. Там же находится справочная система помощи для работы.

Авторы выражают благодарность Институту математических проблем биологии РАН за поддержку сервера базы данных DEPPDB.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-04-01865.

Литература

1. Крутинин Г.Г., Крутинина Е.А., Камзолова С.Г., Осипов А.А. Бактериофаг λ : электростатические свойства

генома и его элементов // Молекулярная биология. — 2015. — Т. 49. — № 3. — С. 384–393.

2. Осипов А.А., Камзолова С.Г. Промоторы мутантного штамма бактериофага Т7 демонстрируют приспособление к РНК-полимеразе фага Т3 путем изменения своих электростатических свойств // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2016. — Т. 12. — № 4. — С. 40–46.
3. Caspi R., Altman T., Billington R., Dreher K., Foerster H., Fulcher C.A., Holland T.A., Keseler I.M., Kothari A., Kubo A., Krummenacker M., Latendresse M., Mueller L.A., Ong Q., Paley S., Subhraveti P., Weaver D.S., Weerasinghe D., Zhang P., and Karp P.D. The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases // Nucleic Acids Research. — 2014. — Vol. 42(1). — D459–D471.
4. Kamzolova S.G., Sorokin A.A., Osipov A.A., Beskaravainyi P.M. Electrostatic map of bacteriophage T7 genome. Comparative analysis of electrostatic properties of sigma70-specific T7 DNA promoters recognized by RNA-polymerase of *Escherichia coli* // Biofizika. — 2009. — Vol. 54(6). — P. 975–983.
5. Krutinina E.A., Krutinin G.G., Kamzolova S.G., Osypov A.A. Electrostatics of *E. coli* CRP transcription factor match that of its binding sites // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. — 2015. — Vol. 33(Suppl. 1). — P. 21–22.
6. Krutinina E.A., Krutinin G.G., Kamzolova S.G., Osypov A.A. Electrostatics of prokaryotic transcription factors match that of their binding sites // FEBS Journal. — 2014. — Vol. 281(Suppl. 1). — P. 682.
7. Krutinina E.A., Krutinin G.G., Kamzolova S.G., Osypov A.A. New insights into protein-DNA electrostatic interactions: Beyond promoters to transcription factors binding sites // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2011. — Vol. 28(6). — P. 1137–1138.
8. Krutinin G.G., Krutinina E.A., Kamzolova S.G., Osypov A.A. The role of electrostatics in protein-DNA interactions in phage lambda // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2011. — Vol. 28(6). — P. 1139–1140.
9. Krutinin G.G., Krutinina E.A., Kamzolova S.G., Osypov A.A. Electrostatic properties of Rho-dependent and Rho-independent terminators // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. — 2015. — Vol. 33(Suppl. 1). — P. 24–25.
10. Krutinin G.G., Krutinina E.A., Kamzolova S.G., Osypov A.A. Genetic and electrostatic maps of bacteriophage lambda genome // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. — 2015. — Vol. 33(Suppl. 1). — P. 18–19.
11. Krutinin G.G., Krutinina E.A., Kamzolova S.G., Osypov A.A. The dependency of promoter strength upon the electrostatic up-element in *E. coli* rrnB P1 promoter mutants // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. — 2015. — Vol. 33(Suppl. 1). — P. 24.

12. Osypov A.A., Kamzolova S.G. Compensatory evolution in response to a novel RNA polymerase: electrostatic properties of promoters may lead the adaptation in T7-T3 bacteriophages // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2015. – Vol. 33(Suppl. 1). – P. 22–23.
13. Osypov A.A., Kamzolova S.G. Electrostatic properties of T7-like phages promoters for host bacterial and native viral RNA polymerases // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2015. – Vol. 33(Suppl. 1). – P. 19–20.
14. Osypov A.A., Krutinin G.G., Kamzolova S.G. DEPPDB – DNA electrostatic potential properties database: electrostatic properties of genome DNA // *J. Bioinform. Comput. Biol.* – 2010. – Vol. 8(3). – P. 413–425.
15. Osypov A.A., Krutinin G.G., Krutinina E.A., Kamzolova S.G. DEPPDB – DNA electrostatic potential properties database: electrostatic properties of genome DNA elements // *J. Bioinform. Comput. Biol.* – 2012. – Vol. 10(2). – 1241004. doi: 10.1142/S0219720012410041.
16. Osypov A.A., Krutinin G.G., Krutinina E.A., Kamzolova S.G. Electrostatic properties of natural DNA palindromes – transcription factors binding sites and terminators // *FEBS Journal*. – 2014. – Vol. 281(Suppl. 1). – P. 681.
17. Polozov R.V. et al. Electrostatic potentials of DNA. Comparative analysis of promoter and nonpromoter nucleotide sequences // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1999. – Vol. 16(6). – P. 1135–1143.
18. Pruitt K., Brown G., Tatusova T., et al. The Reference Sequence (RefSeq) Database. 2002 Oct 9 [Updated 2012 Apr 6]. In: McEntyre J., Ostell J. (Eds.). *The NCBI Handbook* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002. Chapter 18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091>.
19. Sayers E.W., Barrett T., Benson D.A., Bryant S.H., Canese K., Chetvernin V., Church D.M., DiCuccio M., Edgar R., Federhen S., Feolo M., Geer L.Y., Helmberg W., Kapustin Y., Landsman D., Lipman D.J., Madden T.L., Maglott D.R., Miller V., Mizrachi I., Ostell J., Pruitt K.D., Schuler G.D., Sequeira E., Sherry S.T., Shumway M., Sirotkin K., Souvorov A., Starchenko G., Tatusova T.A., Wagner L., Yaschenko E., Ye J. Database resources of the National Center for Biotechnology Information // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37(Database issue). – D5–15.

USING THE DEPPDB DATABASE TOOLKIT TO STUDY THE ROLE OF ELECTROSTATICS IN THE REGULATION OF PROKARYOTIC TRANSCRIPTION

A.A. OSYPOV¹, E.A. KRUTININA², G.G. KRUTININ²,
P.M. BESKARAVAYNY², S.G. KAMZOLOVA²

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow;*

² *Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino, Moscow region*

DNA is a strongly negatively charged molecule, and its electrostatic, as well as other physical properties, determine interactions with proteins, including those that regulate transcription. The DEPPDB database toolkit provides access to information about the electrostatic and other physical properties of all complete sequenced genomes, along with their sequences, annotated biological and structural properties of functional elements and entire genomes. The database can serve as a basis for conducting fundamental research on the role of electrostatics and other physical properties of genomic DNA in transcription regulation.

Keywords: physical properties of DNA, electrostatics, prokaryotes, transcription regulation, biological databases.

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* 534 – ОСНОВЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПРОБИОТИКА СПОРОБАКТЕРИНА

И.А. МАЛАНИЧЕВА^{1,2*}, М.Х. КУБАНОВА², В.А. АЛФЕРОВА¹, В.А. КОРШУН¹,
И.В. ДРАБКИНА², Т.В. КРУПЕНИО², О.В. ЕФРЕМЕНКОВА¹, Н.И. ГАБРИЭЛЯН²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»,

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва

Исследована антибиотическая активность штамма *Bacillus subtilis* 534. Химический анализ продуктов биосинтеза штамма 534 показал наличие в культуральной среде не менее трех антибиотиков. Установлена активность культуральной жидкости штамма 534 и выделенных из нее сырцов этих антибиотиков в отношении клинических изолятов патогенных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью или панрезистентных: против 20 из 24 штаммов *Acinetobacter baumannii*, в том числе против 15 панрезистентных изолятов, против 19 из 21 штамма *Staphylococcus* spp., против 9 из 22 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, в том числе 3 панрезистентных, и против 37 из 39 патогенных грибов, в том числе 6 панрезистентных. В отношении ряда штаммов активность культуральной жидкости превосходила таковую каждой из выделенных фракций, что указывает на наличие большего числа образуемых антибиотиков и необходимость доработки метода выделения активных компонентов. Биосинтез антибиотиков штаммом 534 можно рассматривать как один из важных факторов, обуславливающих лечебное действие споробактерина.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов, антибиотики, антимикотики, *Bacillus subtilis* 534, пробиотики, споробактерин.

Введение

Проблема устойчивости современных патогенов к широкому спектру известных антибиотиков породила целый ряд исследовательских направлений по поиску альтернативных антимикробных средств [9, 10]. Одним из таких направлений, к которому относится представляемая работа, является применение пробиотиков [5, 6, 14]. Пробиотик споробактерин с 1992 года был рекомендован Министерством здравоохранения РФ (ВФС 42-371 ВС-92) для применения в клинической практике. Созданию этого препарата предшествовали разработки Никитенко В.И. с соавт. [4]. Препарат споробактерин показал хорошие результаты в медицинской практике [2, 7, 8].

Цель настоящей работы – изучение антимикробных свойств штамма *Bacillus subtilis* 534, основы транзиторного пробиотика споробактерина, а также выделение и идентификация антибиотических веществ этого штамма.

Материалы и методы

Штамм *B. subtilis* 534 выращивали на плотной и жидкой среде № 2 Гаузе.

Антибиотическую активность определяли методом диффузии в агар. Образцы культуральной жидкости (КЖ) капали в лунки диаметром 9 мм, а сырцы выделенных из нее веществ наносили на бумажные диски диаметром 6 мм.

Активность штамма 534 первично проверяли в отношении 12 коллекционных тест-штаммов: 10 бактерий (7 грамположительных и 3 грамотрицательных) и 2 грибов (перечень тест-штаммов представлен в таблице 1). Затем тестирование проводили в отношении клинических мульти- и панрезистентных патогенов, в том числе, по данным ВОЗ, представляющих особую опасность: *Acinetobacter baumannii* (24 образца), *Staphylococcus*

© 2017 г. Маланичева И.А., Кубанова М.Х., Алферова В.А., Коршун В.А., Драбкина И.В., Крупенио Т.В., Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И.

* **Автор для переписки:**

Маланичева Ирина Алексеевна

с.н.с., к.б.н.

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе

E-mail: malanicheva.irina@yandex.ru

spp. (21 образец), *Klebsiella pneumoniae* (22 образца) и грибы (39 образцов) [11–13].

Таблица 1

Антимикробный спектр и наивысший установленный уровень антибиотической активности культуральной жидкости (КЖ) штамма *B. subtilis* 534 и выделенных из нее сырцов компонентов 1–3 [1]

| Тест-штаммы | Зона задержки роста (мм) | | | |
|---|--------------------------|-------|-------|-------|
| | КЖ | 534-1 | 534-2 | 534-3 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> INA 00761 (MRSA) | 18–20 | 7–9 | 9 | 15 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P (MSSA) | 27–30 | 8–10 | следы | 16 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 10–12 | следы | 0 | 15 |
| <i>Bacillus mycoides</i> 537 | 16–18 | 10 | 0 | 7–11 |
| <i>Bacillus pumilus</i> NCTC 8241 | 22–24 | 10 | 14 | 16 |
| <i>Micrococcus luteus</i> NCTC 8340 | 23–25 | 0 | 15 | 17–18 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> VKPM B-4177 (VR) | 16–18 | 0 | 13 | 8–15 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 0 | 10–15 | 0 | 0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Comamonas terrigena</i> VKPM B-7571 | 0 | 0 | 0 | 12 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIA 259 | 13–14 | 13–14 | 0 | 0 |
| <i>Aspergillus niger</i> INA 00760 | 13–14 | 13–14 | 0 | 0 |

Примечание: MRSA — метициллинрезистентный золотистый стафилококк, MSSA — метициллинчувствительный золотистый стафилококк, VR — устойчивость к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина

Выделение, очистка и предварительная характеристика антибиотиков. Через колонку, заполненную 80 мл сорбента Amberlite XAD-2, пропускали 0,8 л культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 534. Антибиотик десорбировали смесью н-бутанол-ацетон-вода (1:1:1) при нейтральном значении pH. Полученные элюаты упаривали в вакууме досуха при 37 °С и сухой остаток растворяли в 60%-ном водном этаноле. Дальнейшую очистку антибиотика проводили в колонке, заполненной силикагелем Kieselgel 60 («Merck», Германия), используя ступенчатую элюцию растворителями хлороформ-метанол (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 и 5:5). Для выделения компонентов 1–3 фракции с колонки проверяли на биологическую активность в отношении тест-штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Saccharomyces cerevisiae*. Активные фракции упаривали досуха, растворяли в метаноле и анализировали методом тонкослойной хроматографии

(ТСХ) на пластинах с силикагелем в системах растворителей: 1) этилацетат-метанол (1:4) и 2) хлороформ-этанол (9:1) с последующей биоавтографией на газоне тест-штамма. Спектр УФ-поглощения определяли на спектрофотометре UV-1601 PC (Shimadzu, Япония).

Результаты и обсуждение

На первом этапе было установлено, что культуральная жидкость штамма 534 активна в отношении грамположительных бактерий, в том числе MRSA и VR, не действует на грамотрицательные бактерии и умеренно активна в отношении грибов (см. табл. 1). Химический анализ выявил, что штамм 534 образует не менее трех активных веществ, 534-1, 534-2 и 534-3, отличающихся по величине Rf — в системе растворителей (2), составляющей, соответственно, 0,76; 0,1 и 0,54. При выделении указанных соединений из культуральной жидкости, несмотря на их концентрирование, значительная часть активности исчезает, что, вероятно, свидетельствует об образовании большего количества активных веществ и о необходимости дальнейшего совершенствования методов выделения и очистки.

У компонента 534-1 была обнаружена активность в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli*: к тест-штамму *E. coli* ATCC 25922, а у компонента 534-3 — в отношении к грамотрицательной бактерии *Comamonas terrigena*: к тест-штамму *Comamonas terrigena* VKPM B-7571, которая отсутствовала у культуральной жидкости штамма 534. Это, по-видимому, является результатом концентрирования антибиотиков в ходе выделения и очистки, что позволило проявиться активностям в отношении двух из трех тест-штаммов грамотрицательных бактерий.

Далее в соответствии с полученным спектром действия активных веществ штамма 534 проверили в отношении ряда клинических патогенов — *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae* и грибов.

В экспериментах с 5 изолятами *A. baumannii* установлено, что в отношении используемых бактерий данного вида эффективен только компонент 534-1; поэтому дальнейшие испытания проводили именно с этим компонентом [3]. Всего исследовано 24 изолята *A. baumannii*, отличающихся по спектру устойчивости к 15 антибиотикам медицинского назначения: 2 изолята чувствительны только к тетрациклину (TE) и обладают промежуточной чувствительностью к меропенему (MEM), 1 изолят чувствителен к 7 антибиотикам и обладает промежуточной чувствительностью к 3 антибиотикам (PIP, GM, CRO); 16 изолятов панрезистентны, то есть устойчивы ко всем 15 антибиотикам. Из 16 панрезистентных изолятов *A. baumannii* 9 чувствительны

к компоненту 1 пробиотического штамма 534, 6 проявляют слабую чувствительность («следы») и только один изолят (4372) устойчив к компоненту 1. В общей сложности из 24

изолятов *A. baumannii* 20 штаммов с различной чувствительностью/устойчивостью к антибиотикам медицинского назначения чувствительны к компоненту 1 (табл. 2).

Таблица 2

Активность компонента 534-1 антибиотического комплекса пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534 в отношении клинических изолятов *Acinetobacter baumannii*

| Изоляты | Зоны подавления роста под действием компонента 534-1 (мм) | Чувствительность к 15 антибиотикам | | |
|---------|---|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| | | R | I | S |
| 1630 | 9 | 15 | 0 | 0 |
| 1839 | 9 | 14 | 1(SAM) | 0 |
| 2050 | 9 | 15 | 0 | 0 |
| 2455 | 8 | 15 | 0 | 0 |
| 2617 | 12 | 15 | 0 | 0 |
| 3037 | 10 | 14 | 1(GM) | 0 |
| 3050 | 0 | 13 | 2(GM, PIP) | 0 |
| 3122 | 7 | 15 | 0 | 0 |
| 3164 | 0 | 13 | 2(GM, LVX) | 0 |
| 3166 | 7 | 15 | 0 | 0 |
| 3208 | 8 | 15 | 0 | 0 |
| 3238 | 7 | 12 | 3(GM, FEP, SAM) | 0 |
| 3255 | следы | 15 | 0 | 0 |
| 3275 | следы | 3 | 5(PIP, GM, CRO) | 7(AN, FEP, SAM, CIP, LVX, MEM, NN) |
| 3613 | следы | 15 | 0 | 0 |
| 4006 | следы | 15 | 0 | 0 |
| 4066 | следы | 15 | 0 | 0 |
| 4074 | следы | 15 | 0 | 0 |
| 4165 | 9 | 12 | 1(MEM) | 1(Te) |
| 4200 | следы | 15 | 0 | 0 |
| 4315 | следы | 15 | 0 | 0 |
| 4354 | 8 | 15 | 0 | 0 |
| 4372 | 0 | 15 | 0 | 0 |
| 4374 | 0 | 13 | 1(MEM) | 1(Te) |

Примечание: амикацин (AN), ампициллин/сульбактам (SAM), гентамицин (GM), имипенем (IPM), левофлоксацин (LVX), меропенем (MEM), пиперациллин (PIP), тетрациклин (TE), тобрамицин (NN), триметоприм/сульфаметоксазол (SXT), цефепим (FEP), цефотаксим (CTX), цефтазидим (CAZ), цефтриаксон (CRO), ципрофлоксацин (CIP); R — устойчивость, I — промежуточная чувствительность, S — чувствительность; «следы» — толщина кольца зоны задержки роста вокруг диска с испытуемым на антибиотическую активность образцом не превышает 1 мм

Из 21 клинического изолята стафилококков только 2 (*S. hominis* sbsp. *hominis* 4361 и *S. xylosus* 1298) были нечувствительны к антибиотическому воздействию соединений, образуемых штаммом 534. Компоненты 534-1 и 534-2 проявляли эффективность в отношении 1 штамма каждый: *S. epidermidis* 2624 (следы активности) и *S. epidermidis* 1306, соответственно. Компонент 534-3 в разной степени подавлял рост 19 из 21 изолята: от зон полного подавления роста диаметром 12 мм до указанных в скобках зон угнетения роста стафилококков (табл. 3).

Была исследована чувствительность 22 клинических изолятов *K. pneumoniae* к современным антибиотикам медицинского назначения (табл. 4). Установлено, что из 22 штаммов 19 полирезистентны, а именно: устойчивы не менее чем к 14 антибиотикам, и 3 штамма панрезистентны (1074, 1878 и 2080). КЖ штамма 534

практически не проявили активности. Из трех выделенных из КЖ и сконцентрированных соединений антибиотическая активность отмечена у компонента 534-1: 9 штаммов проявили чувствительность от следовой (6 образцов, включая 2 панрезистентных) до зон подавления роста диаметром 7–11 мм (образцы 821, 1114 и панрезистентный образец 1878). Компонент 534-2 не обладает активностью в отношении *K. pneumoniae*, компонент 534-3 обнаруживает следовую активность в отношении панрезистентного образца 2080.

Помимо антибактериальной активности, штамм *Bacillus subtilis* 534 обладает активностью в отношении микопатогенов. Исследовано 34 клинических изолята патогенных грибков семи видов рода *Candida*, среди которых 6 панрезистентных, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* sp., а также 5 изолятов патогенной водо-

росли *Prototheca* sp., для элиминации которой применяют антимикотики. Из таблицы 5 следует, что КЖ штамма 534 проявляет весьма эффективное антимикотическое действие, в том числе в отношении штаммов с мно-

жественной лекарственной устойчивостью. В общей сложности только 2 штамма из 39 (*S. albicans* 1610 и 2122) нечувствительны к действию активных веществ штамма 534.

Таблица 3

Активность культуральной жидкости (КЖ) штамма *Bacillus subtilis* 534 и выделенных из нее трех компонентов 534-1, 534-2 и 534-3 антибиотического комплекса в отношении клинических изолятов *Staphylococcus* spp.

| Вид, штамм | Зоны подавления роста (мм) | | | | Чувствительность к 20–22 медицинским антибиотикам | | | |
|---|----------------------------|-------|-------|--------|---|---|----|---|
| | КЖ | 534-1 | 534-2 | 534-3 | R | I | S | Подробно |
| <i>S. aureus</i> 2476 | 0 | 0 | 0 | 10 | 3 | 0 | 18 | 3R: P, AM, LVX |
| <i>S. capitis</i> sbsp. <i>urealyticus</i> 1133 | 17 | 0 | 0 | (10) | 2 | 0 | 20 | 2R: P, AM |
| <i>S. epidermidis</i> 2480 | 0 | 0 | 0 | (12) | 16 | 0 | 6 | 6S: DAP, E, RA, SYN, TE, VA |
| <i>S. epidermidis</i> 2432 | 0 | 0 | 0 | 10 | 16 | 0 | 6 | 6S: DAP, E, RA, SYN, TE, VA |
| <i>S. epidermidis</i> 2624 | 25 | следы | 0 | 10 | 15 | 0 | 5 | 5S: DAP, LZD, RA, SYN, VA |
| <i>S. epidermidis</i> 2688 | 0 | 0 | 0 | 11 | 16 | 0 | 4 | 4S: DAP, RA, TE, VA |
| <i>S. epidermidis</i> 4313 | - | 0 | 0 | 12 | 16 | 0 | 6 | 6S: DAP, E, RA, SYN, TE, VA |
| <i>S. epidermidis</i> 4314 | - | 0 | 0 | 11 | 15 | 0 | 7 | 7S: DAP, E, RA, SYN, TE, SXT, VA |
| <i>S. epidermidis</i> 4137 | - | 0 | 0 | (8) | 14 | 1 | 7 | 7S: DAP, GM, LZD, RA, SYN, TE, VA 1I: MXF |
| <i>S. epidermidis</i> 1217 | (17) | 0 | 0 | (10) | 11 | 1 | 10 | 10S: C, CC, DAP, LZD, OX, RA, SYN, TE, SXT, VA 1I: MXF |
| <i>S. epidermidis</i> 1259 | 0 | 0 | 0 | 10 | 12 | 0 | 10 | 10S: C, CC, DAP, LZD, MXF, RA, SYN, TE, SXT, VA |
| <i>S. epidermidis</i> 1306 | 0 | 0 | 7 | (10) | 6 | 0 | 16 | 6R: AM, E, LVX, P, TE, SXT |
| <i>S. epidermidis</i> 1319 | 0 | 0 | 0 | 13 | 3 | 1 | 18 | 3R: AM, E, P 1I: C |
| <i>S. epidermidis</i> 1401 | 0 | 0 | 0 | (14) | 14 | 1 | 7 | 7S: C, CC, DAP, LZD, RA, SYN, VA 1I: MXF |
| <i>S. epidermidis</i> 1109 | 0 | 0 | 0 | 12 | 11 | 0 | 10 | 10S: C, CC, DAP, LZD, MOX, RA, SYN, TE, SXT, VA |
| <i>S. haemolyticus</i> 4126 | 0 | 0 | 0 | (11) | 17 | 0 | 5 | 5S: DAP, RA, SYN, SXT, VA |
| <i>S. hominis</i> sbsp. <i>hominis</i> 4296 | - | 0 | 0 | 10 | 13 | 1 | 8 | 8S: CC, DAP, GM, LZD, RA, SYN, TE, VA 1I: MOX |
| <i>S. hominis</i> sbsp. <i>hominis</i> 4361 | - | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 4 | 4S: DAP, RA, SYN, VA |
| <i>S. hominis</i> sbsp. <i>hominis</i> 4444 | - | 0 | 0 | 8 (11) | 14 | 1 | 7 | 7S: C, CC, DAP, LZD, RA, SYN, VA, 1I: GM |
| <i>S. hominis</i> sbsp. <i>novobiosepticus</i> 4221 | 0 | 0 | 0 | (10) | 14 | 0 | 8 | 8S: SAM, DAP, MOX, OX, RA, SYN, SXT, VA |
| <i>S. xylosus</i> 1298 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 6 | 6S: C, GM, LVX, MOX, TE, SXT |

Примечание: ампициллин (AM), ванкомицин (VA), даптомицин (DAP), клиндамицин (CC), линезолид (LZD), моксифлоксацин (MOX), оксациллин (OX), пенициллин (P), рифампин (RA), синергид (SYN), хлорамфеникол (C), эритромицин (E); ранее упомянутые антибиотики, другие сокращения и обозначения — в примечании к табл. 2; () — угнетение роста

Активность культуральной жидкости (КЖ) штамма *B. subtilis* 534 и выделенных из нее компонентов 534-1, 534-2 и 534-3 антибиотического комплекса в отношении клинических изолятов *K. pneumoniae*

| Штамм | Зоны подавления роста (мм) | | | | Чувствительность к 24–28 медицинским антибиотикам | | | |
|-------|----------------------------|-------|-------|-------|---|---|----|--|
| | КЖ | 534-1 | 534-2 | 534-3 | R | I | S | Подробно |
| 320 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 1 | 6 | 6S: FOX, IPM, MEM, TGC, PMB, CL 1I: TE |
| 634 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 1 | 8 | 8S: AN, FOX, IPM, MEM, LVX, TGC, PMB, CL 1I: CIP |
| 692 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 1 | 7 | 7S: AN, FOX, ETP, IPM, MEM, PMB, CL 1I: TGC |
| 775 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 1 | 9 | 9S: AN, GM, IPM, MEM, TE, TGC, SXT, PMB, CL 1I: FOX |
| 821 | 0 | 11 | 0 | 0 | 23 | 0 | 3 | 3S: TGC, PMB, CL |
| 1050 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 2 | 5 | 5S: AN, GM, IPM, PMB, CL 2I: TGC, NN |
| 1054 | 0 | (11) | 0 | 0 | 19 | 1 | 4 | 4S: FOX, IPM, MEM, TGC 1I: LVX |
| 1071 | 0 | (9) | 0 | 0 | 20 | 0 | 4 | 4S: ATM, FEP, CAZ, CRO |
| 1074 | 0 | (11) | 0 | 0 | 23 | 3 | 0 | 3I: PIP/TAZ, PMB, CL |
| 1114 | следы | 7 | 0 | 0 | 20 | 2 | 4 | 4S: AN, GM, PMB, CL 2I: TGC, NN |
| 1878 | 0 | 8 | 0 | 0 | 23 | 1 | 0 | 1I: TGC |
| 2080 | следы | следы | 0 | следы | 23 | 1 | 0 | 1I: TGC |
| 2266 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 3 | 3S: CAZ, TGC, PMB |
| 2427 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 2 | 2S: TGC, PMB |
| 2663 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 2 | 2S: TGC, PMB |
| 3168 | - | (9) | 0 | 0 | 22 | 1 | 3 | 3S: TGC, PMB, CL 1I: TE |
| 3186 | - | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 3 | 3S: TGC, PMB, CL |
| 3266 | - | 0 | 0 | 0 | 22 | 0 | 4 | 4S: CIP, LVX, PMB, CL |
| 4095 | - | (8) | 0 | 0 | 23 | 1 | 2 | 2S: PMB, CL 1I: TGC |
| 4261 | - | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 7 | 7S: ATM, FEP, CAZ, CIP, LVX, PMB, CL |
| 4353 | - | 0 | 0 | 0 | 14 | 1 | 11 | 11S: ATM, FEP, CTX, CAZ, CRO, IPM, MEM, CIP, LVX, PMB, CL 1I: TGC |
| 4375 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 0 | 8 | 8S: AN, ETP, GM, IPM, MEM, TGC, PMB, CL |

Примечание: азтреонам (АТМ), колистин (СL), пиперацillin/тазобактам (PIP/TAZ), полимиксин В (PMB), тигециклин (TGC), эртапенем (ETP); ранее упомянутые антибиотики, другие сокращения и обозначения — в примечаниях к таблицам 2 и 3

Антимикотическая активность культуральной жидкости штамма *Bacillus subtilis* 534 и выделенных из нее компонентов 534-1, 534-2 и 534-3

| Вид, штамм | Зоны подавления роста (мм) | | | | Чувствительность к антимикотикам | | | | | |
|----------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|----------------------------------|--------------|------------------|-----------------|-----|-----|
| | КЖ | 534-1 | 534-2 | 534-3 | пиримидин 5 FC | полиен AB | имидазолы MCZ | триазолы KET | ITR | FLU |
| <i>Candida albicans</i> 58 | 18 | 0 | 0 | 0 | S | R | R | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 182 | 19 | 0 | 0 | 0 | S | S | S | S | S | S |
| <i>C. albicans</i> 265 | 29 | 0 | 8 | 0 | S | R | S | S | I | S |
| <i>C. albicans</i> 317 | 20 | 0 | 0 | 0 | S | S | R | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 456 | 23 | 0 | 0 | 0 | S | R | I | I | I | S |
| <i>C. albicans</i> 458 | 17 | 7 | 0 | 0 | S | R | R | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 848 | 28 | 0 | 0 | 0 | S | R | R | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 922 | 24 | 0 | 0 | 0 | S | I | R | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 1187 | 19 | 0 | 0 | 0 | S | I | I | S | I | S |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|----|-------|---|-------|---|---|---|---|---|---|
| <i>C. albicans</i> 1294 | 31 | 0 | 0 | 0 | S | R | R | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 1610 | 0 | 0 | 0 | 0 | S | S | R | I | S | S |
| <i>C. albicans</i> 1815 | 36 | 10 | 0 | 0 | S | R | I | S | I | S |
| <i>C. albicans</i> 2122 | 0 | 0 | 0 | 0 | S | S | I | I | I | I |
| <i>C. albicans</i> 2356 | 12 | 0 | 0 | 0 | R | R | R | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 4166 | 25 | 7 | 0 | 0 | R | I | R | R | I | R |
| <i>C. albicans</i> 4244 | 25 | 0 | 0 | 0 | R | R | R | R | I | R |
| <i>C. albicans</i> 4438 | 24 | 0 | 0 | 0 | R | S | I | S | I | R |
| <i>C. albicans</i> 4895 | 24 | 0 | 0 | 0 | S | R | I | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 4897 | 24 | 0 | 0 | 0 | S | S | S | I | R | R |
| <i>C. albicans</i> 5228 | 14 | 8 | 0 | 0 | R | R | I | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 5721 | 24 | 0 | 0 | 0 | S | R | I | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 5963 | 18 | 7 | 0 | 0 | I | R | R | R | R | R |
| <i>C. albicans</i> 6107 | 17 | 0 | 0 | 0 | R | R | R | I | R | S |
| <i>C. catenulata</i> 1507 | 0 | 7 | 0 | 0 | R | I | I | I | I | R |
| <i>C. catenulata</i> 6093 | 0 | 8 | 0 | 12 | S | R | I | I | R | I |
| <i>C. glabrata</i> 13 | 0 | 7 | 0 | 11 | S | R | I | I | I | I |
| <i>C. glabrata</i> 212 | 18 | 9 | 8 | 11 | S | R | R | R | R | R |
| <i>C. krusei</i> 247 | 0 | 8 | 0 | 0 | S | S | R | S | I | S |
| <i>C. lusitanae</i> 5254 | 22 | 0 | 0 | 0 | S | R | I | S | I | S |
| <i>C. parapsilosis</i> 1380 | 0 | 7 | 0 | 0 | R | S | S | S | I | S |
| <i>C. tropicalis</i> 455 | 0 | 8 | 0 | 0 | S | R | R | R | R | R |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> 25 | 0 | 7 | 0 | 12 | S | R | I | I | R | I |
| <i>Cr. neoformans</i> 245 | 25 | 0 | 0 | 9 | R | R | S | I | I | I |
| <i>Prototheca</i> sp. 110 | 27 | 0 | 0 | 0 | S | R | R | R | R | R |
| <i>Prototheca</i> sp. 1376 | 0 | следы | 0 | следы | R | S | S | S | I | S |
| <i>Prototheca</i> sp. 2109 | 0 | следы | 0 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Prototheca</i> sp. 6017 | 0 | 7 | 0 | 10 | S | R | I | R | R | I |
| <i>Prototheca</i> sp. 6047 | 24 | 0 | 0 | 0 | S | R | R | R | R | R |
| <i>Trichosporon</i> sp. БМ1.5 | 24 | 0 | 0 | 13 | I | S | I | I | I | S |

Примечание: 5 FC – =5' флуцитозин, АВ – амфотерицин В, МСЗ – миконазол, КЕТ – кетоконазол, ИТР – итраконазол, FLU – флуконазол; другие сокращения и обозначения – в примечании к таблице 2

Заключение

Одним из механизмов эффективности лекарственного препарата споробактерина, предположительно, является способность пробиотического штамма *B. subtilis* 534 образовывать антибиотики. На примере тест-штаммов, а также клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью показано, что соединения 1–3 штамма 534 представляют собой антибиотики и во многих случаях способны преодолевать лекарственную устойчивость микроорганизмов. В отношении многих штаммов активность культуральной жидкости штамма *B. subtilis* 534 превосходит таковую каждой из фракций, что предположительно свидетельствует о большем числе образуемых антибиотиков и указывает на необходимость доработки метода выделения активных компонентов. Выделенные антибиотические соединения 1–3 отличаются по антимикробному спектру (см. табл. 1–5) – компонент 534-1 преимущественно проявляет активность в отношении штаммов *A. baumannii*, а компонент 534-3 – в отношении штаммов *Staphylococcus* spp. Культуральная жидкость штамма *B. subtilis* 534 проявляет высокую эффективность в отношении патогенных грибов и патогенной водоросли *Prototheca* sp.

Ранее нами было показано, что транзиторийный пробиотический препарат споробактерин, представляющий собой суспензию спор штамма *B. subtilis* 534 в 7% растворе хлорида натрия, не обладает антибиотическим действием. Однако нельзя исключать, что за время прохождения через кишечник, составляющее 8–10 суток, штамм 534 образует активные соединения, обуславливающие антимикробное действие препарата. Ценным преимуществом антибиотиков штамма 534 служит их способность преодолевать поли- и панрезистентность патогенных микроорганизмов, проявляемую в отношении всех основных современных медицинских антибиотиков. Применение споробактерина нетоксично и необременительно для пациентов, но может быть эффективным. Также целесообразно продолжить дальнейшее химическое изучение и клиническое испытание образуемых антибиотических соединений с перспективой их применения в качестве медицинских антибиотиков.

Литература

1. Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Крупенин Т.В., Зенкова В.А., Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Сумарукова И.Г., Ефременкова О.В., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С. Оценка антимикробной активности бациллярного пробиотика *Bacillus subtilis* (штамм 534) // Эпидеми-

- ология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2016. – № 1. – С. 41–47.
2. Габриэлян Н.И., Давыдов Д.С., Горская Е.М. Использование споробактерина в послеоперационном периоде у пациентов кардиохирургического профиля. Антагонизм *in vitro* споробактерина в отношении нозокомиальных штаммов бактерий // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2008. – Т. 10. – № 6 – С. 12–18.
 3. Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И., Маланичева И.А., Ефименко Т.А., Терехова Л.П., Удалова В.В., Глухова А.А., Рогожин Е.А., Алферова В.А., Коршун В.А., Кубанова М.Х., Драбкина И.В., Крупенио Т.В. Антибиотическая активность пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534 в отношении клинических изолятов *Acinetobacter baumannii* // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т. 61. – № 9–10. – С. 3–7.
 4. Никитенко В.И., Полякова В.С., Никитенко М.В. Препарат споробактерин. Новые данные о механизме действия этого и других живых бактериальных препаратов // Научный вестник Тюменской медицинской академии. – 2001. – № 2. – С. 70–72.
 5. Похиленко В.Д., Перелыгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3 (32–33). – С. 20–41.
 6. Савустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* // Актуальная инфектология. – 2016. – Т. 2. – № 11. – С. 35–44.
 7. Сорокина В.О., Минасов Б.Ш., Попова О.В., Попов О.С. Применение споробактерина в лечении пациентов с ожоговыми ранами // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т. 8. – № 6. – С. 106–108.
 8. Третьяков А.А., Стадников А.А., Вальшев А.В. Клинико-экспериментальное обоснование применения споробактерина в комплексной терапии при механической желтухе // Анналы травматологии и ортопедии. – 2001. – № 2. – С. 42–48.
 9. Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013 // The Journal of Antibiotics. – 2013. – Vol. 66(10). – P. 571–591.
 10. Butler M.S., Blaskovich M.A.T., Cooper M.A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015 // The Journal of Antibiotics. – 2017. – Vol. 70(1). – P. 3–24.
 11. <http://beam-alliance.eu>.
 12. <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
 13. <https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/medical-conditions/B#>.
 14. Sanders M.E., Morelli L., and Tompkins T.A. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus* // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2003. – Vol. 2(3). – P. 101–110.

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF *BACILLUS SUBTILIS* 534 STRAIN – THE BASE OF PROBIOTIC DRUG SPOROBACTERIN

I.A. MALANICHEVA^{1,2}, M.Kh. KUBANOVA², V.A. ALFEROVA¹, V.A. KORSHUN¹, I.V. DRABKINA², T.V. KRUPENIO², O.V. EFREMENKOVA¹, N.I. GABRIELIAN²

¹G.F. Gause Research Institute of New Antibiotics,

²Academician V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

The antibiotic activity of the *Bacillus subtilis* 534 strain was investigated. Chemical analysis of the biosynthesis products of strain 534 showed the presence of at least three antibiotics in its cultural medium. The activity of the cultural medium of strain 534 and antibiotic samples obtained from it was established against clinical isolates of pathogenic microorganisms with multiple drug resistance or panresistance. The growth of 20 of the 24 isolates of *Acinetobacter baumannii*, including 15 panresistant ones, 19 of the 21 isolates of *Staphylococcus* spp., 9 of the 22 isolates of *Klebsiella pneumoniae*, including 3 panresistant ones, and 37 of the 39 pathogenic fungi, including 6 panresistant fungi, was suppressed. In a number of cases, the activity of the cultural medium of strain *Bacillus subtilis* 534 exceeds the activity of isolated antibiotic specimens, which indicated the presence of a larger number of formed antibiotics and the need for an improvement in the protocol for the extraction of antibiotics. The biosynthesis of antibiotics by the strain 534 can be considered as one of the important causes of the therapeutic effect of probiotic drug Sporobacterin.

Keywords: antibiotic resistance of pathogenic microbes, antibiotics, antimycotics, *Bacillus subtilis* 534, probiotics, Sporobacterin.

КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ АЛЛОГЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА, КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ И КОЛЛАГЕНА

В.В. РЕВИН¹, Н.А. КЛЕНОВА^{1*}, Е.В. ПИСАРЕВА¹, М.Ю. ВЛАСОВ², Н.А. РЕДЬКИН¹,
З.П. БЕЛОУСОВА¹, К.Н. ТУКМАКОВ¹, Ю.А. МАРКОВА¹, Э.Ю. СОСОВА¹,
Ю.В. ЗУБКОВА¹, М.А. ДАНИЭЛЬ¹, Е.Г. ЛИТВИНОВА³

¹ ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева»,

² ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», Самара;

³ ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пущино

В статье описываются новый метод получения и свойства биоорганических композитов на основе бактериальной целлюлозы, продуцируемой *Glucanacetobacter sucrofermentans B-11267*, с использованием в качестве добавок компонентов костной и хрящевой тканей: гидроксиапатита и коллагена, также полученных авторами. Композиты могут быть произведены в виде пленок и лиофилизатов. Приводятся данные анализа состава гидроксиапатита и композитов, микроструктуры композитов и рассматриваются возможности их применения в качестве основы зубной пасты или материала для восстановления костной ткани.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксиапатит, коллаген, композиты.

Введение

Композиты на основе бактериальной целлюлозы имеют право на будущее, так как свойства данного экзополисахарида — механическая прочность, биосовместимость, малая аллергенность — представляют чрезвычайное значение для медицинского применения. Однако при потере воды пленки бактериальной целлюлозы быстро теряют эластичность, а высушивание их до постоянной массы часто сопровождается появлением хрупкости. При погружении ее в водную среду свойства первичной гель-пленки возвращаются. Создание различных композиционных материалов, в которых бактериальная целлюлоза присутствует в виде основы, позволит в будущем создать биоматериалы с различными свойствами [3, 11, 12]. Известно, что добавление гидроксиапатита (ГАП) в культуральную среду сопровождается включением его в волокна целлюлозы [13], а использование

в этом качестве белка соединительной ткани коллагена, возможно, позволит сохранить эластичность композита.

В настоящий момент используют разные подходы к получению композитов на основе бактериальной целлюлозы: химическая модификация пленок; физические методы пропитки гелей и пленок различными соединениями. Одним из способов является непосредственное добавление в среду новых составных частей будущих композитов с целью получения материалов с нужными свойствами.

Целью работы стало получение композитов на основе бактериальной целлюлозы, аллогенного гидроксиапатита и коллагена, а также исследование их свойств.

Материалы и методы

Получение гидроксиапатита

Аллогенный гидроксиапатит получали согласно оригинальной методике, разработанной в ИЭМБ Самарского государственного медицинского университета (СамГМУ). С помощью данного метода можно получить как деминерализованный костный матрикс, так и гидроксиапатит естественного происхождения путем осаждения минерального компонента из раствора [4, 5]. Были получены и использованы для добавления в композиты с бактериальной целлюлозой гидроксиапатит из компактной и губчатой костной ткани свиньи и коровы. Для изучения микроструктуры порошков ГАП и соотношения элементов использовали аналитический рас-

© 2017 г. Ревин В.В., Кленова Н.А., Писарева Е.В., Власов М.Ю., Редькин Н.А., Белоусова З.П., Тукмаков К.Н., Маркова Ю.А., Сосова Э.Ю., Зубкова Ю.В., Даниэль М.А., Литвинова Е.Г.

* Автор для переписки:

Кленова Наталья Анатольевна

д.б.н., профессор

Самарский национальный исследовательский университет им. С.П.

Королева, Самара

E-mail: klenova.ssu@yandex.ru

тровый электронный микроскоп «JEOL JSM-6390A» (Япония). Микроскоп позволяет с высокой точностью определить микроструктуру и состав порошков ГАП. Размер частиц ГАП определяли на сканирующем зондовом микроскопе «Solver PRO-M» (Россия) на пористом кремнии. Измерения проводились атомно-силовой микроскопией. Используемая методика позволяет получить трехмерное изображение исследуемой поверхности и построить ее профилограмму с разрешением до 10 нм. Фазовый состав ГАП изучали на порошковом рентгеновском дифрактометре ARL X'tra-138 (Thermo Scientific, Великобритания).

Качественный состав образцов определяли с использованием энергодисперсионного рентгено-флуоресцентного анализатора «БРА-18», количественный анализ — с применением классических аналитических методов и атомно-адсорбционного анализа («Varian» SpectrAA 200, гидридная приставка VGA 77).

Получение гель-пленок бактериальной целлюлозы и БЦ-ГАП-гелей

Для получения гель-пленок и гелей бактериальной целлюлозы использовали штамм *Gluconacetobacter sucrofermentans* В-11267, любезно представленный нам сотрудниками кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии Мордовского национального исследовательского университета им. Н.А. Огарева. Среда культивации для получения гелей содержала 1% D-глюкозы, 1,5% пептона, 0,8% дрожжевого экстракта, 0,3% ледяной уксусной кислоты, рН 3,5 доводили с помощью соляной кислоты. Условия автоклавирования: 121 °С, 20 минут. После остывания в среду добавляли 0,5% этилового спирта [13]. Выращивали при 30 °С и перемешивании в шейкере при 200 об/мин в течение 5 суток. Полученные гели отмывали деионизированной водой, затем помещали в 1,0 М раствор NaOH, выдерживали при 70 °С в течение 90 минут и вновь отмывали деионизированной водой до нейтральной реакции. Лиофилизаты получали, высушивая гели в установке Vaco 2-11, Zirbus technology (Германия).

Для получения гель-пленок использовали среду NS: г/л: D-глюкоза — 20,0; дрожжевой экстракт — 5,0; пептон — 5,0; Na₂HPO₄ — 2,7; лимонная кислота — 1,15; рН 6,0. Условия автоклавирования: 121 °С, 20 минут. Полученную пленку обрабатывали 0,1 Н раствором NaOH при 80 °С в течение 30 минут для удаления клеток и компонентов культуральной жидкости, затем отмывали дистиллированной водой, 0,5%-ным раствором уксусной кислоты и снова водой до нейтральной реакции. Высушивали в сушильном шкафу при 80 °С до постоянной массы [9].

Для получения новых композитов в среду добавляли 1% гидроксиапатита — БЦ+ГАП; 0,5% коллагена — БЦ+Коллаген; 1% гидроксиапатита и 0,5% коллагена — БЦ+ГАП+Коллаген.

Методика получения и очистки коллагена

Коллаген выделяли из хвостовых сухожилий крыс Wistar возрастом до года. Сухожилия препарировали как описано в [10], помещали в чашки Петри с дистиллированной водой и с помощью пинцетов разделяли на тонкие волокна. Волокна помещали в 0,1%-ный раствор уксусной кислоты (около 8 частей w/v), экстрагировали в течение 3–5 суток при 4 °С без перемешивания, центрифугировали 40 минут при 3000 об/мин. Диализовали против нескольких смен 8–10-кратного объема дистиллированной воды 2–5 суток до значений рН 5–5,5. Полученный раствор разливали в чашки Петри слоем около 5 мм и лиофилизировали на установке ЛС-500 (ФГБУН «Институт биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук», Пушкино). Полученные препараты хранили при комнатной температуре.

Методы изучения состава, структуры полученных композиционных материалов

Полученные пленки и лиофилизаты исследовали на ИК-Фурье спектрометре SPECTRUM 100 фирмы PerkinElmer с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) фирмы Pike. Образцы помещались на кристалл приставки НПВО в исходном виде. Запись спектров проводили в интервале частот 550–4000 см⁻¹. При необходимости также использовали спектры, записанные в таблетке из бромиды калия. Для этого с поверхности пленки стирали бромидом калия некоторое количество пробы, переносили смесь в агатовую ступку, перетирали до однородной массы, а затем прессовали таблетку и записывали ИК-спектр в интервале частот 400–4000 см⁻¹.

Микрофотографии полученных высушенных композитов получали, используя растровый сканирующий электронный микроскоп FEI Quanta 200 в режиме высокого вакуума при токе зонда не более 12 пА (ускоряющее напряжение 30 кВ). При этом не требовалось нанесение проводящего покрытия на образцы.

Результаты и обсуждение

Свойства полученного гидроксиапатита

ГАП, выделенный из костной ткани коровы и свиньи, помимо двух основных компонентов — Ca²⁺ и неорганического фосфата — содержал такие микроэле-

менты, как магний и железо. С помощью качественного анализа было выявлено наличие Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} .

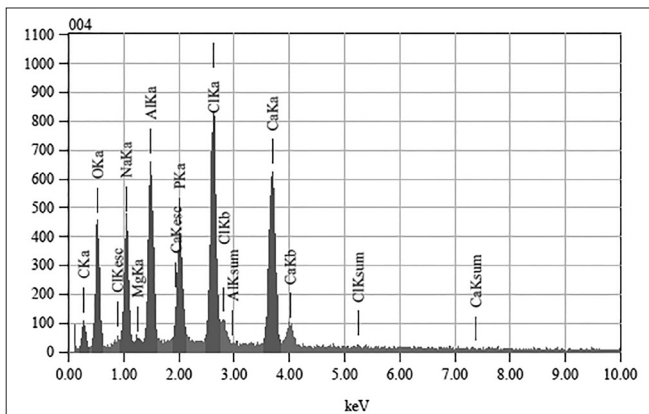


Рис. 1. Данные энергодисперсионного анализа гидроксиапатита компактной костной ткани коровы (*Bos taurus taurus*) (сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM-6390A в комплексе с рентгеновским спектрометром)

Путем энергодисперсионного анализа установлено атомарное соотношение Ca/P в образцах биоматериала. Наибольшая концентрация фосфата отмечена в ГАП из компактной костной ткани коровы (рис.1). При этом соотношение Ca/P колебалось от 1,34 до 2,00. В образцах ГАП, полученных из костной ткани свиньи, соотношение Ca/P колебалось в пределах от 1,23 до 1,85.

Магний и железо присутствуют в ГАП, выделенном из костей свиньи, в меньших количествах, чем в образцах, полученных из костной ткани коровы.

Данные состава образцов, полученные с помощью атомно-адсорбционного анализа [6, 7], свидетельствуют о наличии в биоматериалах макро- и микро элементов (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , F^- , Al^{3+} , Na^+ , Cl^- и др.) в соотношениях, близких к составу минерального компонента кости и согласуются с результатами исследований состава нативной кости животных [1]. Достаточно высокое содержание хлора можно объяснить технологическими особенностями получения ГАП по данной методике, когда в ходе реакции его осаждения гидроокисью натрия из солянокислого раствора образуется хлорид натрия, основная часть которого отмывается дистиллированной водой в ходе дальнейшей обработки.

Микроструктура поверхности ГАП компактной костной ткани коровы и свиньи представлена на рисунке 2. На сканограмме видны одиночные оскольчатые кристаллы и конгломераты кристаллов. В результате рентгеновского анализа на порошковом дифрактометре «ARL X'tra-138» установлено, что фазовый состав исследуемых образцов соответствует кристаллической решетке гидроксиапатита. Также было подтверждено присутствие хлорида натрия в незначительных количествах (рис. 3).

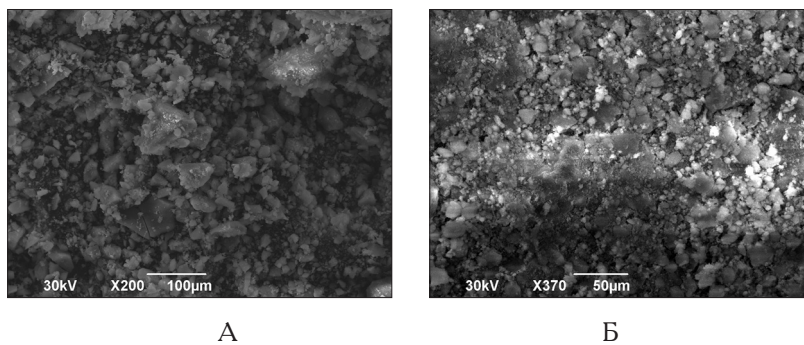


Рис. 2. Микроструктура поверхности гидроксиапатита компактной костной ткани коровы (А) и свиньи (Б) по данным растрового электронного микроскопа «JEOL-6390A»

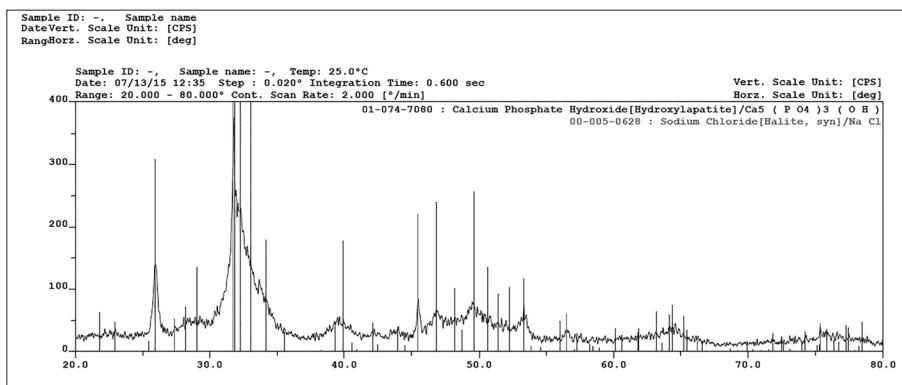


Рис. 3. Дифрактограмма порошка гидроксиапатита, полученного из костной ткани коровы

Для измельчения кристаллов ГАП была предложена ультразвуковая гомогенизация суспензии биоматериалов [5]. Определение размеров частиц гидроксиапатита проводили с использованием подложки из пористого кремния. Суть метода заключается в том, что исходная поверхность пористого кремния содержит поры с диаметром в десятые доли микрометра. В такие поры осаждаются из суспензии и хорошо удерживаются на поверхности пористого кремния частицы ГАП с диаметром 0,1–0,5 мкм и менее. На сканирующем зондовом микроскопе «Solver PRO-M» были получены изображения исследуемых поверхностей.

На рисунке 4 приведены микрофотографии осажденного на стекле порошка гидроксиапатита до и после гомогенизации ультразвуком.

Видно, что ультразвук эффективно измельчает порошок гидроксиапатита и гомогенизирует суспензию, так что максимальный размер частиц не превышает нескольких микрон. Тем не менее в суспензии все же присутствуют, хоть и в небольшом количестве, более крупные частицы диаметром более 10 мкм.

Таким образом, полученный после гомогенизации ГАП на 60–70% состоит из частиц размером не более 100 нм, что было выявлено метрологическими методами при осаждении гидроксиапатита на поверхность пористого кремния.

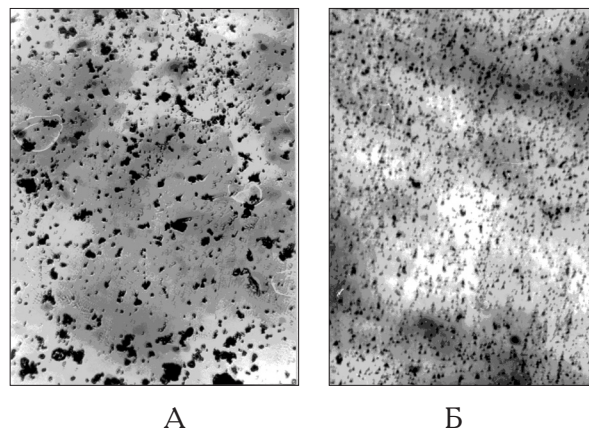


Рис. 4. Микрофотографии осажденного на стекле порошка ГАП до (А) и после (Б) гомогенизации ультразвуком

На рисунке 4а представлены ИК-спектры ГАП, полученные из костей коровы и свиньи после гомогенизации ультразвуком. ИК-спектры ГАП, полученные из костей различных животных, совпадают. На них хорошо различимы частоты колебаний гидроксильных групп (в областях 3000–3600 и 1550–1700 см⁻¹) фосфат-ионов (1027, 961, 602, 563 см⁻¹), совпадающие с частотами, приведенными в работе [8], а также карбонат-ионов (1415–1420 и 873 см⁻¹), осаждение которых сопровождается образованием фосфатов [2].

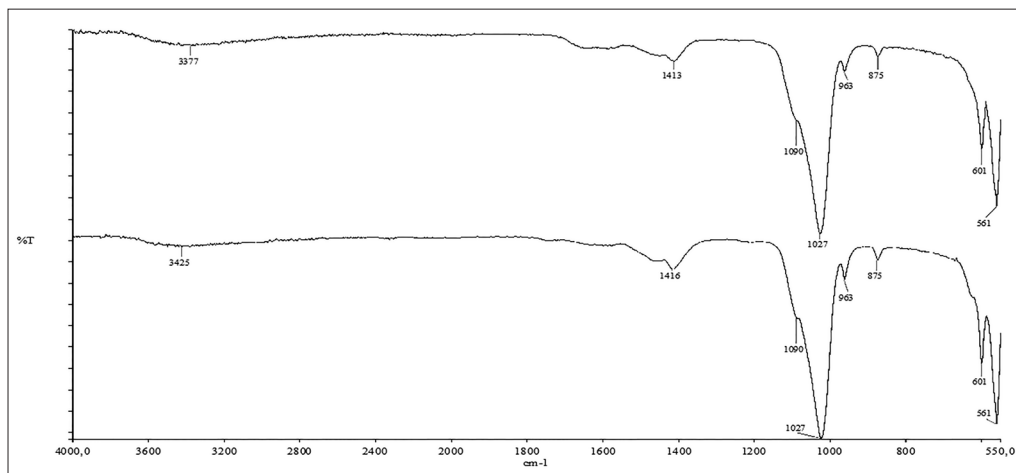


Рис. 4а. ИК-спектры ГАП, полученные из костей коровы (А) и свиньи (В) после гомогенизации ультразвуком

Характеристика гелевых пленок бактериальной целлюлозы с добавлением гидроксиапатита, КМЦ, коллагена

Изучение микроструктуры пленок, продуцируемых *Glucanacetobacter sucrofermentans* В-11267, методом растровой микроскопии, показало, что они содержат плотно упакованные микрофибриллы бактериальной целлюлозы. Пленки имеют складчатую структуру с визуальной гладкой поверхностью (рис. 5,

А). Подобные данные характерны для бактериальной целлюлозы и согласуются с данными других авторов [15]. Микроскопия образца пленки, полученной при добавлении в среду культивирования гидроксиапатита, обнаруживает хаотично располагающиеся кристаллы, вплетенные в волокна целлюлозы (рис. 5, Б). Это также согласуется с данными зарубежных и отечественных авторов, использующих образцы гидроксиапатитов, полученных разными способами. Во всех случаях ги-

дроксиапатит обнаруживается в составе пленок в виде хаотично расположенных мелких включений неправильной формы [14]. При визуальном анализе образца бактериальной целлюлозы с гидроксиапатитом отмечается гладкая поверхность с небольшими вдавлениями и складками по периметру, плоский профиль, тусклый блеск и волнистый край.

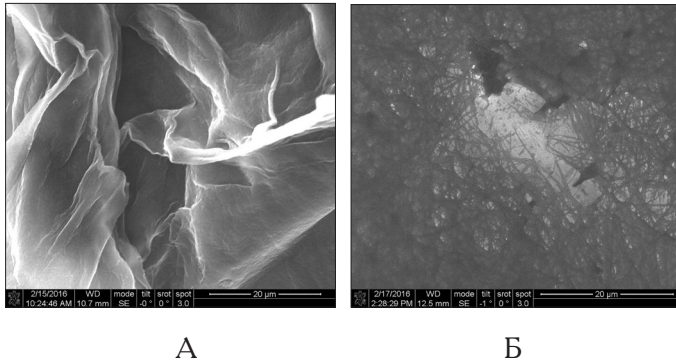


Рис. 5. Гель-пленки после высушивания до постоянной массы: А – чистая БЦ; Б – БЦ+ГАП

ИК-спектры бактериальной целлюлозы, полученной при культивировании *Glucanacetobacter sucrofermentans* в среде HS с добавлением естественного ГАП из губчатой костной ткани свиньи и коровы, идентичны. Пример такого ИК-спектра представлен на рисунке 5а. На данных спектрах частоты поглощения ГАП накладываются на более сильные частоты поглощения бактериальной целлюлозы. Такой характер спектра свидетельствует, что в полученных композитах количество бактериальной целлюлозы превышает количество ГАП.

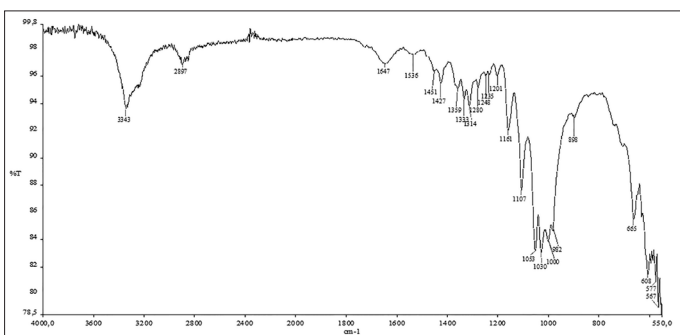


Рис. 5а. ИК-спектры смеси БЦ и ГАП

Композит бактериальной целлюлозы, полученный при культивировании *Glucanacetobacter sucrofermentans* с добавлением ГАП и коллагена, представлял собой достаточно прочную, толстую, непрозрачную, волокнистую структуру, напоминающую войлок. При сравнении образцов композитов бактериальной целлюлозы с добавлением только коллагена и с добавлением

коллагена и ГАП было обнаружено, что последний отличался наибольшей толщиной, прочностью и волнистостью. На изломе волокнистая структура просматривалась очень четко. Вследствие полной непрозрачности композита было проведено исследование структуры влажных гелевых масс, получаемых при добавлении воды методом световой микроскопии. Гелевые массы наносили тонким слоем на предметное стекло и подкрашивали слабым раствором метиленового синего. Микроскопирование обнаружило наличие в геле аморфных включений гидроксиапатита и крупных волокон коллагена.

Характеристика лиофилизатов бактериальной целлюлозы с добавлением ГАП, КМЦ и коллагена

Лиофилизаты гелей бактериальной целлюлозы также состоят из плотно упакованных волокон, не пропускающих свет (рис. 6). Растровое микроскопирование лиофилизата бактериальной целлюлозы с добавлением гидроксиапатита показало наличие мелкодисперсной, складчатой структуры с большим количеством различных по величине хаотично расположенных кристаллов гидроксиапатита, расположенных в волокнах целлюлозы (рис. 7). Полученная картина сходна с результатами микроскопирования образцов лиофилизатов бактериальной целлюлозы с добавлением искусственного ГАП в работе Grande et al., 2009 [13].

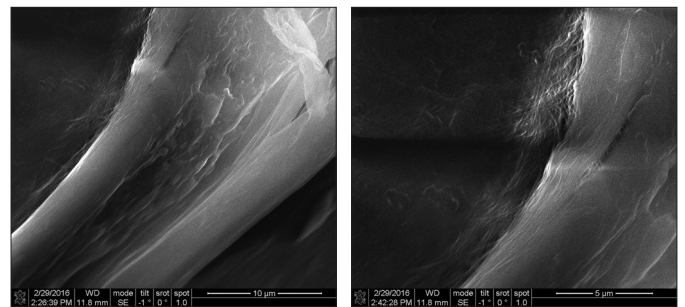


Рис. 6. Микроструктура лиофилизата бактериальной целлюлозы

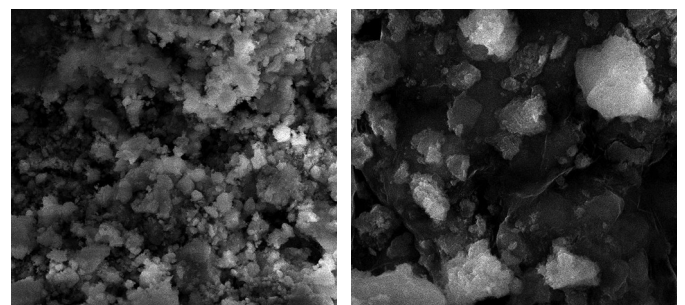


Рис. 7. Микроструктура лиофилизата бактериальной целлюлозы с ГАП. Хорошо видны кристаллы ГАП

Лиофилизаты визуально имеют хрупкую слоистую консистенцию, при добавлении воды легко растираются в гелевую массу.

ИК-спектры лиофилизатов бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы с добавлением ГАП были одинаковыми.

Лиофилизат геля бактериальной целлюлозы с добавлением коллагена характеризовался более прочной и воздушно-волокнистой структурой. Растровая микроскопия лиофилизата показала наличие аморфных включений, похожих на неудаленные клетки культуры, запутанные в волокнах целлюлозы и коллагена (рис. 8).

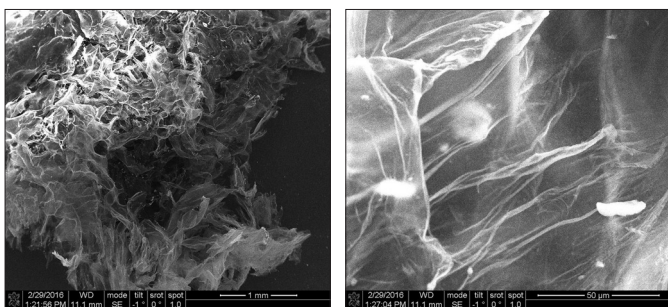


Рис. 8. Микроструктура лиофилизата бактериальной целлюлозы с коллагеном. Видна волокнистая воздушная структура (слева) и наличие аморфных включений, похожих на остатки клеток (справа)

Zhijiang C. et al. (2011) [16] был получен композит БЦ с коллагеном путем погружения влажной пленки БЦ, продуцированной *Acetobacter xylinum*, в раствор коллагена с последующим процессом лиофилизации. По мнению авторов, продукт по структуре напоминает пену. Изучение структуры полученного композита с помощью сканирующего электронного микроскопа показало, что молекулы коллагена не только нанесены на поверхность фибрилл БЦ, но и проникают внутрь. Исследования показали, что коллагеновые каркасы являются биологически активными и авторы считают, что они подходят для клеточной адгезии и могут быть использованы для раневой повязки или ткани. Наши лиофилизаты отличаются методом получения: мы добавляли коллаген в среду культивирования *Glucanacetobacter sucrofermentans*. На микрофотографиях видны переплетения волокон целлюлозы и коллагена, между ними находятся значительные воздушные пустоты; поэтому пенисто-волокнистая структура сходна с композитом Zhijiang C. et al. (2001) [16]. Лиофилизат легко растирается в порошок и при добавлении воды превращается в гель, распределение которого по ровной поверхно-

сти полиэтилена и высушивание дает волокнистую желтоватую гель-пленку.

Добавление в среду культивирования *Glucanacetobacter sucrofermentans* гидроксиапатита и коллагена дает образец лиофилизата, на котором можно рассмотреть гроздевидное скопление кристаллов ГАП между волокнами коллагена и целлюлозы (рис. 9).

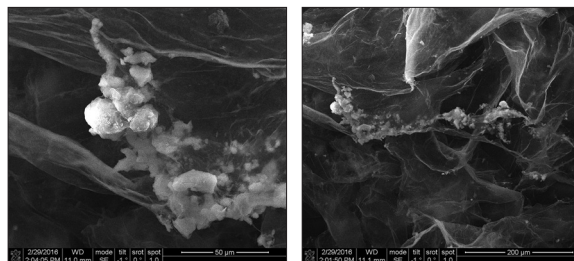


Рис. 9. Микроструктура лиофилизата бактериальной целлюлозы с добавлением ГАП и коллагена. Видны гроздевидные скопления ГАП между волокнами целлюлозы и коллагена

Лиофилизат менее воздушный, чем БЦ+коллаген, а добавление ГАП его уплотняет.

ИК-спектры данного лиофилизата содержат частоты поглощения 3327, 1644, 1530, 1441, 1040, 597 см^{-1} (рис. 9а). Следует отметить, что большинство этих частот характеризует присутствие коллагена. Его сигналы 1644, 1530, 1441 см^{-1} по интенсивности сравнимы с частотами поглощения БЦ+ГАП 1040 см^{-1} , что можно объяснить локализацией коллагена на поверхности пленок. При постепенном стирании поверхности пленок сигналы коллагена становятся менее интенсивными, а ИК-спектры приближаются к спектрам бактериальной целлюлозы.

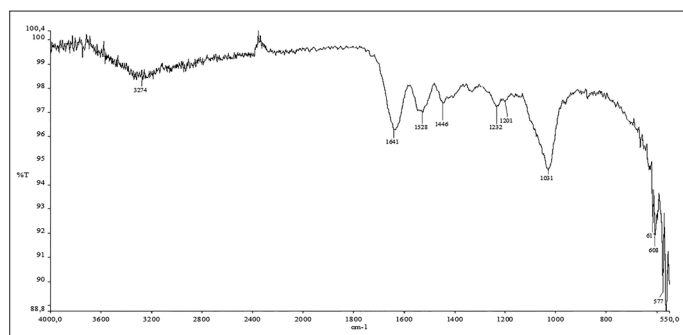


Рис. 9а. ИК-спектры лиофилизата бактериальной целлюлозы с добавлением ГАП и коллагена

Перспективность получения различных лиофилизатов на основе бактериальной целлюлозы заключается в возможности создания на их основе различных ма-

териалов. Физическая и химическая обработка полученных материалов позволит готовить различные по составу и свойствам гели и пленки в зависимости от их последующей обработки.

На основе лиофилизата из бактериальной целлюлозы с добавлением ГАП можно получить порошок, который можно превратить в гель для чистки зубов или регенерации костной ткани. Использование коллагена дает гели и гель-пленки, обладающие более высокой адгезивностью и регенеративными свойствами.

Заключение

Выполненное исследование дает возможность сделать следующие выводы:

1. Разработан метод получения композитов на основе бактериальной целлюлозы с добавлением гидроксиапатита и коллагена в культуральную среду инкубирования *Gluconacetobacter sucrofermentans*.

2. Получены композиционные материалы в виде пленок и лиофилизатов. Микроскопический анализ демонстрирует наличие в их составе гидроксиапатита в виде гроздевидных аморфных включений и волокон коллагена. ИК-спектры композитов содержат в своем составе пики, соответствующие функциональным группам сделанных добавок.

3. Исследование полученных материалов показало, что они представляют собой нанокompозиты, состав и свойства которых делают возможным их использование в качестве материалов для регенерации соединительной (в частности, костной) ткани.

Литература

- Буянова И.В., Какимов А.К., Кабулов Б.Б., Мустафаева А.К., Остроумов Л.А. Использование системы рентгеновского микроанализа для изучения химических элементов и микроструктуры мясокостного сырья // Техника и технология пищевых производств. — 2014. — № 2(33). — С. 34–38.
- Князев А.В., Буланов Е.Н., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н., Земсков А.Е., Калентьев А.В. Исследование наноразмерного гидроксиапатита на модели in vitro // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. — 2012. — № 5(1). — С. 88–94.
- Митрофанов Р.Ю., Будаева В.В., Саковин Г.В. Получение и свойства гель-пленки бактериальной целлюлозы // Химия в интересах устойчивого развития. — 2010. — Т. 18. — С. 587–592.
- Патент РФ 2168998. Способ получения аллогенного гидроксиапатита / Волова Л.Т., Подковкин В.Г. Заявл. 14.02.2000. Оpubл. 20.06.2001. Бюл. № 17.
- Патент РФ 2372892. Биоимплантат для восстановления структуры и объема костной ткани. Волова Л.Т., Подковкин В.Г., Писарева Е.В., Власов М.Ю. Заявл. 16.06.2008. Заявл. 16.08.2008. Оpubл. 20.11.2009. Бюл. № 32.
- Писарева Е.В., Власов М.Ю., Волова Л.Т. Структура и свойства биоматериалов на основе минерального компонента костной ткани // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 5. URL: <http://www.science-education.ru/128-22675>.
- Писарева Е.В., Волова Л.Т., Власов М.Ю., Соколовская А.Б. Нанобиоматериал на основе минерального компонента костной ткани // Известия Самарского научного центра РАН. — 2011. — Т. 13(4–4). — С. 1203–1207.
- Расказова Л.А., Коротченко Н.М., Гузев В.В. Сравнение свойств немодифицированного и кремней-модифицированного гидроксиапатитов, полученных при микроволновом воздействии // Ползуновский вестник. — 2013. — № 1. — С. 176–179.
- Ревин В.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А. Получение бактериальной целлюлозы и нанокompозиционных материалов. — Саранск: Изд-во Мордовского университета, 2014. — 128 с.
- Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution // The Journal of Biological Chemistry. — 1976. — Vol. 251(19). — P. 6062–6067.
- Fu L., Zhang J., Yang G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair // Carbohydr. Polym. — 2013. — Vol. 92. — P. 1432–1442.
- Gama M., Gatenholm P., Klemm D. Bacterial nanocellulose: A sophisticated multifunctional material. — Boca Raton: CRC Press, 2013. — 272 p.
- Grande Cr.J., Torres F.G., Gomez C.M., Bano M.C. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications // Acta Biomaterialia. — 2009. — Vol. 5. — P. 1605–1615.
- Klemm D., Schumann D., Udhardt U., Marsch S. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery // Prog. Polym. Sci. — 2001. — Vol. 26. — P. 1561–1603.
- Svensson A., Nicklasson E., Harrah T., Panilaitis B., Kaplan D.L., Brittberg M. et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage // Biomaterials. — 2005. — Vol. 26. — P. 419–431.
- Zhijiang C., Guang Y. Bacterial cellulose/collagen composite: Characterization and first evaluation of cytocompatibility // Journal of Applied Polymer Science. — 2011. — Vol. 120(5). — P. 2938–2944.

COMPOSITES BASED ON BACTERIAL CELLULOSE WITH THE ADDITION OF ALLOGENIC HYDROXYAPATITE, CARBOXYMETHYLCELLULOSE AND COLLAGEN

V.V. REVIN¹, N.A. KLENOVA¹, E.V. PISAREVA¹, M.U. VLASOV²,
N.A. REDYKIN¹, Z.P. BELOUSOVA¹, K.N. TUKMAKOV¹, U.A. MARKOVA¹,
E.U. SOSOVA¹, U.V. ZUBKOVA¹, M.A. DANIEL¹, E.G. LITVINOVA³

¹*Samara National Research University,*

²*Samara State Medical University, Samara;*

³*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino*

The article describes a new method for the preparation and properties of bioorganic composites based on bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter sucrofermentans* B-11267, using as additives components of bone and cartilaginous tissues: hydroxyapatite and collagen, also obtained by the authors. Composites can be produced in the form of films and lyophilizates. Data on the analysis of the composition of hydroxyapatite and composites, the microstructure of composites, and the possibility of their use as a basis for toothpaste or bone restoration material are presented.

Keywords: bacterial cellulose, carboxymethylcellulose, hydroxyapatite, collagen, composites.

АНАЛИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ ПОДХОДОВ К ИЗУЧЕНИЮ ДВИЖЕНИЯ НОСИТЕЛЯ ЗАРЯДА ПО НУКЛЕИНОВЫМ КИСЛОТАМ

М.А. ГАЛЧЕНКОВА^{1,2*}, П.М. ГОТОВЦЕВ², Р.Г. ВАСИЛОВ²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет),

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

В обзоре рассмотрены основные ключевые параметры, предопределяющие характер миграции заряда по молекуле ДНК, то есть параметры, влияющие на скорость переноса заряда вдоль цепочки нуклеотидов. Проанализированы главные этапы такого переноса заряда вдоль цепочки ДНК, обсуждены базовые механизмы этого процесса, сопоставлены различные мнения по этому вопросу. Представлена общая схема, объединяющая существующие модели, лежащие в основе механизма переноса заряда вдоль цепочки ДНК. Обоснованы возможные пути постановки экспериментов в данном научном направлении, исходя из собственных представлений о гипотетической рабочей модели обсуждаемого переноса заряда.

Ключевые слова: ДНК, перенос заряда, механизмы.

Введение

На протяжении полувека исследователей интересует ряд вопросов: во-первых, возможен ли перенос заряда по цепочке ДНК; во-вторых, если такой процесс реализуется в системе, то каков его механизм [24]? Даже после того, когда с уверенностью стали констатировать тот факт, что возможен эффективный перенос заряда в ДНК [12, 43, 53], в некоторых случаях невозможно объяснить экспериментальные данные существующими подходами к описанию механизма миграции носителя заряда по полимерной цепи. Иногда же возникает несоответствие результатов различных групп исследователей. Все имеющиеся неоднозначности предстоит еще проанализировать и в дальнейшем прояснить.

Многие биохимические процессы, как оказалось, возможно объяснить, только основываясь на явлении миграции носителя заряда по цепочке нуклеотидов [28, 31, 35, 45, 48]. Само явление переноса заряда влечет за собой другой сопряженный процесс — перенос протона, являющийся основополагающим во многих биохимических реакциях, таких как фотосинтез, дыхание. Наряду с жизненно важными биохимическими процессами может происходить и окислительное повреждение цепи нуклеотидов [21, 59]. Так, например, в работе [36] выдвинуто предположение о существовании последовательностей

нуклеотидов, которые наиболее подвержены окислительным повреждениям, что позволяет защитить более информативные участки генома.

В настоящее время исследования электрических свойств данной биомолекулы необходимы для нового этапа развития в молекулярной электронике: переход от традиционных проводящих систем к «подручным биологическим средствам» объясняется достижением миниатюризации твердотельных электронных устройств, желанием достичь конкурентоспособных технологий, которые не обладали бы таким же чрезмерным удельным тепловыделением, сопровождающим любую вычислительную работу. Другими факторами, выдвигающими ДНК в качестве потенциальной молекулы, которую можно использовать как молекулярный проводник, являются: относительная легкость синтеза «нужных» последовательностей нуклеотидов в цепочке, гибкость и небольшая потребляемая мощность.

Сама структура ДНК (100-летие одного из ее первооткрывателей Фрэнсиса Крика отмечалось в 2016 году [4]) способствует миграции носителя заряда по одной из ее цепей: сопряженные гетероциклические основания располагаются практически под прямым углом по отношению к сахарофосфатному остову. Перекрытие электронных π -систем приводит к хорошему электронному обмену взаимодействию, а также к устойчивости всей системы. Именно такая электронная конфигурация молекулы ДНК позволяет считать, что перенос заряда происходит по π -сопряженным основаниям [17, 41]. ДНК можно считать полупроводником с широкой запрещенной зоной, но многие эксперименты говорят о

© 2017 г. Галченкова М.А., Готовцев П.М., Василев Р.Г.

* Автор для переписки:

Галченкова Марина Анатольевна
студент, факультет НБИК МФТИ, Москва,
E-mail: galchenkova.mari@gmail.com

том, что эта биологическая молекула обладает широким диапазоном значений проводимости: от изолятора до индуцированного сверхпроводника. Для электрического объяснения такого поведения макромолекулы привлекались различные представления о механизме переноса заряда вдоль полинуклеотидной цепочки.

Тем не менее во всех экспериментах процесс миграции заряда вдоль ДНК можно подразделить на следующие три этапа (рис. 1):

1. Возникновение заряда в доноре и перенос его на цепь.
2. Транспорт заряда по цепи.
3. Захват заряда акцептором и его регистрация.

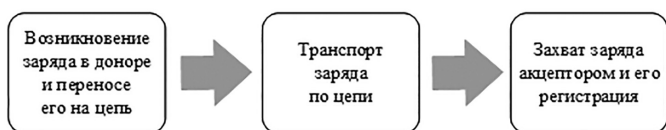


Рис. 1. Основные этапы, определяющие перенос заряда вдоль цепочки ДНК

Каждый из этих этапов может оказать существенное влияние на дальнейшую динамику процесса миграции заряда по нуклеотидной цепи, то есть каждый этап может быть лимитирующим фактором. Сама аппроксимация

данного явления зависит не только от выбранного механизма, объясняющего перенос заряда по цепочке, но и от того, в рамках какой модели рассматривается сама молекула ДНК (рис. 2). Каждая модель характеризуется своим набором степеней свободы для молекулы: в уравнениях движения в рамках одной модели будут/не будут учитываться межмолекулярные взаимодействия между цепочками ДНК, степени свободы, отвечающие за повороты, сдвиги, смещения самой полинуклеотидной цепи.

Целью настоящего обзора является не только ознакомление читателей с экспериментами и существующими теориями о механизмах миграции носителя заряда вдоль цепочки ДНК, но и анализ параметров, от которых зависят проводимость биологической макромолекулы, создание единой базы экспериментальных данных, чтобы в дальнейшем разработать собственную модель, удовлетворяющую экспериментальным измеренным значениям. Данная модель, как предполагают авторы, будет базироваться на уже имеющихся теориях о классических и квантовых механизмах переноса заряда. Представленный материал не претендует на полноту освещения всех имеющихся исследований, которые ведутся в указанном направлении на сегодня, но отражает основные направления и ряд наиболее значимых работ в обсуждаемой области.



Рис. 2. Существующие модели для рассмотрения молекулы ДНК

Основные исследования и существующие теории

По современным представлениям о роли ДНК, можно сделать вывод, что на текущий момент ДНК — это не только молекула, несущая в себе генетический материал, но и биологический объект, обладающий определенными свойствами, которые могут найти свое применение в молекулярной электронике и спинтронике.

Первые научные работы, обобщившие результаты многочисленных исследований, заключались в попытке построить модель, объясняющую перенос заряда вдоль молекулы ДНК, что, в свою очередь, дало развитие дальнейшим исследованиям электрических свойств этой молекулы. В то время как эксперименты согласовывались с теорией исследования, объясняющей возможность переноса электрона по цепи ДНК, работы, которые

велись с целью выяснения, чем же является ДНК — изолятором, полупроводником или индуцированным сверхпроводником — приводили к противоречивым, на первый взгляд, результатам.

К настоящему времени на основании обобщенного анализа существующих моделей, объясняющих механизм переноса заряда по цепочке ДНК, можно дать интегральную схему (рис. 3).

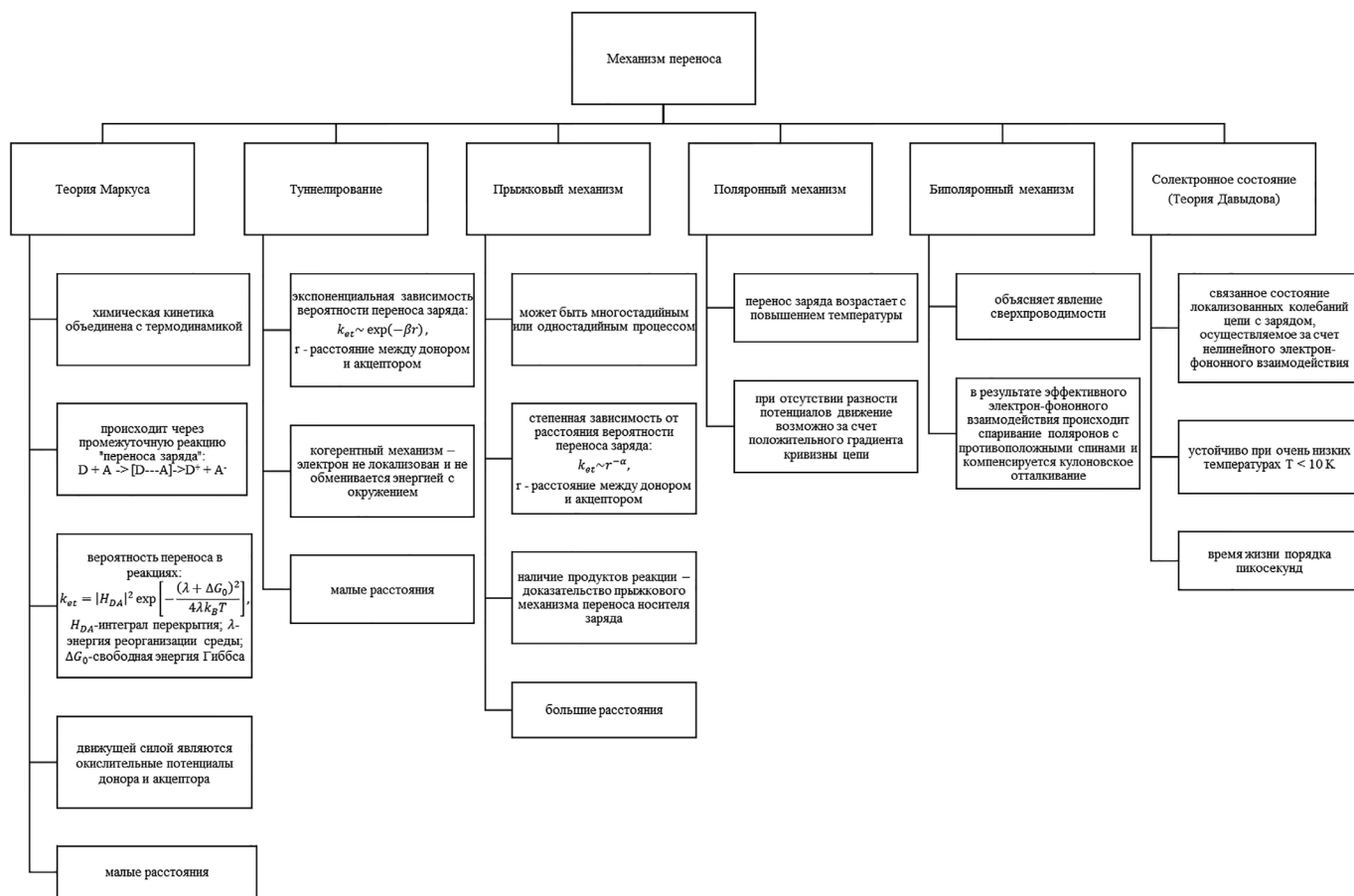


Рис. 3. Общая схема, объединяющая существующие модели, лежащие в основе механизма переноса заряда вдоль цепочки ДНК

В работе [43] авторами собраны сведения об исследованиях электрических свойств биологической молекулы ДНК, подтвержденные экспериментами различных научных групп. Один из аспектов, затронутый в данной статье, — это обсуждение подходов объяснения основных принципов переноса электрона по цепочке ДНК, такие как диффузионный скачкообразный перенос, характеризующий перенос заряда по длинной цепи, второй подход — это квантовый эффект: туннелирование, которое имеет место для коротких цепей. Вторым ключевым моментом данной работы является обсуждение теоретических способов расчета проводимости цепи ДНК. Рассматриваются две категории методик в теоретическом аспекте — это квантово-механический подход с использованием гамильтониана, второй подход — расчеты с самого начала. Квантово-механические расчеты, в свою очередь, можно разделить по признаку принимаемой модели: 1 — рассмотрение одномерной

модели, 2 — изучение двухканальной модели. Авторы в своей работе отразили ключевые аспекты, оказывающие влияние на проводимость ДНК. В рассматриваемой статье нашел отражение тот факт, что электрические свойства высушенной ДНК и помещенной в раствор отличаются. Состав самого раствора тоже оказывает влияние на проводимость молекулы. На проводимость влияет и нуклеотидный состав самой полимерной цепи: находятся ли канонические или неканонические пары оснований. Были проанализированы работы, в которых проводились исследования зависимости проводимости от длины цепи и влияния материала электродов, контактирующих с макромолекулой. На электрические свойства влияет и динамическая структура молекулы ДНК. Все обсужденные зависимости иллюстрируются набором экспериментов, в которых было выявлено, что ДНК в широких пределах может проявлять свои свойства от изолятора до сверхпроводника. Авторы обращают внимание

на то, что ни один из подходов в той или иной мере не может учесть все параметры рассматриваемой модели; поэтому для получения полной картины необходимо комбинировать несколько подходов.

В статье [26] интерес, вызванный по отношению к исследованию проводимости молекулы ДНК, объясняется тем фактом, что это свойство полимерной цепи может играть особую роль в механизме восстановления после радиационного повреждения. Авторы подчеркивают, что явление проводимости — это способность свободного движения электрона вдоль рассматриваемого объекта при нормальных условиях. Стоит отметить, что одним из ключевых моментов данной работы является исследование электрических свойств молекулы ДНК, не находящейся в растворе. Так как в системе был зафиксирован ток, авторы сделали вывод, что ДНК сама по себе способна переносить заряд вдоль своей цепи, поскольку изначально она высажена на непроводящую подложку в отсутствие внешней среды, где были бы возможны альтернативные способы передачи заряда. Доказывается тем самым, что единственным возможным проводящим веществом в поставленном эксперименте является сама полимерная цепь. Экспериментально напрямую измерив проводимость молекулы, авторы ставят вопрос о механизме переноса заряда вдоль цепи ДНК. Они предположили следующие из возможных сценариев: 1 — включение в механизм переноса за счет π -электронов или же во втором случае — если за протекания тока ответственны колебательные моды молекул, где механизм будет подобен распространению солитона. В каждом из модельных случаев имеют место собственные уникальные «эффекты»: так, например, в первом случае надо учитывать изменения в состояниях π -электронов, а во втором — необходим учет длины полимерной цепи для создания коллективного эффекта переноса заряда. В проанализированной работе также поднимается вопрос о температурной зависимости ДНК, детальное изучение которого позволит понять механизмы переноса заряда.

Вопрос температурной зависимости косвенно затрагивается в работе [37]. В статье был сделан вывод о влиянии взаимодействия молекулы с подстилающей подложкой на проводимость молекулы. Так, например, сильное взаимодействие молекулы ДНК с подложкой, изготовленной из слюды или оксида кремния, приводит к сильным деформациям цепи: депонированная ДНК сжимается, и толщина оказывается в 2–4 раза меньше диаметра изначальной нативной структуры В-ДНК. Они предоставили результаты экспериментов, подтверждающих их гипотезу: проводимость ДНК, нанесенной

на подложку, зависит от толщины самой молекулы. В случае, если толщина деформированной полимерной цепи оказывается вдвое меньше собственной толщины, то в таком случае ДНК проявляет себя как изолятор. Если же ДНК после помещения на подложку сохраняет свою собственную толщину, то нуклеотидная цепь является индуцированным сверхпроводником, который способен проводить ток при низких температурах (4 К) с неомическим поведением, характерным для нанопроводника с отталкивающим электрон-электронным взаимодействием.

Помимо применения электрических свойств молекулы ДНК в сфере молекулярной электроники и спинтроники, остается загадкой роль переноса заряда по полинуклеотидной цепи во внутримолекулярных процессах. Так, в статье [33] обсуждается биологическая значимость переноса заряда по двухцепочечной молекуле ДНК. В данной работе обсуждается многошаговый скачкообразный перенос заряда на большие расстояния, где скорость каждого шага сильно зависит от его длины. Отмечается, что важно учитывать и среду, в которую помещен исследуемый объект, поскольку эффективность переноса зависит и от конкурирующих реакций в этом водном растворе, содержащем так называемые электронные ловушки. Уделяется внимание вопросу различия между инжектированием заряда на молекулу ДНК, которое происходит за счет процесса окисления-восстановления оснований, и самим процессом переноса заряда вдоль молекулы, где заряд мигрирует между основаниями. Следует заметить, что во время инжекции скорость переноса электрона от донора через мост к акцептору, согласно теории Маркуса, зависит от следующих параметров: от движущей силы между донором и акцептором, электронной связи и от энергии реорганизации системы. Возвращаясь к вопросу переноса заряда вдоль ДНК, положительный заряд, инжектируемый в основание ДНК, не остается в этом гидроксиде, но инициирует перенос электронов на большие расстояния по многошаговому прыжковому механизму. Этот процесс можно остановить за счет добавления воды, которая захватывает катионы гетероциклических радикалов. Поскольку такие инъекции заряда происходят в условиях окислительных реакций, то перенос между основаниями электронов через ДНК имеет биологическое значение. В частности, это — защита генов от мутаций, а также функции ДНК-связывающих ферментов, находящихся под влиянием реакции электронного переноса. Так, например, метилтрансфераза HnaI снижает эффективность переноса заряда почти в два раза, что, по-видимому, вызвано переворачиванием целевого цитозина, который,

в свою очередь, приводит к депротонированию катиона гуанинового радикала.

В работе [54] обсуждается механическая картина, полученная на основе теоретических моделей, которая имеет значительные последствия для продолжающихся экспериментальных исследований переноса заряда в ДНК. Авторы предполагают, что перенос заряда, опосредованный ДНК, тесно связан с динамикой π -стека и его окружения и не может быть изучен обработкой квантово-механических статических структур. Они подчеркивают, что были сделаны только первые шаги для моделирования процесса переноса заряда в белковых комплексах с ДНК, но для изучения остается еще много важных деталей, касающихся механизма переноса заряда в геномной ДНК. Причина интереса, вызванного исследованием этого вопроса, как ссылаются авторы, лежит в основе желания понимать природу переноса заряда в биологических системах, поскольку, возможно, более сложные модели следует использовать для восстановления ДНК-материалов с улучшенными свойствами. Также изучение указанного явления представляется весьма перспективным для нанoeлектроники на основе ДНК.

Несмотря на значительные теоретические и вычислительные усилия, на сегодня существует ряд вопросов, открытых для изучения. Требуются оценки ряда электронных, структурных и динамических характеристик реальной системы или ее физически обоснованной модели. Хотя современные вычислительные средства оказались очень полезными для моделирования распространения заряда в ДНК, разработка более эффективных и надежных вычислительных схем для изучения переноса заряда в больших системах, по-видимому, имеет решающее значение для продолжающихся теоретических исследований. Квантово-химическое описание электронной структуры должно сочетаться с динамикой ДНК-стека и его окружения, включая явное участие молекул раствора. Связь квантовых и классических методов, по мнению авторов, представляется неизбежной. Также стекинговое взаимодействие пока еще остается краеугольным камнем для квантово-химических методов, тогда как энергия дисперсии может разумно оцениваться в рамках современных схем силового поля. Как упоминается в исследовании [54], перенос протонов может значительно влиять на движение заряда в ДНК. Поэтому правильное рассмотрение сильных и слабых водородных связей, а также активационные барьеры для переноса протона являются существенными в данном аспекте. Обработка квантово-механических апериодических систем, содержащих много тяжелых переходных металлов, очень сложна. Но такие

расчеты необходимы для точного описания соединений на основе ДНК и моделирования металлизированной ДНК. Специально параметризованные функционалы плотности сильной связи и полуэмпирические схемы обеспечат надежные инструменты для изучения таких систем. Комбинированный подход, основанный на моделировании квантово-механического внутримолекулярного переноса заряда и процессов электронной проводимости, будет необходим для вычислительной разработки нанoeлектронных устройств на основе ДНК. В данной работе имеется также таблица, содержащая информацию об объектах исследования, методах, применяемых для расчета их свойства, перечне исследуемых свойств объекта и ссылки на работы, в которых поднимался соответствующий вопрос.

В контексте нанобиoeлектроники, задачей которой является конструирование на основе биологических молекул электронных устройств, авторы работы [8] делают акцент на то, что использование таких «гибридов» решило бы многие проблемы, имеющие на данное время место в кремниевой электронике: миниатюризация, самокопирование, самосборка и другие. Молекула ДНК привлекает внимание к себе как один из явных претендентов для активного пользования в молекулярных устройствах не только по причинам своих уникальных электрических свойств, но и также из-за возможности к самопродуцированию. Авторы на основе модели Пейрарда — Бишопа — Холстейна исследовали нелинейные возбуждения в ДНК, вызванные внешним воздействием. Как отмечают сами авторы, нелинейные возбуждения, инициированные в полинуклеотидной цепи как пузыри, представляют собой большой интерес, поскольку играют огромную роль при денатурации молекулы и ее плавлении во время транскрипции. Сама модель представляет собой квантово-классическую модель, объединяющие две модели — Холстейна и Пейрарда — Бишопа, модернизировав первую из них тем, что теперь описание динамики возмущений цепочки сайтов будет описываться более усовершенствованной и точной моделью Пейрарда — Бишопа по сравнению с моделью Холстейна. Данная модель предполагает, что молекула ДНК является квазиодномерной, однородной и периодической структурой, в которой учитываются только трансверсальные движения нуклеотидов, взаимодействие которых описывается нелинейным потенциалом Морзе. При численном моделировании подобного механизма переноса заряда вдоль молекулы ДНК, как отмечают авторы, детальное изучение такого рода динамики переноса даст возможность управления характеристиками транспорта заряда в ДНК.

В работе Лакно В.Д. и Султанова В.Б. [7] обсуждается механизм переноса заряда вдоль цепочки ДНК и условия, при которых возможна его реализация. Как они отмечают, имеющиеся многочисленные эксперименты по переносу заряда в ДНК приводят к противоречивым выводам: с одной стороны, оказывается, что процесс является очень медленным и заряд почти полностью локализован на одном сайте, но, с другой стороны, имеются свидетельства того, что перенос возможен на очень большое расстояние. Для объяснения такого противоречия авторы предлагают рассмотреть модели сверхбыстрых переходов заряда между парами оснований на отдельных фрагментах полинуклеотидной цепочки, которые приводят к установлению квазиравновесного распределения заряда на временах, меньших времени сольватации заряда. В указанной работе затронут вопрос качественного отличия переноса заряда в сухой ДНК и ДНК в растворе: так, в отсутствие растворителя, когда не имеет место такое явление, как сольватация, возможна реализация одного из следующих механизмов по переносу заряда вдоль цепочки ДНК — прыжковый механизм, зонный электронный или дырочный, поляронный или солитонный транспорт, комбинированный прыжково-суперобменный механизм. В случае наличия в системе раствора определяющую роль для переноса заряда играет его сольватация, которая приводит к сильной локализации заряда на отдельном сайте, уменьшая тем самым скорость переноса в $10^7 \div 10^8$ раз по сравнению с сухой ДНК. В случае растворителя затрудненным для реализации становится поляронный механизм переноса заряда из-за малой вероятности температурных скачков, также происходит исключение зонного механизма переноса дырок даже в случае однородных цепочек. Основными выводами данной работы являются: проводимость сухой ДНК выше ДНК в растворителе; при переносе заряда вдоль полинуклеотидной цепочки, находящейся в растворе, возможны два различных режима — сверхбыстрый перенос заряда на большие расстояния, когда имеются последовательности специального вида, в которых реализуются резонансные условия туннельного сверхбыстрого переноса, и второй режим, медленный, который происходит после сольватации дырки.

В другой статье авторы Посыпкин М.А. и Султанов В.Б. [2] ставят перед собой математическую задачу нахождения распределения зарядовой плотности избыточных зарядов в ДНК (электронов и дырок), которое играет решающую роль в таких процессах, как канцерогенез и мутагенез. Сама задача сводится к расчету диагональных элементов матрицы плотности носителей заряда с дальнейшим поиском собственных

функций в адиабатическом приближении, которое приводит к решению стационарного дискретного нелинейного уравнения Шредингера (ДНУШ), описывающего в рамках квантово-классической модели переноса заряда в ДНК взаимодействие носителя заряда с классическими колебаниями нуклеотидных пар. Искомый вектор состояния носителя, являющийся решением ДНУШ, должен доставлять минимум функционала энергии и удовлетворять условиям нормировки. Эта задача сводится к двум подзадачам: 1 — нахождение глобальных минимумов, которые отвечают устойчивым состояниям; 2 — поиск всех стационарных точек (применялись рекуррентные соотношения и метод проекции градиента). Как отмечают сами авторы, такая задача требует дальнейшего распараллеливания предложенного ими алгоритма.

В работе Астаховой Т.Ю. с коллегами (2012) [1] авторы во введении рассмотрели исторический подход к изучению такого явления, как перенос заряда, имеющего большое значение в биологии, например, как при фотосинтезе или окислительной деструкции полинуклеотидной цепочки. Начиная с исторически первой теории — теории Маркуса, разработанной для объяснения механизма, обеспечивающего это явление, авторы отмечают, что она оказалась полезной в конденсированных системах на малых расстояниях. Рассмотрение переноса носителя на большие расстояния впервые стали рассматривать с точки зрения таких механизмов, как туннелирование и перескоковый механизм. Главное их отличие состоит в том, что вероятность переноса заряда для туннельного неадиабатического перехода имеет экспоненциальное убывание с ростом расстояния, в то время как для перескокового механизма — слабая степенная зависимость. После достижения уровня автоматизации в получении искусственных фрагментов ДНК была изучена зависимость электропроводящих свойств цепочки от последовательности пар нуклеотидов в ней. Также было отмечено, что наилучшим строительным блоком при конструировании цепей для переноса заряда оказался аденин в силу особенностей своего электронного строения, которые улучшают способность переноса носителя [49, 47] и его захвата [39]. Была отмечена также работа [62], где группа исследователей функционализировала фрагменты ДНК за счет присоединения к 5'-фосфатному и 3'-гидроксильному концам углеродной нанотрубки (УНТ). На основе такой системы УНТ-ДНК-УНТ было создано нанобиоэлектрическое устройство, которое использовалось для изучения взаимодействия участка цепи с ДНК-метилтрансферазой SssI, очень чувствительной к последовательности оснований. Биологическое значение M.SssI заключается в том, что при успешном присо-

единении она катализирует метилирование цитозина в присутствии кофактора S-аденозилметионина. Указанный процесс может выступать в роли регистрации активности ферментов на молекулярном уровне, поскольку он вызывает изменение проводимости молекулы ДНК. Авторы в своем обзоре [1] также подчеркивают уникальную возможность переноса заряда в так называемом «сменном режиме при некотором предельном значении расстояния»: это означает ровно то, что при расстояниях меньше этого предела наблюдается туннелирование, имеющее экспоненциально быстрый спад вероятности переноса заряда с ростом расстояния; при расстояниях же больших предельного наблюдается слабая степенная зависимость [46, 50]. Те же авторы анализируют и экспериментальные работы, в которых проводилось сравнение переноса заряда в цепочках с регулярным расположением пар оснований по отношению с цепочкой с единственным дефектом. Как оказалось, переноса во втором случае, то есть в цепочке, имеющей дефект, практически нет, что обуславливает причину переноса заряда по π -сопряженной полинуклеотидной цепи. Более того, сам перенос заряда осуществляется когерентно при увеличении расстояния между донором и акцептором таким образом, что многостадийный механизм, характерный для прыжковой модели переноса заряда, переходит на одностадийный процесс невыясненной природы [13, 29]. Обладая огромной экспериментальной базой, многие существующие теории были не способны на объяснение механизмов, обеспечивающих перенос заряда, что привело, в свою очередь, как уже оговаривалось ранее, к развитию новых подходов к изучению обсуждаемой проблематики. Так, А.С. Давыдов в своей работе «Солитоны в квазиодномерных молекулярных структурах» (1982) [5] предложил теорию электросолитона, согласно которой, возникает автолокализация электрона из-за локальной деформации цепи в связи с взаимодействием с электроном. Но, как показало последующее численное моделирование в работе [43], такое состояние устойчиво при температурах $T < 10$ К, само же время жизни занимает порядка нескольких пс [52]. Дальнейшие разработки теорий, позволяющих подключить их к рассмотрению нелинейности цепочки [66], привели к рассмотрению переноса колебательной энергии и заряда в протеинах, где было показано, что сверхзвуковому переносу заряда и энергии способствует их автолокализованное состояние. Астахова Т.Ю. и др. в статье [1] кратко упоминают работу [60], в которой нелинейность в потенциале взаимодействия играет ключевую роль. В этой работе вводится такое новое понятие, как солектрон, смысл которого заключается в следующем. Из-за тепловых флуктуаций или

локального колебательного возбуждения в молекулярной системе создается солитон, который, захватив электрон, способен образовать связанное состояние, именуемое как солектрон. Сам же солектрон движется со сверхзвуковой скоростью. Следует заметить, что в данной модели имеет место адиабатическое приближение, поскольку волновая функция, характеризующая систему, в этом случае как бы подстраивается под потенциальную яму, которую создает солитон. Но из-за используемого адиабатического приближения происходит неправильный учет влияния электронной системы на динамические переменные. В самом же исследовании Астаховой Т.Ю. и др. [1]: рассмотрен возможный механизм одновременного переноса энергии и заряда; были проведены конкретные расчеты для нуклеотидной цепочки при физиологической температуре; был использован подход, который постулирует существование связанных состояний солитона и электрона, названных солектронами, обладающими высокой стабильностью и способными переносить заряд и энергию на десятки пар оснований ДНК.

М.Н. Волобуев в своей работе «Молекулярные проводники на основе цепочек ДНК» [3] указывает на то, что повышенный интерес к изучению такой биологической молекулы, как ДНК, вызван не только со стороны биологии и медицины, где полинуклеотидная цепочка выступает в роли хранилища генетической информации, но и уникальная молекулярная структура этой молекулы также находит применение и в нанотехнологиях: натуральные или синтетические структуры полинуклеотидной цепи в наноэлектронике выступают в качестве молекулярных проводов. Как и многие другие исследователи в этой области, М.Н. Волобуев отмечает проблему отсутствия единой теории, подтвержденной многими экспериментами, которая позволила бы объяснить механизм переноса заряда (будь то электрон или дырка) на значительные расстояния вдоль цепочки ДНК. Это приводит к тому, что на данном этапе не имеется возможности синтезировать цепочки ДНК с определенными свойствами для использования в наноэлектронике в качестве молекулярного провода. В своей работе автор для исследования механизма переноса заряда использовал компьютерное моделирование с последующим привлечением квантово-химических *ab initio* вычислений и использованием молекулярно-динамического моделирования. Методика, которую предлагает автор, заключается в том, что происходит исследование цепочки ДНК с парами А-Т, Г-Ц, помещенной в водный раствор. Из-за пространственной организации структуры (сопряженные основания перпендикулярны практически сахарно-фосфатному остову)

перенос положительного заряда (дырки) происходит по пуриновым основаниям (А, Г), что представляет собой перспективный материал для построения проводников с молекулярной структурой. Сам остов в переносе заряда не участвует. Как и многие его предшественники, М.Н. Волобуев отмечает два механизма, обеспечивающих перенос заряда: это туннелирование, имеющее чисто квантовое объяснение, и скачкообразный механизм переноса носителя, который позволил построить адекватную модель молекулярного проводника на основе ДНК [61]. При этом преимущественно скачкообразный механизм переноса заряда вдоль цепочки ДНК реализуется тогда, когда сродство к электрону основания, несущего положительный заряд, превышает потенциал ионизации соседнего основания. Сами эти характеристики зависят от многих факторов, например, таких как геометрия основания, которая, в свою очередь, определяется температурными флуктуациями атомов. В то время как на большие расстояния (относительно молекулярного уровня) доминирует процесс скачкообразного переноса, туннельный механизм реализуется преимущественно на короткие расстояния; вероятность же такого перехода имеет экспоненциальное затухание с ростом расстояния. Один из основных выводов указанного исследования заключается в том, что скорость переноса заряда тесно связана с нормальными колебаниями оснований полинуклеотидной цепи; при этом особую роль играют колебания аминокислотной группы.

Другим примером, где понимание механизма переноса заряда вдоль полинуклеотидной цепочки играет существенную роль, служит исследование активации транскрипции ДНК главными факторами транскрипции. В работе Кузнецова П.Е. и Кузнецовой Н.Б. (2015) [6] был предложен механизм действия ДНК как донора электронов, основываясь на рентгеноструктурных данных из Protein Data Base и квантово-химических расчетах взаимодействия транскрипционных факторов с нуклеотидами цепочки. Сам метод заключается в том, что транскрипционные факторы и гормон-рецепторные комплексы способны активировать транскрипцию ДНК за счет переноса электрона от ДНК на активаторы, находясь при этом в триплетном состоянии. Электронная структура ДНК объясняет ее потенциальную способность к переносу носителя заряда: содержание избытка электронов из-за наличия большого количества отрицательно заряженного кислорода с неспаренными электронами; основное состояние для молекулы ДНК триплетное; расчетами было показано, что активным является электрон, находящийся на концевом нуклеотиде; также, согласно расчетам, было выявлено, что при взаимодействии транскрипционного

фактора с молекулой ДНК первым будет распределяться тот электрон, который находится на внутренней стороне полинуклеотидной цепи, что будет способствовать денатурации цепочки. После переноса заряда происходит образование катион-радикала молекулы ДНК, изменение ее структуры, заряда и электростатического потенциала, а также расплетение двойной спирали ДНК, что, в свою очередь, служит стартовой точкой в инициации транскрипции РНК-полимеразой.

Работа Dekker C. and Ratner M. [22] мало отличается от других, где также рассматриваются в общих чертах, пытаясь выяснить существующие теории и эксперименты, выявляющие и объясняющие механизмы переноса носителя заряда вдоль цепочки ДНК. В ней авторы, ссылаясь на уникальную структуру ДНК, обсуждают имеющиеся эксперименты и теории, которые противоречат друг другу: какие-то эксперименты подтверждают то, что полинуклеотидная цепочка ведет себя как хороший изолятор, в то время как другие работы говорят о том, что ДНК является хорошим проводником. Тем не менее в данном исследовании отмечены следующие существенные вещи, играющие важную роль в понимании движения заряда (электрона или дырки) по цепочке ДНК: 1 — из-за разности энергетических уровней комплементарные пары Г-Ц, находящиеся в цепочке, способствуют хорошему движению положительно заряженной дырки, в то время как пара А-Т для нее будет представлять собой энергетический барьер; относительная разность в энергетических уровнях была выведена из вычислительных моделей, экспериментов по фотоэмиссии и электрохимических измерений; 2 — также надо отметить, что разность энергий между этими двумя парами существенно больше, чем тепловая энергия носителя заряда; 3 — сделан акцент на том, что туннелирование является когерентным процессом в том смысле, что электрон не обменивается никакой энергией с молекулой во время переноса и электрон никогда не локализуется, что отличает данный процесс от другого — термического перескокового механизма. Электронный перенос по полинуклеотидной цепи возможен в связи с различными структурами, которые может принимать молекула: к таким структурам относятся изломы, изгибы, выпуклости и искажения вдоль молекулы, а также «полиэлектролитный» характер двойной спирали, что может привести к потоку положительно заряженных противоионов вдоль отрицательно заряженной фосфатной цепи.

Имеется немало исследований, основополагающей идеей которых является идея применения молекул ДНК для реализации новых сверхбыстродействующих

устройств электронной обработки информации [18, 56]. Основываясь на экспериментальных данных работ [18, 30, 56], была установлена потенциальная возможность создания гибридов молекулы ДНК любой конфигурации с другими материалами за счет химически активных концов, что позволит в дальнейшем внедрить в интегральную схему полинуклеотидную цепь в качестве переключающего элемента в твердотельных приборах. В таких устройствах функция базовой приборной структуры заключается в переключении между двумя основными состояниями, которые соответствуют высокому и низкому уровню сигнала. То есть за счет реализации различных электрических свойств биологической молекулы становится актуальной разработка логических переключающих элементов, обеспечивающих такие логические операции, как операции инверсии, дизъюнкции и конъюнкции.

Новик Н.В. и соавт. [9] в своей работе предложили электрическую эквивалентную схему молекулы ДНК, описывающую перенос носителей заряда через молекулу. Сама схема состоит из параллельно включенных туннельных и выпрямляющих диодов. Их проводимость определяется скоростью переноса носителей заряда через различные последовательности динуклеотидов, которые обеспечиваются двумя механизмами переноса: посредством туннельного и термоактивированного механизма переноса заряда. Изменение пространственной конформации и количества нуклеотидных пар оснований в цепочке молекулы ДНК приводит к зависимости электрических свойств от условий, которые определяют механизм переноса для различных последовательностей биологической молекулы, а также влияет как на величину скорости переноса, так и на время перемещения носителей заряда по цепочке. Согласно результатам экспериментальных работ [15, 30, 44], скорость переноса заряда вдоль ДНК определяется относительным энергетическим смещением акцепторного и донорного участков при наличии в системе внешнего электрического поля, температурой, а также временем накопления заряда за все время протекания тока, а в случае «обратного» режима — временем утекания заряда при протекании обратного тока. В работе [9] обсуждаются преимущества таких приборов: имеется возможность регулирования проводимости молекулы с помощью изменения состава полинуклеотидной цепи; в таких устройствах реализуется высокая скорость протекания процессов переноса, порядка 10^{-14} — 10^{-12} с и имеется широкий диапазон рабочих температур.

К настоящему времени установлено, что ДНК подвержена различным изменениям в собственной структуре — мутациям. Но живая клетка наделена системами репарации, которые исправляют различного рода ошибки.

Составной частью такой репарационной системы являются специальные белки, постоянно патрулирующие структуру полинуклеотидной цепи. И все же остается вопрос, как именно система сигнализирует о том, что в данном участке, например, необходимо произвести замену основания для создания стандартной Уотсон — Криковской пары? Ведь если же не провести надлежащего ремонта, то последствиями могут быть такие болезни, как рак. Исследования [10] говорят, что ДНК использует свои электрические свойства для подачи сигнала протеинам о необходимости срочного ремонта. Если молекула ДНК больше не проводит электрический ток или проводимость стала заметно хуже, то это служит немедленным сигналом для белков о начале работы. Здесь научная группа выдвинула гипотезу о том, что ферменты репарации могут использовать ДНК для общения между собой в процессе ее починки. На примере работы специального фермента репарации ДНК — эндонуклеазы III (EndoIII) — научная группа стала исследовать данный вопрос. Стоит отметить, что еще в начале 1990-х годов в данном ферменте биологами были обнаружены железосерные кластеры, которые играют ключевую каталитическую роль: они обмениваются электронами со своими «соседями», то есть происходит некий окислительно-восстановительный процесс. Изолировав EndoIII и измерив ее взаимодействие с другими соединениями, чтобы выявить, насколько легко фермент обменивается электронами, все-таки было выявлено, что этот железосерный кластер в EndoIII расположен таким образом, что он не способен помогать укладке фермента или катализировать реакцию. Было установлено, что только сильные окислительно-восстановительные соединения, которые отсутствуют в клетке, имеют какое-то влияние на EndoIII. Таким образом, биохимики пришли к выводу, что этот железосерный кластер не обменивается электронами, а имеет скорее какую-то структурную функцию. Стараясь понять, почему электрон-проводящая металлическая группа, которая не выполняет соответствующих каталитических функций в ферменте, так близка к ДНК, неся тем самым угрозу кодированию и сохранению генетической информации, Jacqueline Barton совместно со своей группой, взяв копии ДНК, привязав их к электродам в растворе и поместив туда EndoIII, смогли увидеть, как фермент связывался с ДНК и как после смены его конфигурации Fe-S кластер более легко менялся электронами, приводя к смене окислительно-восстановительного потенциала. В процессе связывания фермента с ДНК, когда Fe-S кластер высвобождает электрон, заряд фермента увеличивается с $2+$ до $3+$, удерживая его более плотно с ДНК. Высвобожденный электрон опускается вниз по ДНК проводу, где в

случае поврежденной ДНК не может пройти дальше, или, если все в порядке, продолжает движение, пока не встретит другой фермент репарации ДНК, который схватывает этот электрон, меняет заряд с $3+$ на $2+$ и отпадает от ДНК. Такой механизм позволяет ферментам очень быстро обмениваться информацией о проблемном участке ДНК и чинить его, после чего они переходят к другому участку. Также авторы данной работы предлагают создавать ДНК-чипы — устройства, которые, основываясь на уникальной природной проводимости данных биомолекул и их способности связываться с другими нитями, состоящими из комплементарных последовательностей оснований, будут способны зондировать ДНК на наличие повреждений и определять их природу.

В работе [14] авторы (Bezerril L.M. et al., 2009) численно изучали одноэлектронную проводимость в массивах двухцепочечных сегментов ДНК, используя модель сильной связи. Чтобы выявить релевантность исходных корреляций в распределении нуклеотидов, они сравнивали результаты для последовательности геномной ДНК с результатами искусственных последовательностей (дальнедействующие коррелированные типы Фибоначчи и Рудина — Шапиро) и случайную последовательность, которая представляет собой парно-коррелированную случайную последовательность с теми же первыми соседними корреляциями последовательности ДНК человека Ch22, демонстрирующую поведение корреляции в ближней зоне. Ими была обнаружена следующая характеристика кривой ВАХ: по-видимому, она обусловлена корреляциями на коротких расстояниях, предполагая, в свою очередь, что включение только корреляций между соседями внутри цепочечных пар оснований в распределении нуклеотидов обеспечивает адекватное описание электронных свойств ДНК. Однако авторами было отмечено, что поскольку интенсивность пропускания электронов сильно зависит от внутрицепочечной связи, необходимы дальнейшие исследования, предполагающие более реалистичные параметры модели, чтобы сделать вывод о фактической значимости этого поведения в молекулах ДНК.

Одной из последних работ является исследование Torres-Silva et al. (2017) [58], в котором рассматривается миграция заряда в цепочке молекул ДНК через моделирование с помощью квантовой линии электропередачи с дискретным зарядом. В этой работе по аналогии с такими работами, как [27, 34], была использована стандартная техника квантования для потока и заряда, в результате чего выявилась зависимость структуры запрещенной зоны от параметра псевдопотока и было установлено условие скорости, которая порождает данную структуру.

Это означает, как подчеркивают сами авторы, что существуют области, для которых уединенный фронт волны распространяется с постоянной по значению скоростью. Основным результатом указанной работы является существование запрещенной зоны структур $0 < \phi / \phi_0 < 1$. Элементарный квантовый поток ϕ_0 , который появляется в уравнениях, тесно связан с проводимостью молекул ДНК. Поэтому квантовые линии передачи с дискретностью заряда, по мнению авторов, могут быть возможной моделью для изучения миграции заряда молекул цепной ДНК, индуцированных электромагнитным излучением.

В работе Macia E. (2009) [42] рассмотрены за последние 5 лет имеющиеся на тот момент приближения для описания переноса заряда вдоль ДНК в рамках эффективной сильной связи. Несмотря на длительно существовавшее тогда убеждение, что ДНК состоит из периодически повторяющегося единого блока тетра-нуклеотида, например, $(CATC)_n$, то есть ДНК первоначально рассматривалась как тривиально периодическая макромолекула, неспособная хранить объем информации, необходимой для управления функцией клетки, многие физики заинтересовались данным вопросом. Так, Шредингер предполагал, что ген состоит из длинной последовательности нескольких повторяющихся элементов, проявляющих четко определенный порядок без обращения к периодическому повторению, и иллюстрирует обширные комбинационные возможности структуры. И на данный момент, можно полагать, что он был первым, кто высказал идею линейности генетического кода. Еще Шредингер [51] высказал предположение об аperiodичности данной макромолекулы, которая хранит в себе генетическую информацию. В частности, роль миграции заряда в восстановлении мутации ДНК широко обсуждалась в течение последнего десятилетия, а возможное существование корреляционных эффектов в электропроводности из-за наличия дальних пространственных корреляций в ДНК было также подробно изучено. Таким образом, область исследования транспортных свойств в аperiodических системах приносит, как утверждает Macia E., полезные концепции и подходы к фундаментальному изучению возможной связи между хранением информации (определяемой порядком появления нуклеотидов) и физическими свойствами, непосредственно связанными с электронной структурой нуклеиновых кислот.

Саму молекулу ДНК можно рассмотреть как систему, состоящую из периодической и аperiodической частей (рис. 4). Ссылаясь на работу Endres R.G. et al. (2004) [25], была отмечена общая тенденция к тому времени: экспериментальные результаты, имеющиеся в тот период, указывают на то, что: 1) перенос на периодических синтетических ДНК происходит лучше, чем на аperiodических

биологических образцах; 2) двухцепочечная ДНК демонстрирует значения электропроводности на порядок выше, чем одноцепочечные цепи сопоставимой длины.

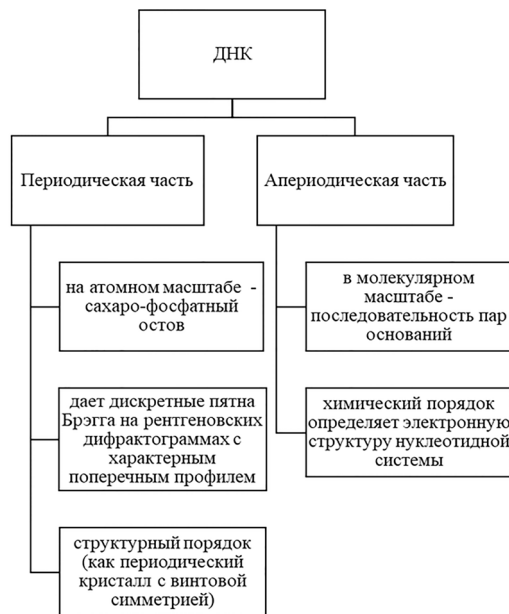


Рис. 4. Описание «составных частей» системы ДНК

В разделе «Квантовые лестничные модели ДНК» обсуждаются имеющиеся представления о механизмах переноса заряда: отмечается, что перенос заряда в ДНК в основном осуществляется путем внутрицепочечного связывания посредством последовательного некогерентного прыжкового механизма или когерентного туннелирования. При этом предполагается, что последний механизм будет доминировать в проводимости в очень низкотемпературном режиме, особенно в случае периодических олигонуклеотидов. При низком напряжении основной вклад в сопротивление должен происходить из-за несоответствия потенциала барьера между металлом и ДНК, тогда как при высокоомном напряжении новые каналы проводимости обеспечиваются молекулярными состояниями. В самой работе для описания механизмов переноса заряда акцент сделан на модели Гамильтона, которая учитывает разные масштабы времени и пространства с помощью адекватного выбора обобщенных координат, описывающих как электронные, так и динамические степени свободы ДНК. В условиях модели сильной связи берется во внимание, что каждая базовая пара вносит свой вклад с одной единственной орбиталью, которая практически не взаимодействует с другими орбиталями в паре. На самом деле квантовомеханические исследования показывают, что взаимодействие водородной связи приводит к пространственному разделению НОМО и LUMO в системе нуклеотидов, так что перенос дырок (электронов) про-

текает через пуриновые (пиримидиновые) основания, где носители НОМО (LUMO) расположены в polyG-polyC (polyA-polyT), соответственно [11, 55].

Таким образом, в первом приближении основу физики переноса заряда в молекулах ДНК можно рассматривать в терминах относительно простых моделей с одной одиночной орбиталью на базовую пару плюс параметры переноса, описывающие: 1) связь между последовательными нуклеотидами; 2) связь из этих оснований с основными состояниями; 3) водородное соединение между парами оснований. Тем не менее не следует забывать о других степенях свободы молекулы ДНК в нативном виде в естественных условиях. Например, кручение приводит к тому, что перекрытие орбиты существенно уменьшается, что дает меньшие значения для значений интеграла переноса. Поэтому есть основания ожидать значительного снижения эффективности переноса заряда, обусловленного чисто геометрическими соображениями (эффект размерности). Кроме того, при физиологических температурах относительная ориентация соседних баз становится функцией времени, тем самым изменяя их взаимное перекрытие в колебательной моде (динамический эффект). Все это приводит просто к тому, что систему «ДНК + заряд» можно рассмотреть как сумму отдельных систем, где одна из них описывает непосредственно перенос заряда, а вторая — динамику самой молекулы ДНК. Также при описании динамики фононов в ДНК можно пренебречь внутренними степенями свободы оснований, поскольку мы можем отделить быстрые колебательные движения атомов из их положений равновесия от более медленных движений молекулярных групп. Так же, как и в предыдущей статье, особое внимание уделено аперриодической системе типа Фибоначчи. Была отмечена обнаруженная интересная связь между нуклеотидными частотами в хромосомах человека и числами Фибоначчи [64] и были введены подходящие математические подходы, чтобы прояснить эволюцию повторяющихся цепочек ДНК в рамках геномной эволюции дублирование [23]. В этом случае предполагается, что канонический механизм геномного роста выполняется схематически посредством серии процессов репликации — вырезания — конкатенации, которые последовательно применяются итеративным способом.

В результате анализа вышеуказанной информации была предложена общая схема постановки экспериментов с целью реальной применимости разработанных теоретических моделей в отношении процесса переноса заряда (рис. 5). Далее встала задача сопоставить предсказанные и измеренные данные, характеризующие процесс переноса заряда вдоль ДНК. Они представлены в таблице 1.



Рис. 5. Схематично представлена общая идея постановки экспериментов от объектов исследования с требованиями, представленными к ним, до физических методов детектирования процесса миграции заряда

Таблица 1

Измеренные и предсказанные данные, характеризующие процесс переноса заряда вдоль ДНК

| Объект | Полученные результаты | Ссылка на работу |
|---|---|----------------------|
| Шпилька = Хромофор + 2 комплементарных участка ДНК | - константа скорости прямого переноса: $5 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$ - константа скорости обратного переноса: $5 \times 10^6 \text{ c}^{-1}$ | [40] |
| Короткие фрагменты ДНК в форме шпильки | - скорость переноса заряда $\approx 10^9 \text{ c}^{-1}$ - скорость переноса заряда в работе [16], где механизмом переноса является туннелирование составляет: $1,2 \text{ нс}^{-1}$ | [20] [16] [19] |
| ДНК, в котором заменен аденин его аналогом 7-дезаденином (zA) в коротких цепях $G(A)_5G \rightarrow G(zA)_5G$ | - при замене произошло увеличение скорости переноса заряда на величину $> 10^3 \text{ c}^{-1}$ | [38] |
| Синтезированная цепочка поли-7-дезаденин $(zA)_n$ | - скорость переноса составляет: $4,2 \times 10^{10} \text{ c}^{-1}$ (скорость переноса для полигуанина = $4,3 \times 10^9 \text{ c}^{-1}$) | [57] |
| Поли-(dA)-поли-(dT) Поли-(dG)-поли-(dC) | - при комнатной температуре сопротивление для: Поли-(dA)-поли-(dT) = 100 МΩ Поли-(dG)-поли-(dC) = 1,3 МΩ | [65] |
| Aq-DNA u-DNA | quantum resistance for: Aq-DNA = $4,0 \pm 0,2 \times 10^{-4} G_0$ u-DNA = $14 \pm 1 \times 10^{-4} G_0$ $G_0 = 7,748 \times 10^{-5} \text{ S}$ | [64] |
| GATGGG GATGTGGG GTTGGG GTTGTGGG GTTGTGGTGGG | $k_{CT,rel}$: 3,20 3,40 8,90 2,80 0,88 | [45] [32] |

Заключение

Мир ДНК таит в себе много тайн: однозначного ответа, что из себя представляет данная молекула с точки зрения электрических свойств, пока еще нет. Существует много подходов к тому, как измерить проводимость ДНК, теорий, какие механизмы обеспечивают процесс переноса заряда вдоль полинуклеотидной цепи, но зачастую они входят в противоречие друг с другом. Тем не менее можно проследить основные ключевые параметры, предопределяющие в основном характер миграции заряда по биомолекуле, то есть параметры, влияющие на скорость переноса заряда вдоль цепочки нуклеотидов. Скорость переноса заряда зависит от: состава полинуклеотидной цепи (а также от замещения на природные основания на другие молекулы); длины полинуклеотидной цепочки; модификации в структуре ДНК; окружения (изолированная молекула / в растворе); температуры; контакта; внешнего поля; методики приготовления образца; условия проведения эксперимента; допирования НЧ; молекул, выбранных в качестве донора и акцептора; расстояния между донором и акцептором.

Понимание механизма переноса заряда вдоль ДНК важно не только с точки зрения биологических процессов, но и прикладных аспектов. Чтобы понимать релевантность и корреляцию различных экспериментальных и теоретических работ, было принято решение о сборе информации в единую базу (см. табл. 1) с пояснениями об объекте исследования, измеренных/предсказанных значений и ссылок на сами работы. Указанная таблица 1, как предполагается, в дальнейшем поможет систематизировать полученные знания о резистентности молекулы ДНК и имеющихся механизмах, обеспечивающих процесс миграции заряда вдоль цепочки нуклеотидов. Другой ключевой особенностью настоящей работы является схематическое представление этапов миграции заряда, экспериментальных аспектов, имеющихся теорий о механизмах, обеспечивающих перенос заряда, и имеющихся моделях, в рамках которых может быть рассмотрена данная биологическая молекула. Следующим этапом является разработка собственной математической модели, проведение экспериментов и согласование их с полученной моделью. Этот обзор не претендует на полноту освещения обсуждаемой темы, но в нем собраны и проанализированы данные ключевых работ.

Литература

1. Астахова Т.Ю., Лихачев В.Н., Виноградов Г.А. Перенос энергии и заряда в биологических системах на большие расстояния // *Химическая физика*. — 2012. — Т. 31. — № 12. — С. 45–55.

2. Афанасьев А.П., Лахно В.Д., Посыпкин М.А., Султанов В.Б. Стационарные состояния в нелинейной модели переноса заряда в ДНК // *Труды ИСА РАН*. — 2009. — Т. 46. — С. 147–152.
3. Волобуев М.Н. Молекулярные проводники на основе цепочек ДНК // *Вестник Нац. техн. ун-та «ХПИ»*: Сб. науч. тр. Темат. вып.: Химия, химическая технология и экология. — Харьков: НТУ «ХПИ», 2008. — № 33. — С. 22–26.
4. Воробьев В.С., Воробьева О.В. К 100-летию со дня рождения Фрэнсиса Крика — одного из первооткрывателей двойной спирали ДНК // *Вестник биотехнол. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова*. — 2016. — Т. 12(1). — С. 41–50.
5. Давыдов А.С. Солитоны в квазиодномерных молекулярных структурах // *Успехи физических наук*. — 1982. — Т. 138(4). — С. 603–643.
6. Кузнецов П.Е., Кузнецова Н.Б. Возможный механизм биологического действия ДНК как доноров электронов // *Auditorium*. — 2015. — Т. 1. — № 5. — С. 18–33.
7. Лахно В.Д., Султанов В.Б. О возможности сверхбыстрого переноса заряда в ДНК // *Математическая биология и биоинформатика*. — 2009. — Т. 4(2). — С. 46–51.
8. Лахно В.Д., Четвериков А.П. Возбуждение бабблов и бризеров в ДНК и их взаимодействие с носителями заряда // *Математическая биология и биоинформатика*. — 2014. — Т. 9. — № 1. — С. 4–19.
9. Новик Н.В., Берашев Ю.А., Борисенко В.Е. Возможности применения молекулы ДНК в качестве переноса ключающего элемента // *Доклады БГУИР*. — 2003. — №2(2) — С. 20–28.
10. Arnold A.R., Grodick M.A., and Barton J.K. DNA charge transport: From chemical principles to the cell // *Cell Chem. Biol.* — 2016. — Vol. 23(1). — P. 183–197.
11. Artacho E., Machado M., Sánchez-Portal D., Ordejón P., and Soler J.M. Electrons in dry DNA from density functional calculations // *Mol. Phys.* — 2003. — Vol. 101(11). — P. 1587–1594.
12. Augustyn K.E., Genereux J.C., and Barton J.K. Distance-independent DNA charge transport across an adenine tract // *Angew. Chemie — Int. Ed.* — 2007. — Vol. 46(30). — P. 5731–5733.
13. Barton J.K., Olmon E.D., and Sontz P.A. Metal complexes for DNA-mediated charge transport // *Coord. Chem. Rev.* — 2011. — Vol. 255(7–8). — P. 619–634.
14. Bezerril L.M., Moreira D.A., Albuquerque E.L., Fulco U.L., de Oliveira E.L., and de Sousa J.S. Current-voltage characteristics of double-strand DNA sequences // *Phys. Lett.* — 2009. — Vol. 373(37). — P. 3381–3385.
15. Bixon M., Giese B., Wessely S., Langenbacher T., Michel-Beyerle M.E., and Jortner J. Long-range charge hopping in DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1999. — Vol. 96(21). — P. 11713–11716.
16. Blaustein G.S., Lewis F.D., and Burin A.L. Kinetics of charge separation in poly(A)-Poly(T) DNA hairpins // *J. Phys. Chem. B*. — 2010. — Vol. 114(19). — P. 6732–6739.

17. *Chen F. and Tao N.J.* Electron transport in single molecules: from benzene to graphene // *Acc. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 42(3). – P. 429–438.
18. *Collier C.P. et al.* Molecular-based electronically switchable tunnel junction devices // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – Vol. 123(50). – P. 12632–12641.
19. *Conron S.M.M., Thazhathveetil A.K., Wasielewski M.R., Burin A.L., and Lewis F.D.* Direct measurement of the dynamics of hole hopping in extended DNA G-tracts. an unbiased random walk // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132(41). – P. 14388–14390.
20. *Daublain P., Thazhathveetil A.K., Wang Q., Trifonov A., Fiebig T., and Lewis F.D.* Dynamics of photochemical electron injection and efficiency of electron transport in DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – Vol. 131(46). – P. 16790–16797.
21. *David S.S., O'Shea V.L., and Kundu S.* Base-excision repair of oxidative DNA damage // *Nature.* – 2007. – Vol. 447(7147). – P. 941–950.
22. *Dekker C. and Ratner M.* Electronic properties of DNA // *Physics World.* – 2001. – Vol. 14(8). – P. 29–33.
23. *Dress A., Giegerich R., Gruenewald S., and Wagner H.* Fibonacci-Cayley Numbers and Repetition Patterns in Genomic DNA // *Ann. Comb.* – 2003. – Vol. 7. – P. 259–279.
24. *Eley D.D. and Parfitt G.D.* The semiconductivity of organic substances. Part 2 // *Trans. Faraday Soc.* – 1955. – Vol. 51. – P. 1529–1539.
25. *Endres R.G., Cox D.L., and Singh R.R.P.* Colloquium: The quest for high-conductance DNA // *Rev. Mod. Phys.* – 2004. – Vol. 76(1). – P. 195–214.
26. *Fink H.-W. & Schönemberger Ch.* Electrical conduction through DNA molecules // *Nature.* – 1999. – Vol. 398. – P. 407–410.
27. *Flores J.C.* Quantum LC circuits with charge discreteness: normal and anomalous spectrum // *Europhysics Letters.* – 2005. – Vol. 69(1). – P. 116–120.
28. *Geneux J.C., Boal A.K., and Barton J.K.* DNA-mediated charge transport in redox sensing and signaling // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132(3). – P. 891–905.
29. *Geneux J.C., Wuerth S.M., and Barton J.K.* Single-step charge transport through DNA over long distances // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 133(11). – P. 3863–3868.
30. *Giese B., Amaudrut J., Köhler A.-K., Spormann M., and Wessely S.* Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling // *Nature.* – 2001. – Vol. 412(6844). – P. 318–320.
31. *Giese B., Graber M., and Cordes M.* Electron transfer in peptides and proteins // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2008. – Vol. 12(6). – P. 755–759.
32. *Giese B., Wessely S., Lindemann U., Meggers E., and Michel-Beyerle M.E.* On the mechanism of long-range electron transfer through DNA // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1999. – Vol. 38(7). – P. 996–998.
33. *Giese B.* Electron transfer in DNA // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2002. – Vol. 6(5). – P. 612–618.
34. *Gurvitz S.A.* Delocalization in the Anderson model due to a local measurement // *Phys. Rev. Lett.* – 2000. – Vol. 85(4). – P. 812–815.
35. *Henderson P.T., Jones D., Hampikian G., Kan Y., and Schuster G.B.* Long-distance charge transport in duplex DNA: the phonon-assisted polaron-like hopping mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1999. – Vol. 96(15). – P. 8353–8358.
36. *Kanvah S. and Schuster G.B.* The sacrificial role of easily oxidizable sites in the protection of DNA from damage // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33(16). – P. 5133–5138.
37. *Kasumov A.Y., Klinov D.V., Roche P.E., Guéron S., and Bouchiat H.* Thickness and low-temperature conductivity of DNA molecules // *Appl. Phys. Lett.* – 2004. – Vol. 84(6). – P. 1007. doi: 10.1063/1.1644909.
38. *Kawai K., Kodera H., Osakada Y., and Majima T.* Sequence-independent and rapid long-range charge transfer through DNA // *Nat. Chem.* – 2009. – Vol. 1(2). – P. 156–159.
39. *Lewis F.D., Letsinger R.L., and Wasielewski M.R.* Dynamics of photoinduced charge transfer and hole transport in synthetic DNA hairpins // *Acc. Chem. Res.* – 2001. – Vol. 34(2). – P. 159–170.
40. *Lewis F.D., Liu X., Liu J., Miller S.E., Hayes R.T. & Wasielewski M.R.* Direct measurement of hole transport dynamics in DNA // *Nature.* – 2000. – Vol. 406(6791). – P. 51–53.
41. *Luo L. and Frisbie C.D.* Length-dependent conductance of conjugated molecular wires synthesized by stepwise 'click' chemistry // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – Vol. 132(26). – P. 8854–8855.
42. *Macia E.* Charge transfer in DNA: effective Hamiltonian approaches // *Zeitschrift für Krist.* – 2009. – Vol. 224(1–2). – P. 91–95.
43. *Mallajosyula S.S. and Pati S.K.* Toward DNA conductivity: A theoretical perspective // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 1(12). – P. 1881–1894.
44. *Meggers E., Kusch D., Spichty M., Wille U., and Giese B.* Electron transfer through DNA in the course of radical-induced strand cleavage // *Angew. Chemie, Int. Ed.* – 1998. – Vol. 37(4). – P. 460–462.
45. *Meggers E., Michel-Beyerle M.E., and Giese B.* Sequence dependent long range hole transport in DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 1998. – Vol. 120(49). – P. 12950–12955.
46. *Morita T. and Kimura S.* Long-range electron transfer over 4 nm governed by an inelastic hopping mechanism in self-assembled monolayers of helical peptides // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125(29). – P. 8732–8733.
47. *Nogues C., Cohen S.R., Daube S., Apter N., and Naaman R.* Sequence dependence of charge transport properties of

- DNA // *J. Phys. Chem. B.* — 2006. — Vol. 110(16). — P. 8910–8913.
48. Núñez M.E., Hall D.B., and Barton J.K. Long-range oxidative damage to DNA: Effects of distance and sequence // *Chem. Biol.* — 1999. — Vol. 6(2). — P. 85–97.
 49. O'Neill M.A., Dohno C., and Barton J.K. Direct chemical evidence for charge transfer from photoexcited 2-aminopurine and guanine in duplex DNA // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — Vol. 126(5). — P. 1316–1317.
 50. Petrov E.G., Shevchenko Y.V., Teslenko V.I., and May V. Nonadiabatic donor – acceptor electron transfer mediated by a molecular bridge: A unified theoretical description of the superexchange and hopping mechanism // *Chem. Phys.* — 2001. — Vol. 115(15). — P. 10176–10186.
 51. Schrödinger E. *What is Life? The physical aspect of the living cell.* — Cambridge Univ. Press, 1945.
 52. Scott A.C. Davydov's soliton revisited // *Phys. D: Nonlinear Phenom.* — 1991. — Vol. 51(1–3). — P. 333–342.
 53. Shinwari M.W., Deen M.J., Starikov E.B., and Cuniberti G. Electrical conductance in biological molecules // *Adv. Funct. Mater.* — 2010. — Vol. 20(12). — P. 1865–1883.
 54. Siriwong K. and Voityuk A.A. *Electron transfer in DNA* // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science.* — 2012. — Vol. 2(5). — P. 780–794. doi:10.1002/wcms.1102.
 55. Starikov E.B. Quantum chemistry of nucleic acids: How it could help and when it is necessary // *J. Photochem. and Photobiol. C: Photochem. Rev.* — 2002. — Vol. 3(2). — P. 147–164.
 56. Storm A.J., van Noort J., de Vries S., and Dekker C. Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100 nm length scale // *Appl. Phys. Lett.* — 2001. — Vol. 79(23). — P. 3881–3883.
 57. Thazhathveetil A.K., Trifonov A., Wasielewski M.R., and Lewis F.D. Increasing the speed limit for hole transport in DNA // *J. Am. Chem. Soc.* — 2011. — Vol. 133(30). — P. 11485–11487.
 58. Torres-Silva H., Iturri-Hinojosa A. and López-Bonilla J. Transmission line as a possible model of charge migration in a chain of DNA molecules under radiation // *BAOJ Phys.* — 2017. — Vol. 2(3): 018.
 59. van Loon B., Markkanen E., and Hübscher U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine // *DNA Repair (Amst).* — 2010. — Vol. 9(6). — P. 604–616.
 60. Velarde M.G., Chetverikov A.P., Ebeling W., Hennig D., and Kozak J.J. On the mathematical modeling of soliton-mediated long-range electron transfer // *Int. J. Bifurc. Chaos.* — 2010. — Vol. 20(1). — P. 185–194.
 61. Volobuyev M. and Adamowicz L. Computational model of hole transport in DNA // *J. Phys. Chem. B.* — 2005. — Vol. 109(2). — P. 1048–1054.
 62. Wang H., Muren N.B., Ordinario D., Gorodetsky A.A., Barton J.K., and Nuckolls C. Transducing methyltransferase activity into electrical signals in a carbon nanotube-DNA device // *Chem. Sci.* — 2012. — Vol. 3(1). — P. 62–65.
 63. Xiang L., Palma J.L., Li Y., Mujica V., Ratner M.A., and Tao N. Gate-controlled conductance switching in DNA // *Nat. Commun.* — 2017. — Vol. 8. — 14471. doi: 10.1038/ncomms14471.
 64. Yamagishi M.E.B. and Shimabukuro A.I. Nucleotide frequencies in human genome and Fibonacci numbers // *Bull. Math. Biol.* — 2008. — Vol. 70(3). — P. 643–653.
 65. Yoo K.-H. et al. Electrical conduction through poly(dA)-poly(dT) and poly(dG)-poly(dC) DNA molecules // *Phys. Rev. Lett.* — 2001. — Vol. 87(19). — 198102. doi: 10.1103/PhysRevLett.87.198102.
 66. Zolotaryuk A.V., Spatschek K.H., and Savin A.V. Supersonic mechanisms for charge and energy transfers in anharmonic molecular chains // *Phys. Rev. B.* — 1996. — Vol. 54(1). — P. 266–277.

AN ANALYSIS OF EXISTING APPROACHES TO THE STUDY OF THE MOTION OF A CHARGE CARRIER ALONG NUCLEIC ACIDS

M.A. GALCHENKOVA^{1,2}, P.M. GOTOVTSEV², RG VASILOV²

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology (State University),*

² *National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow*

The review considers the main key parameters that predetermine the nature of charge migration along the DNA molecule, that is, parameters that affect the rate of charge transfer along the nucleotide chain. The main stages of such charge transfer along the DNA chain have been mainstreamed, the basic mechanisms of this process have been discussed, various opinions on this issue have been compared. A general scheme is presented that combines the existing models underlying the mechanism of charge transfer along the DNA chain. The possible ways of setting up experiments in this scientific direction are substantiated, starting from our own ideas about the hypothetical working model of the charge transfer discussed.

Keywords: DNA, charge transfer, mechanisms.

ОТХОДЫ ЛЕСОЗАГОТОВОК И ДЕРЕВООБРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ КАК ИСХОДНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОГАЗА

О.В. СЕНЬКО^{1,2*}, Д.А. СЛЮСАРЕВ³, О.В. МАСЛОВА¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва;

³МГТУ им. Н.Э. Баумана, Мытищинский филиал, Мытищи, Московская область

Проведены обзор и анализ результатов научно-исследовательских работ, опубликованных в период с 2002 по 2017 гг. и посвященных изучению возможностей получения биогаза из различных отходов лесозаготовительной и деревообрабатывающей промышленности. Показано, что такие отходы, как опилки, стружка, кора и некондиционная древесина, а также листва, могут эффективно использоваться в качестве субстратов для метаногенного консорциума.

Ключевые слова: отходы деревообработки и лесозаготовок, биогаз, метаногенез, анаэробный ил.

Лесозаготовительная и деревообрабатывающая отрасли являются одними из старейших сфер экономики России [7]. В настоящее время на отечественном рынке функционирует более 60 крупных деревообрабатывающих комплексов. В XXI веке наблюдается активный и успешный переход этих отраслей на потенциально новый уровень. Основные цели — ориентир на производство высококачественной конкурентоспособной продукции с учетом основных принципов зеленой экономики. Активно развивается производство продукции глубокой переработки древесины, создаются новые материалы с уникальными свойствами [17], осуществляется внедрение на производство высокоточного оборудования, налаживается сотрудничество с сертификационными организациями [4]. При этом много внимания уделяется поиску путей минимизации и переработки отходов каждого производственного цикла.

В Российской Федерации ежегодно образуется порядка 35,5 млн. м³ древесных отходов [2, 6, 8]. Отходы образуются практически на всех стадиях лесозаготовительного и деревообрабатывающего процессов, в некоторых случаях их доля равна половине от исходного сырья (табл. 1).

© 2017 г. Сенько О.В., Слюсарев Д.А., Маслова О.В.

* **Автор для переписки:**

Сенько Ольга Витальевна

канд. хим. наук, научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН
E-mail: senkoov@gmail.com

Таблица 1

Доли выхода отходов и потерь различных производств [2, 6, 8, 12]

| Вид производства | Доля выхода, % | |
|--|----------------|--------|
| | отходы | потери |
| Лесозаготовки и лесное хозяйство | 20–37 | - |
| Лесопиление и деревообработка | | |
| - лесопиление и механическая обработка древесины | 38–48 | 7 |
| - плитное производство (в т.ч. древесные пластики) | 5–10 | 5 |
| - фанерное производство | 42–52 | 8 |
| - комбинированное производство | 22–27 | 8 |
| Лесохимическое производство (целлюлозно-бумажное и гидролизное производство, в т.ч. производство этилового спирта) | 35–38 | - |

Вследствие низкой товарной ценности древесные отходы в большинстве случаев не используются, а иногда и не утилизируются. Мелкие сыпучие отходы лесозаготовки и лесопиления (хвоя, листья, опилки, стружка, древесная пыль, кора), из которых можно вырабатывать только отдельные виды продукции, пока не нашли еще широкого и полного применения, но имеют перспективные направления использования. Листья практически не используются, а опилки используются, но не более 30% от общего объема [12]. Расширение возможностей использования вторичных древесных ресурсов является важным шагом в развитии рационального природопользования и экологической безопасности.

Отходы лесной промышленности — это, прежде всего, перспективное биотопливо — возобновляемый источник энергии (ВИЭ). По характеру использования древесное биотопливо разделяется на следующие виды: древесина для сжигания (дрова), генераторный газ из древесины, биогаз из древесины, жидкое биотопливо (метанол и этанол из древесины, биожидкости и химикаты второго поколения, очищенное топливо — древесный уголь, пеллеты и брикеты) [11]. По некоторым оценкам, экономический потенциал использования ВИЭ в России составляет до 25% объема ежегодного энергопотребления, а на практике ВИЭ составляют сегодня только 1%, а к 2020 году могут достигнуть отметки 4,5% [11].

В 2013 году Правительством РФ утвержден План мероприятий по созданию благоприятных условий с целью использования возобновляемых древесных источников для производства тепловой и электрической энергии [18].

Широкий спектр отходов лесозаготовок и деревообрабатывающих предприятий (в том числе и сточные воды) может стать сырьем для получения биогаза, представляющего собой перспективный ВИЭ [3, 14, 16]. Сейчас для Российской Федерации получение биогаза из отходов является, прежде всего, вопросом организации экологически безопасного производства. Однако в дальнейшем при переходе к экологическим видам топлива для небольших предприятий данный подход может стать достойным экономичным вариантом переработки отходов.

Биогаз — смесь газов, выделяющихся в процессе анаэробного брожения отходов. Древесные отходы разлагаются с выделением следующих газов: метан — 60–70%; углекислый газ — 30–40%; небольшое количество сероводорода — 0–3%; примеси водорода, аммиака и оксидов азота [6].

В настоящее время известно ограниченное количество работ, посвященных изучению возможностей использования отходов лесозаготовок и предприятий деревообрабатывающей промышленности в качестве субстратов для получения биогаза. Большая часть таких работ посвящена рассмотрению опилок и щепы в качестве основных субстратов, которые могут быть получены, в том числе, и при измельчении некондиционной древесины. Главным ограничивающим фактором для использования древесных отходов в качестве сырья для получения биогаза является наличие в древесине компонентов — ингибиторов активности микробных биокатализаторов процесса получения биогаза, таких как лигнин, смолы хвойных пород. Так что из-за низкой степени конверсии субстрата себестоимость продукта

неконкурентоспособен, а сам процесс биоконверсии — нерентабелен. Содержание основных органических компонентов в древесине зависит от ее вида (табл. 2).

Таблица 2

Химический состав углеводов в различных видах древесины [23]

| Углеводы | Содержание, % | |
|------------------------|----------------|-------------------|
| | Хвойные породы | Лиственные породы |
| Целлюлоза | 48–56 | 46–48 |
| Лигнин | 26–30 | 19–27 |
| Гемицеллюлоза, в т.ч.: | 23–25 | 26–35 |
| - пентозаны | 10–12 | 23–29 |
| - гексозаны | 13 | 3–6 |

Повысить эффективность биокаталитических процессов переработки отходов возможно при использовании различных подходов на стадиях предварительной обработки сырья, непосредственно в ходе биоконверсии предобработанного субстрата в конечный продукт, а также на стадии выделения и очистки конечного продукта [15, 21, 22]. В частности, метаногенное брожение древесины позволяет интенсифицировать различные способы предобработки исходных отходов, однако экономически обоснованное решение для данного биотехнологического процесса до сих пор не найдено. Таким образом, актуальным представляется вопрос подбора эффективных методов предварительной обработки древесины, применяемой в технологии производства биометана. Существуют механические, термические, фотохимические, химические и ферментативные методы деструкции лигиноцеллюлозной биомассы, в результате которых происходит увеличение реакционной способности сырья [13].

Так, при исследовании влияния содержания основных органических веществ в различных видах древесины на интенсивность выхода биогаза применялась механическая предобработка. Фракционный состав опилок в среднем составлял 1–3 мм, после ее механического измельчения изготавливались пеллеты. Установлено, что процессы метаногенеза пеллет осиновых и буковых опилок происходят наиболее интенсивно в первые три недели от внесения культуры метаногенных микроорганизмов в субстрат, по сравнению с дубовыми и сосновыми опилками и корой (рис. 1) [13]. В древесине хвойных видов содержатся смолы, которые служат ингибиторами для метаногенных процессов; кроме того, в этих породах отмечается и высокое содержание лигнина (см. табл. 2), который также является ингибитором метаногенного консорциума. Сравнительный анализ состава лиственных видов деревьев

дает возможность сделать вывод о том, что наибольшим содержанием целлюлозы и наименьшим содержанием лигнина характеризуются опилки осины, древесина которой служит предпочтительным субстратом для метаногенного брожения. В древесине дуба содержатся дубильные вещества, которые тоже являются ингибиторами для анаэробного ила. Содержание целлюлозы в опилках бука сравнительно меньше, но, учитывая небольшое относительное содержание лигнина и высокое относительное содержание гемицеллюлозы, выход биогаза из отходов этой древесины достаточно высок.

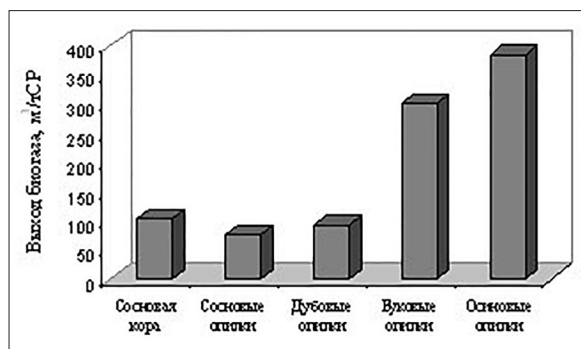


Рис. 1. Выход биогаза из различных древесных отходов, прошедших через механическую предобработку (по материалам [13])

Для увеличения выхода биогаза в ходе биоконверсии сосновых опилок предложена химическая предобработка древесины путем выдерживания исходного субстрата в 8,0% (мас) растворе NaOH [24]. Самое значительное увеличение выхода метана (181,2%) по сравнению с использованием в качестве субстрата необработанной древесины получено при обработке сырья щелочным раствором в течение 10 мин при 100 °С. Анализ изменения химического состава и физических характеристик предобработанной таким образом древесины свидетельствует о снижении кристалличности целлюлозы за счет предварительной обработки и о нарушении структуры сосновой древесины.

Для увеличения выхода биогаза при использовании в качестве субстрата древесины японского кедра предложена ферментативная предобработка путем культивирования грибов белой гнили *Ceriporiopsis subvermispora* [20]. Эти грибы культивировались на древесных стружках с пшеничными отрубями и без них в течение 4–8 недель. Показано, что предварительная обработка с помощью *C. subvermispora* в присутствии пшеничных отрубей в течение 8 недель уменьшала количество α-арильных эфирных связей в лигнине на 74–76%. После подобной предобработки древесины выход метана достигал 35% от теоретического выхода. При этом выход

метана при трансформации необработанной древесины составлял 25% от теоретически возможного выхода. Ферментативная предобработка путем культивирования *C. subvermispora* в отсутствие пшеничных отрубей привела к увеличению выхода метана только 6–9% метана.

Цель еще одного исследования состояла в том, чтобы охарактеризовать анаэробную биodeградируемость некоторых древесных отходов на городских свалках путем измерения выхода метана [26] (табл. 3).

Таблица 3

Выход метана при анаэробном разложении некоторых древесных отходов [26]

| Отход | Метан, мл CH ₄ /г сух. в-в субстрата |
|-------------------------------------|---|
| Древесина красного дуба | 32,5 |
| Древесина эвкалипта | 0 |
| Древесина ели | 7,5 |
| Древесина сосны | 0,5 |
| Фанера | 6,3 |
| Ориентированно-стружечная плита из: | |
| - древесины твердых пород | 84,5 |
| - древесины мягких пород | 0 |
| Древесностружечная плита | 5,6 |
| Древесноволокнистая плита | 4,6 |

Несмотря на то, что целью указанного исследования не было получение биогаза, принципиально можно оценить, какие отходы являются потенциальными субстратами для метаногенного консорциума: стружечная плита из твердых сортов древесины и отходы древесины красного дуба. Древесина эвкалипта оказалась наиболее токсичной для микроорганизмов. При этом авторы отмечают, что анаэробное биоразложение древесностружечной и древесноволокнистой плит сопровождается образованием аммиака, что также необходимо учитывать при организации подобного процесса.

Ряд исследовательских работ посвящен применению отходов обработки древесины как добавки при проведении процессов метаногенеза или компонента смесовых субстратов.

Так, например, для достижения максимального экономического эффекта предлагается смешивать отходы деревообрабатывающего цеха с отходами столовой и навозом крупного рогатого скота [5]. При этом опилки должны быть предобработаны путем вываривания в водном или щелочном растворе. Для повышения рыхлости опилки следует термически обработать в автоклаве. При этом

геометрические размеры отходов деревообрабатывающего цеха не должны превышать 35 мм. Навоз рекомендуется смешивать с опилками в массовом соотношении 7:3, что позволит избежать затрат на увлажнение опилок и получить максимальный выход биогаза, а также качественное биоудобрение по окончании процесса метаногенеза.

Другие исследователи предлагают добавлять древесную золу при анаэробной биотрансформации навоза свиней и кожуры маниоки для поддержания оптимального для метаногенного консорциума уровня рН культуральной среды [19].

В качестве субстрата для метаногенного консорциума может выступать и листва деревьев (рис. 2) [1, 10].

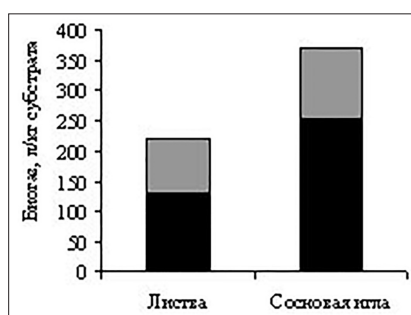


Рис. 2. Выход биогаза при анаэробной биотрансформации листвы и сосновых игл [1]. Черный цвет — доля метана в составе биогаза

Листва деревьев относится к категории естественного опада, наблюдающегося ежегодно в лесах умеренного климата и в парковых городских зонах. Ресурсы городского листового опада значительны, но утилизация его постоянно сопровождается экологическими и экономическими издержками. Показано, что наибольший выход метана наблюдается при использовании измельченной биомассы листового опада и адаптированной ассоциации метаногенов [9].

Что касается сточных вод предприятий по получению древесных плит, то они содержат различные типы фенольных соединений, ингибирующих микроорганизмы метаногенного консорциума [25]. Так, анаэробная трансформация сточных вод после получения различных типов плит (из древесины сосны и эвкалипта) возможна только под действием адаптированного анаэробного консорциума при низких скоростях органических нагрузок (0,1–0,4 г ХПК/л/сут) с удалением ХПК от 10 до 30%; при этом удаления цветности не происходило [25].

Таким образом, можно утверждать, что отходы древесины являются прекрасным сырьем для использования в биогазовых технологиях, особенно при наличии специальной предобработки исходного субстрата. Листва деревьев

также позволяет накапливать значительные концентрации биогаза с высокой долей метана. Что касается сточных вод деревообрабатывающих предприятий, то их использование в качестве субстрата для получения биогаза осложнено наличием химических примесей — ингибиторов биокатализаторов. Однако метаногенный консорциум в принципе может быть использован для очистки подобных стоков.

Работа выполнена при поддержке Президиума РАН (Программа «Фундаментальные аспекты химии углеродной энергетики» № 18).

Литература

1. *Адамовская В.Н.* Перспективы введения в использование биогазовых установок в сельском хозяйстве республики Башкортостан // Никоновские чтения. — 2009. — № 14. — С. 121–122.
2. *Андреев А.А.* Ресурсосбережение и использование отходов заготовки и переработки древесного сырья // Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты. — 2014. — № 10. — С. 148–155.
3. *Ваваева М.С., Марушко М.В.* Биогаз как современный источник энергоресурсов в Белгородской области // Образование, наука, производство (VII Международный Молодежный Форум) Белгород, 20–22 октября 2015 г.). — 2015. — С. 1212–1216.
4. *Воропаев А.* Продвижение устойчивого лесопользования и добровольной лесной сертификации в мире (Итоги Ежегодной конференции всемирной сети по торговле сертифицированной лесной продукцией) // Устойчивое лесопользование. — 2009. — № 2. — С. 39–41.
5. *Гумерова Р.Х., Черняховский В.А.* Возможность применения биогазовой установки для утилизации отходов производства промышленных предприятий // Вестник Казанского технологического университета. — 2017. — Т. 20(9). — С. 134–139.
6. *Дитрих В.И., Андрияс А.А., Пережилин А.И., Корпачев В.П.* Оценка объемов и возможные пути использования отходов лесозаготовок на примере Красноярского края // Хвойные бореальной зоны. — 2010. — Т. 27(3–4). — С. 346–351.
7. *Жиров Н.Н.* Деревообработка на Руси // Наука и современность. — 2015. — № 39. — С. 12–15.
8. *Колесникова А.В.* Анализ образования и использования древесных отходов на предприятиях лесопромышленного комплекса России // Актуальные вопросы экономических наук. — 2013. — № 33. — С. 116–120.
9. *Куканова С.И., Зайнитдинова Л.И., Ташпулатов Ж.Ж., Арипов Т.Ф.* Фитомасса городского листового опада как источник получения биотоплива // Микробиология және вирусология. — 2014. — № 2. — С. 104–110.
10. *Куцев Л.А., Сулов Д.Ю.* Физико-химические и технологические основы процесса получения биогаза в био-

- ректорах с барботажным перемешиванием субстрата // Сборник материалов региональной научно-технической конференции по итогам конкурса ориентированных фундаментальных исследований по междисциплинарным темам, проводимого Российским фондом фундаментальных исследований и Правительством Белгородской области. – 2015. – С. 205–217.
11. Луговая Д. Принципы устойчивого производства древесного биотоплива // Устойчивое лесопользование. – 2013. – № 4(37). – С. 36–42.
 12. Мохирев А.П., Безруких Ю.А., Медведев С.О. Переработка древесных отходов предприятий лесопромышленного комплекса, как фактор устойчивого природопользования // Инженерный вестник Дона. – 2015. – Т. 36 – № 2–2. – С. 81.
 13. Павліський В.М., Захарів О.Я., Тригуба Б.М. Вплив попередньої обробки відходів різних видів деревини на інтенсивність метаногенного бродіння // Науковий вісник НУБіП України. Серія: Біологія, біотехнологія, екологія. – 2015. – № 214. – С. 228–233.
 14. Полосин И.И., Кузнецова Н.В., Скрипак А.Г. Биогаз как способ обеспечения топливными ресурсами сооружений. // Научный вестник Воронежского государственного архитектурно-строительного университета. Серия: Высокие технологии. Экология. – 2011. – № 1. – С. 137–141.
 15. Сенько О.В., Степанов Н.А., Маслова О.В., Лягин И.В., Ефременко Е.Н. Ресурсосберегающая биотехнология получения фумаровой кислоты из возобновляемого растительного сырья // Вестник Кузбасского государственного технического университета. – 2013. – № 1. – С. 111–113.
 16. Ситдикова Р.Р., Еналиева Д.Р., Голубь К.А. Биогаз как альтернативный источник энергии // Сборники конференций НИЦ Социосфера. – Vedecko vydavatelске centrum Sociosfera-CZ sro. – 2016. – № 10. – С. 118–121.
 17. Стородубцева Т.Н. Отходы промышленности и лесного комплекса в композитах // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 3. – С. 78–80.
 18. Электронный ресурс. <http://www.mnr.gov.ru/news/detail.php?ID=131039>. Дата доступа 06.10.2017.
 19. Adeyanju A. Effect of seeding of wood-ash on biogas production using pig waste and cassava peels // J. Eng. Appl. Sci. – 2008. – Vol. 3(3). – P. 242–245.
 20. Amirta R., Tanabe T., Watanabe T., Honda Y., Kuwahara M., Watanabe T. Methane fermentation of Japanese cedar wood pretreated with a white rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora* // Journal of biotechnology. – 2006. – Vol. 123(1). – P. 71–77.
 21. Maslova O., Senko O., Stepanov N., Lyagin I., Aslanli A., Makhlis T., Efremenko E. Polyfunctional enzymatic biologics for development of technology useful for improvement of qualitative characteristics of renewable vegetable raw materials // Abstract book. International Conference «Renewable plant resources: Chemistry, Technology, Medicine». – Saint Petersburg: VVM Publishing Ltd., 2017. – P. 56.
 22. Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Efremenko E.N. Lactic acid production using free cells of bacteria and filamentous fungi and cells immobilized in polyvinyl alcohol cryogel: A comparative analysis of the characteristics of biocatalysts and processes // Catalysis in Industry. – 2016. – Vol. 8(3). – P. 280–285.
 23. Pérez J., Munoz-Dorado J., de la Rubia T.D.L.R., Martinez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview // International microbiology. – 2002. – Vol. 5(2). – P. 53–63.
 24. Salehian P., Karimi K., Zilouei H., Jaihanipour A. Improvement of biogas production from pine wood by alkali pretreatment. // Fuel. – 2013. – Vol. 106. – P. 484–489.
 25. Vidal G., Diez M.C. Methanogenic toxicity and continuous anaerobic treatment of wood processing effluents // Journal of Environmental Management. – 2005. – Vol. 74(4). – P. 317–325.
 26. Wang X., Padgett J.M., De la Cruz F.B., Barlaz, M.A. Wood biodegradation in laboratory-scale landfills // Environmental science and technology. – 2011. – Vol. 45(16). – P. 6864–6871.

WASTE FROM LOGGING AND WOOD PROCESSING INDUSTRY AS SUBSTRATES FOR BIOGAS PRODUCTION

O.V. SENKO^{1,2*}, D.A. SLIUSAREV³, O.V. MASLOVA¹

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University

² N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

³ Moscow State Forest University

A review and analysis of the results of research papers published between 2002 and 2017 were conducted and devoted to the study of the possibilities of obtaining biogas from various wastes from the forestry and woodworking industries. It is shown that such wastes as sawdust, chips, bark and substandard wood, as well as foliage, can be effectively used as substrates for the methanogenic consortium.

Keywords: waste wood processing and logging, biogas, methanogenesis, anaerobic sludge.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 29.12.17
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 6,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru